

**KALITSAL HASTALIKLARDAN GILBERT'DE UGT
VE OBEZİTE'DE BETA -3 ADRENERJİK RESEPTÖR
GENLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

**MOLECULAR ANALYSIS OF UGT IN INHERITED
DISEASE GILBERT AND BETA-3 ADRENERGIC
RECEPTOR GENE IN OBESITY**

130952

İ.ÇAĞATAY KARAASLAN

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

2003

130952

TEZİN KÜTÜPHANESİNE
KAYDEDİLMİŞİNDİR
KÜTÜPHANE

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI 'nda BİLİM UZMANLIĞI TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

.....
(Prof. Dr. Ay ÖGÜŞ)

Üye (Danışman)

.....
(Prof. Dr. Cihan ÖNER)

Üye

.....
(Prof. Dr. Erol AKSÖZ)

Üye

.....
(Prof. Dr. Reyhan ÖNER)

Üye

.....
(Doç. Dr. Leyla AÇIK)

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından tarihinde kabul edilmiştir.

...../...../.....

.....

Prof.Dr. Seyfi KULAKSIZ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

YAZININ KABULU
KARAR
T.C. YÜKSEKÖĞRETİM
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



SEVGİLİ AİLEME

KALITSAL HASTALIKLARDAN GILBERT'DE UGT VE OBEZİTE'DE BETA –3 ADRENERJİK RESEPTÖR GENLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

İ. Çağatay Karaaslan

ÖZ

Obezite 21. yüzyılın en yaygın sağlık sorunlarından birisidir. Yeme alışkanlıklarındaki değişiklikler, değişen sosyoekonomik durum ve genetik etmenler obezitenin gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Obeziteye neden olan, tek genli kalıtım gösteren genlerin yanısıra bazı genlerin de obeziteye yatkınlığa yol açtığı bulunmuştur. Beta-3 Adrenerjik reseptör geni (ADRB3) de termogenezis ve lipolizis metabolik yollarında görev alan ve obeziteye yatkınlığa yol açtığı düşünülen aday genlerden birisidir. Bu tez çalışması kapsamında, ADRB3 geni üzerindeki bir polimorfizmin vücut kitle indeksi (VKİ) ile ilişkisi 155 hasta ve 116 normal Türk bireyde araştırılmıştır. Polimorfizm, polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon parça boyu polimorfizmi analiz yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda, ADRB3 polimorfizmi ile VKİ arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunamamıştır ($p < 0,05$).

Gilbert sendromu, orta düzeyde şiddetle seyreden, UDP- glukuronozil transferaz enziminin sentezindeki azalmaya bağlı olarak serumdaki bilirubin düzeyinin yükselmesine neden olan bir hastalıktır. Bu enzimi kodlayan genin (UGT1A1) promotör bölgesindeki polimorfizmin yüksek bilirubin düzeyi ile ilişkili olduğu literatürde yer almaktadır. 45 hasta, 21 normal olmak üzere toplam 66 bireyde bu polimorfizmin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu temelinde denatüre jel elektroforez tekniği kullanılarak incelenmiştir. İki grup arasındaki frekans değerleri birbirine yakın çıkmıştır. Türk toplumunda yapılan bu çalışma, ileriki çalışmalar için bir temel teşkil etmektedir.

Anahtar sözcükler: ADRB3, UGT1A1, obezite, Gilbert sendromu, polimorfizm, VKİ, bilirubin

Danışman: Prof. Dr. Cihan ÖNER, Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı



MOLECULAR ANALYSIS OF UGT IN INHERITED DISEASE GILBERT AND BETA-3 ADRENERGIC RECEPTOR GENE IN OBESITY

İ. Çağatay Karaaslan

ABSTRACT

Obesity is one of the most widely known health problem of the 21st century. Modifications in eating habits, changing socioeconomic status and genetic factors are playing important roles in the development of obesity. Besides the mono-genetically inherited genes which cause obesity, it is found that some genes are causing obesity inclination. Beta-3 adrenergic receptor gene (ADRB3) has a function in thermogenesis and lipolysis metabolic pathways and it is one of the candidate genes which is thought to be causing obesity inclination. In this thesis, the relation between a polymorphism on the ADRB3 gene and body mass index (BMI) is investigated on 155 affected and 116 normal Turkish people. Polimorphism was determined by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis methods. As a result of the study no statistical difference was found between ADRB3 and BMI ($p>0,05$).

Gilbert syndrome is a moderate disease which causes high bilirubine level in serum depending on the decrease in synthesis of UDP- glucuronosyltransferase enzyme. In literature it is mentioned that high bilirubin level is related to a polymorphism in the promotor region of the enzyme's coding gene (UGT1A1). Existence of this polymorphism is searched by polymerase chain reaction based denaturated gel electrophoresis method in 45 affected and 21 normal individuals. The frequency values between two groups is found to be close. This research carried out with Turkish population will provide a base for further studies.

Keywords: ADRB3, UGT1A1, obesity, Gilbert syndrome, polymorphism, VKI, bilirubine

Advisor: Prof. Dr. Cihan ÖNER, Hacettepe University, Department of Biology,
Molecular Biology and Genetic Section

BU TEZ ÇALIŞMASI Prof.Dr. CİHAN ÖNER'İN YÜRÜTÜCÜLÜĞÜNDEKİ
01K120640 NOLU DPT VE Dr. HATİCE MERGENİN YÜRÜTÜCÜLÜĞÜNDEKİ
0101601006 NOLU ARAŞTIRMA FONU PROJESİ TARAFINDAN
DESTEKLENMİŞTİR.

TEŞEKKÜR

Bilim uzmanlığı eğitimim süresince karşılaştığım tüm güçlükleri aşmamda yardımlarını esirgemeyerek gerek teorik gerekse pratik olarak bilmediğim pek çok şeyi öğreten değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Cihan Öner'e ve Prof. Dr. Reyhan Öner'e;

Çalışmanın gerçekleşmesi için gereken hastaların sağlanmasında yardımlarını esirgemeyen H.Ü. Tıp Fak. Pediatrik Hematoloji A.B.D. öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Fatma Gümrük ve Mevki Askeri Hastanesi İç Hastalıkları Uzmanı Tabib Binbaşı Sayın Mehmet Mergen'e;

Verilerin değerlendirilmesi ve istatistik analizlerinin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Sayın Araş. Gör. Dr. Murat Aytekin'e;

Bu tez çalışmasında yardımını hiçbir zaman esirgemeyen, her türlü konuda deneyimlerinden yararlandığım değerli hocam Sayın Araş. Gör. Dr. Hatice Mergen'e

Laboratuvar çalışmalarında ve diğer konularda yardım ve dostluklarını esirgemeyen arkadaşlarım Sayın Araş. Gör. Esra Birben, Sayın Araş. Gör. Ceren Acar, Sayın Araş. Gör. Mert Sözen, Sayın Araş. Gör. Zekiye Yurtsever'e ve Sayın Araş. Gör. Sibel Özsoy'a

İsmi yazamadığım ve bu çalışmada en küçük şekilde de olsa yardımı dokunan herkese;

En içten duygularıyla teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Öz	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1 Obezitenin Tanımı	3
2.2 Obezite Prevalansı	3
2.3 Obezite Risk Faktörleri	4
2.4 Obezite Tipleri	5
2.4.1 Anatomik Sınıflama	6
2.4.2 Etiyolojik Sınıflama	6
2.4.3 Fonksiyonel Değerlendirme	8
2.5 Obezitenin Ölçülmesi	9
2.5.1 Vücut Kitle İndeksinin Belirlenmesi	9
2.5.2 Beden Çevresi Ölçümleri	10
2.5.3 Deri Kıvrımı Kalınlığının Belirlenmesi	10
2.5.4 Enstrümental Yöntemler	12
2.6 Obezitenin Moleküler Temeli	12
2.6.1 Beslenmenin Kontrolü	14
2.6.2 Enerji Verimliliğinin Kontrolü	15
2.6.3 Adipogenezis	15
2.7 Obezite Genleri	15
2.7.1 Leptin (OB) ve Leptin Reseptör (OBR) Geni	16
2.7.2 Proopiomelanokortin (POMC)	16
2.7.3 Melanokortin-4- Reseptör (MC4R) Geni	17
2.7.4 Beta-3 Adrenerjik Reseptör (ADRB3) Geni	17
2.8 Adrenoseptörler (Adrenerjik Reseptörler)	18
2.8.1 Adrenoseptörlerin Etkilil Olduğu Sistemler	19
2.8.2 β Adrenoseptörler	21
2.8.3 β_3 Adrenoseptörler	21
2.9 Kan Doku	23
2.10 Eritrositler	23
2.10.1 Hemoglobin Yapımı	24
2.10.1.1 Hem grubu oluşum mekanizması	24
2.10.1.2 Globinin Oluşum Mekanizması	24
2.10.2 Hemoglobinin Yıkımı	25
2.11 Sarılık	31
2.11.1 Doğumsal Sarılık Tipleri ve Yeni Doğarlarda Sarılık	33
2.12 Gilbert Sendromu ve Moleküler Temeli	36
2.12.1 UDP- Glukuronozil Transferaz Enzimi	36
2.12.2 UDP- Glukuronozil Transferaz Gen Ailesi	37
2.12.3 UGT1 Gen Yapısı	37
2.13 Gilbert Sendromu ve UGT1A1 Promotor Bölgesi Varyasyonu..	40

3. MATERYAL ve METOD	41
3.1 İncelenen Örneklerin Toplanması	41
3.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu	41
3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	43
3.4 Restriksiyon Parça Boyu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)	45
3.5 Restriksiyon Endonükleaz Enzim Kesim Örneklerinin Nondenatüre Edici Poliakrilamid Jel Elektforezi ile Kontrolü	46
3.6 Denatüre Edici Poliakrilamid Jelde UGT1A1 Genindeki Tekrar Sayılarının Tesbiti	47
3.7 DNA Dizi (Sekans) Analizi	49
3.8 İstatistik Analizi	51
4. SONUÇLAR	52
4.1 Obez Hastalarda ADRB3 Gen Polimorfizminin Taranmasına Ait Sonuçlar	52
4.1.1 ADRB3 geninin amplifikasyonu	53
4.2 ADRB3 Geninin Mva I Enzimi ile Kesimi	54
4.3 UGT1A1 Geni TA İnsersiyon Polimorfizminin Taranmasına Ait Sonuçlar	59
4.4 UGT1A1 Geni Promotor Bölgesinin Amplifikasyonu	59
4.5 UGT1A1 Geninin Poliakrilamid Jel Elektforezi	60
4.6 UGT1A1 Geni TA İnsersiyon Polimorfizminin Sekans ile Kontrolü	61
5. TARTIŞMA	63
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Vücut kitle indeksini belirlemede kullanılan nomogram	11
Şekil 2.2 Bel ve kalça çevresini belirlemek için kullanılan nomogram	13
Şekil 2.3 Leptin molekülünün beslenme üzerine etki mekanizması	14
Şekil 2.4 Katekoleminlerin kimyasal yapıları	19
Şekil 2.5 Beta 3 Adrenerjik Reseptör yapısı	22
Şekil 2.6 Alfa Gen Kümesi	25
Şekil 2.7 Beta Gen Kümesi	26
Şekil 2.8 Hem grubunun biliverdine parçalanması sırasında oluşan ara ürünler ..	27
Şekil 2.9 Hemoglobinin Bilirübine yıkımı	28
Şekil 2.10 Bilirubin Kaynakları	29
Şekil 2.11 Bilirübünün Karaciğer döngüsü	30
Şekil 2.12 UGT gen kompleksi	38
Şekil 2.13 UDP Glukuronozil Transferaz Gen Ailesi	39
Şekil 4.1 Çalışma grubundaki bireylerin VKI' ne göre dağılımı	52
Şekil 4.2 ADRB3 geninin amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jelde Görüntülenmesi.....	53
Şekil 4.3 ADRB3 geni 1. ekzonunda 286 bç lik amplifikasyon bölgesi üzerinde yer alan Mva I enziminin kesim noktaları ve kesim büyüklükleri ...	54
Şekil 4.4 ADRB3 geni Trp64Arg polimorfizmi	55
Şekil 4.5 UGT1A1 geni promotor bölgesi amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel Görüntüleri	59
Şekil 4.6 UGT1A1 geni 6 ve 7 (TA) tekrarlarının poliakrilamid jel görüntüsü	60
Şekil 4.7 UGT1A1 geni promotor bölgesinde 6 (TA) tekrarının sekans analizinin görüntüsü	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Vücut ağırlığını artıran ilaçlar	7
Çizelge 2.2 Erişkin kişide VKİ değerlendirmesi	10
Çizelge 2.3 Adrenerjik çeşitlerinin bulunduğu dokular ve görevleri	20
Çizelge 2.4 Sarılığın patofizyolojik sınıflandırması	32
Çizelge 4.1 Çalışma grubundaki bireylerin klinik özellikleri	52
Çizelge 4.2 Obez ve kontrol grubunda ADRB3 gen polimorfizmi dağılımı	55
Çizelge 4.3 ADRB3 çalışma grupları ve VKİ değerleri	57
Çizelge 4.4 ADRB3 geninde hasta ve kontrol gruplarında VKİ' nin polimorfizim ile ilişkisini gösteren ANOVA tablosu	58
Çizelge 4.5 UGT1A1 çalışma grubunu oluşturan bireylerin klinik özeliği	59
Çizelge 4.6 UGT1A1 geni polimorfizim dağılım tablosu	62



SİMGELER ve KISALTMALAR

ADBR3 :	Beta -3 Adrenerjik reseptör
ANOVA:	Varyans Analizi
Bç :	Baz çifti
CT :	Kompüterize Tomografi
DF :	Serbestlik derecesi
DPA :	Dual foton absorpsiyometri
F :	F dağılım değeri
Kb :	Kilo baz
Lpa :	Lipoprotein antijeni
MC4R :	Melanokortin 4 reseptör
MM :	Ortalamalar toplamı
MRI :	Magnetik rezonans görüntüleme
OB :	Leptin
OBR :	Leptin reseptör
P :	Olasılık
POMC :	Proopiomelanokortin
PZR :	Poimeraz Zincir reaksiyonu
RE :	Restriksiyon endonükleaz
RFLP :	Restriksiyon parça boyu uzunluk polimorfizmi
SD :	Standart sapma
sdH ₂ O :	Steril distile su
SS :	Kareler toplamı
TBE :	Tris Borat EDTA
TE :	Tris-EDTA
TM :	Transmembran bölgeleri
UCP :	Uncouple protein
UDP :	Üridindifosfat
UGT :	Üridin difosfat Glukuronozil Transferaz
UV :	Ultra viole
VKI :	Vücut kitle indeksi
α :	Alfa
β :	Beta
μl :	Mikro litre

1.Giriş

Obezite, günümüzde karşılaşılan en büyük ve en önemli sağlık sorunlarından biridir. Vücutta sağlığı tehlikeye sokabilecek derecede aşırı yağ birikmesi şeklinde tanımlanan obezite, uzmanlar tarafından batılı ülkelerin karşılaştığı en ciddi ve acil yaklaşım gerektiren halk sağlığı sorunu olarak gösterilmektedir. Artan vücut ağırlığı; Tip2 diyabet, hipertansiyon ve koroner kalp hastalıkları gibi pekçok hastalığı beraberinde getirmektedir.

Obezite büyük oranda ucuz, lezzetli, yüksek enerji veren besinlerin tüketildiği zengin ve endüstrileşmesini tamamlamış ülkelerin sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmakta ve posadan fakir, kalorisi yüksek, hızlı beslenme kültürünün yaygınlaşmasına paralel olarak artış göstermektedir.

Gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalar Amerikan, Alman ve İngiliz nüfusunun en az %40'ınının aşırı kilolu olduğunu göstermektedir. Obezitenin önemli bir sorun olarak değerlendirilmediği Japonya'da bile popülasyonun %16'sı aşırı kiloludur. (Seidell ,1995).

Son yapılan çalışmalarda, ülkemizdeki obezite yaygınlığı %22,3 olarak bulunmuştur. Son 20 yılda ülkemizdeki obezite yaygınlığında artış gözlenmiştir (Coşkun, 2002).

Obezite genetik, çevresel, sosyoekonomik, kültürel ve psikolojik etmenlerin rol oynadığı kompleks bir hastalıktır. Obeziteye neden olan genetik faktörlerin belirlenmesi bu hastalığın önlenmesi ve tedavisi için yeni yaklaşımların oluşturulması açısından çok önemlidir. Leptin (Ob,Lep), Leptin reseptörü (LepR), Melanokortin-4 reseptörü (MC4-R) ve Pro-opiomelanokortin (POMC) gibi genlerdeki mutasyonların obeziteye yol açtıkları bulunmuştur. Beta-3 adrenerjik reseptör (ADRB3) geni de obeziteye yol açtığı düşünülen aday genlerden birisidir (Palou et al., 2000).

ADRB3, termogenezis ve lipolizis mekanizmalarında görev almaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda, bu reseptörü kodlayan gendeki 64. kodonda yer alan Triptofan -> Arjinin amino asit değişiminin obeziteye yatkınlığa neden olabileceği

gösterilmiştir (Lowe et al., 2001). Bu çalışmada, ADRB3 Trp 64 Arg değişiminin Türk obez hastalardaki frekansının ve obeziteye yatkınlığa neden olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışmasının diğer konusunu ise, UDP-glukuronozil transferaz enziminin sentezindeki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkan Gilbert sendromundaki moleküler değişikliklerin araştırılması oluşturmaktadır. Bilirubin metabolizmasında glukuronidasyondan sorumlu enzim olan UDP- glukuronozil transferaz enzimini kodlayan UGT1A1 geninde meydana gelen değişiklikler, yüksek bilirubinemiye bağlı farklı klinik özelliklerdeki hastalıkların nedenidir. Bunların en hafif tipte seyredenini ise Gilbert sendromudur (Bosma et al.,1995).

Literatürde şu ana dek yapılan çalışmalarda UGT1A1 geni promotorunda yer alan iki nükleotit uzunluğundaki (TA) insersiyonu taşıyan (7 TA tekrarı olan) Gilbert'lı hastalarda farklı hiperbilirubinemi düzeyleri rapor edilmiştir. Yürütülen tez çalışmasının amacı, Türk toplumunda Gilbert sendromu taşıyan hastalarda UGT1A1 geninde bulunan insersiyonun frekansının belirlenmesidir.

Bu çalışma kapsamında yer alan polimorfizmlerin incelenmesi için, polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR), restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ve DNA dizi analizi (Sequencing, Sekans) yöntemleri kullanılmıştır.

2. Genel Bilgi

2.1. Obezitenin Tanımı

Obezite, vücudun enerji alımıyla enerji harcanması arasındaki dengeyi sağlayamaması sonucu aşırı yağlanmasına yol açan bir hastalıktır. Obezite kelimesi; Latince ob -den dolayı, esum: yemiş olmak, yani obezite yemekten dolayı anlamındadır. Vücut yağ kütlesinin oranı erkeklerde %12-18, kadınlarda %20-30 arasındadır. Obezite, genç erkeklerde vücut yağ kütlesinin %22'nin, yaşlı erkeklerde %25'in üzerinde; genç kadınlarda %32 ve yaşlı kadınlarda ise % 35'in üzerinde bulunması durumudur (Bray, 1994).

Hastalık, insan vücudunda kalp ve damar sistemi, hormonal sistem, solunum sistemi ve sindirim sistemi gibi önemli sistemleri etkilemekte ve birçok önemli hastalığa zemin hazırlamaktadır. Yüksek tansiyon, kalp hastalıkları, şeker hastalığı, yüksek kolesterol, eklem hastalıkları, solunum rahatsızlığı, adet düzensizliği, safra kesesi hastalıkları gibi pek çok hastalık obeziteyle ilişkilendirilmektedir (Kopelman , 2000).

2.2. Obezite Prevalansı

Obezite, günümüzde özellikle gelişmiş ülkelerin başlıca sağlık sorunlarından birisini oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde yapılan çalışmalar erişkinlerin %33'ünün, çocuk ve gençlerin ise %20-27'sinin obez olduğunu göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri popülasyonunun yaklaşık yarısı obez olarak değerlendirilmektedir. Avrupa'da da durum farklı değildir. Avrupa'da obezite sıklığı %22 olarak bulunmakla birlikte Alman ve İngiliz nüfusunda bu oran %30'ları geçmektedir (Birmingham et al.,1999).

Ülkemizde obezite sıklığı son yıllarda hızla artmaktadır. Büyük kentlere göçün artmasıyla birlikte, beslenme kültüründeki değişiklikler ve stresli yaşam biçiminin benimsenmesi obezite prevalansının artmasına yol açmıştır. Vücut kitle indeksi 30kg/m^2 'nin üzerinde ($VKI > 30\text{ kg/m}^2$) olan bireylerin dahil edildiği, İstanbul

Üniversitesi Tıp Fakültesi, Devlet İstatistik Enstitüsü ve Sağlık Bakanlığı'nın yaptığı ortak çalışmada, Türkiye'deki obezite prevalansı %22,3 olarak bulunmuştur. Prevalans, kadınlarda erkeklerden (Kadın:%29,9, Erkek:%12,9); kentsel alanlarda, kırsaldan (Kentsel %23,8, Kırsal %19,6) daha yüksek olarak bulunmuştur. Bölgesel dağılıma bakıldığında; obezite sıklığı, İç Anadolu'da en yüksek (%25) ve Doğu Anadolu'da en düşük (%17,2) olmak üzere güneyde %24, kuzeyde % 23,5 ve batıda %21,6 olarak bulunmuştur. Tüm bölgelerde prevalans kadınlarda erkeklere nazaran daha yüksek bulunmuştur (Coşkun, 2002).

2.3. Obezite Risk Faktörleri

Erişkinlerde obezite gelişiminde başlıca risk faktörleri :

1. Fiziksel aktivitede azalma
 2. Doğum sayısı
 3. Sigarayı bırakma
 4. Alkol
 5. Sosyokültürel etkenler
 6. Evlilik
 7. Beslenme alışkanlıkları
 8. Yaş
 9. Cinsiyet (kadın)
 10. Irksal faktörler
 11. Eğitim düzeyi
 12. Anne ve babanın veya her ikisinin obez olması
- şeklinde sıralanabilir.

Obezite gelişiminde rol oynayan çevresel faktörler ise :

- | | |
|---------------------|---|
| 1.Sosyal Faktörler: | Sosyal yapıdaki değişimler |
| | Ekonomik değişimler ve piyasa ekonomisi |
| | Şehirleşme |
| | Sosyoekonomik durum |

2. Bilişsel (kognitif) Faktörler: Diyet kısıtlaması
Vücut ağırlığına dikkat etme
3. Kültürel Faktörler: Yemek seçimi
Sağlığa dikkat etme düzeyi
4. Biyolojik Faktörler: Diyetin yağ içeriği
Enerji alımı
Azalmış fiziksel aktivite şeklindedir (Özata, 2003).

2.4. Obezite Tipleri

Obezite klasik olarak iki tipe ayrılmaktadır:

1. Hiperplastik Obezite

Çocuklarda yağ hücrelerinin sayısının artması ve genişlemesi ile oluşan obezite tipidir.

2. Hipertrofik Obezite

Yağ hücrelerinin sayısının normal olduğu, fakat yağ depolarının arttığı obezite tipidir.

Bu klasik sınıflandırma dışında daha kapsamlı olarak obeziteyi sınıflandırırken üç kısma ayırabiliriz.

I. Anatomik sınıflama

A. Mikroskobik

1. Yağ hücresinin büyüklüğü
2. Yağ hücrelerinin sayısı

B. Makroskobik

1. Vücudun total yağ kütlesi
2. Cilt-altı yağ dokusu dağılımı
3. Viseral yağ kütlesi
4. Normalin dışında veya olağandışı yağ birikimleri

II. Etiyolojik sınıflama

A. Hipotalamik

B. Endokrin

C. Diyete bağlı

- D. Fiziksel inaktiviteye bağlı
- E. İlacı bağlı
- F. Genetik

III. Fonksiyonel sınıflama

A. Beden kitle indeksinden çıkarılan tahmini risk derecesine göre

B. Eşlik eden risklere göre

1. Kan basıncının yüksek olması
2. İnsülin rezistansı veya diyabet
3. HDL kolesterol LDL kolesterol oranının düşük olması
4. EKG ile LVH saptanması
5. Uykü apne sendromu
6. Hirsutizm veya LH/FSH oranının yüksek olması
7. Sigara alışkanlığı
8. Zorlanarak yemek yiyen kişiler
9. Fiziksel aktivitesi az bireyler

Bu sınıflandırma içinde yer alan bazı maddeleri ayrıntılı bir biçimde inceleyeceğiz.

2.4.1. Anatomik Sınıflama

Vücut yağ kütleini anatomik sınıflandırırken üç noktaya dikkat edilmelidir. Bunlardan birincisi histolojik olanıdır. Histolojik olarak obeziteyi yağ hücrelerinin çok büyük olmasına (hipertrofik obezite) veya çok büyük ve çok sayıda olmalarına (hiperplastik obezite) göre sınıflandırmak mümkündür. İkinci bir anatomik sınıflama da vücudun total yağ kütleine göre yapılabilir. Beden yağ kütleinin normal sınırları erkeklerde %12-18; kadınlarda ise %20-30'dur. Anatomik sınıflamada üçüncü önemli nokta, beden yağının dağılımıdır. Kadınlarda görüleni, jinoit veya vücudun alt kısımlarının obezitesi olarak adlandırılır. Diğer tip yağ dağılımı ise tipik olarak erkeklerde görülür ve android ya da vücudun üst kısmının obezitesi olarak adlandırılır. Vücudun santral yağ dağılımının yüksek olması hem kadınlarda hem de erkeklerde morbidite ve mortalite riskini artırmaktadır. Total vücut yağ kütlei ve cilt altı yağ dağılımından ziyade, viseral yağın özelliği daha güçlü bir risk yansıtıcı parametre olarak dikkate

alınır. Viseral yağ miktarı yaşa; androjen, östrojen ve büyüme hormonu düzeylerine; hastanın cinsiyetine ve genetik faktörlere göre değişir (Bray, 1994).

2.4.2. Etiyolojik Sınıflama

İkinci bir sınıflandırma şekli de etiyolojik sınıflandırmadır. Altı etiyolojik grup belirlenebilir. Bunlardan ilki hipotalamik hasardır. Hipotalamusunda tümör, travma ve iltihap gibi lezyonlar sonucu meydana gelen hasarlar, obeziteye neden olabilmektedir. İkinci grupta Cushing sendromu, polikistik over sendromu ve gonadal yetersizlik gibi çeşitli endokrin hastalıklar yer alır. Üçüncü grup diyetten kaynaklanan obezitedir. Yağ alımı ve obezite arasında bir ilişki olduğunu gösteren en çarpıcı kanıtlar, VKİ ile obezite ve aşırı kilo ölçütlerinin, kişilerin yağ alımları ile olan ilişkisini araştıran çalışmalardan gelmektedir (Lissner et al., 1995). Bu çalışmaların en genişlerinden biri Almanya'da yapılan ve aşırı kilosu olan 200.000'den fazla kadın ve erkeğin tarandığı ulusal bir sağlık yükseltme programıdır. VKİ düzeyi, alınan yağ miktarının artışına paralel olarak az miktarda ancak sistemli bir artış göstermektedir. (Pudel et al., 1992).

ABD'de, 1974/75 Ulusal Sağlık ve Beslenme Değerlendirme Gözlemlerinin (NHANES II) verilerini kullanan bir başka çalışmada, yağdan gelen enerji oranının şişmanlık ile anlamlı bir ilişki gösterdiği saptanmıştır. Yağdan elde edilen enerji oranı ile vücut ağırlığı arasındaki ilişkinin çocuklarda da erişkinlerdeki gibi olduğu bulunmuştur. Özellikle doymuş yağ oranı yüksek, fazla yağlı diyet tüketenlerde obezitenin daha abartılı olduğu epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir. Dördüncü grup ise, fiziksel inaktivite periyodunu izleyerek obezitenin ortaya çıktığı hastaları kapsar. Beşinci etiyolojik grup ilaçlara bağlı gelişen obezitedir; bunların bazıları Çizelge 2.1'de verilmiştir. Son etiyolojik sınıf ise genetikdir (Bray, 1994).

Çizelge 2.1: Vücut ağırlığını artıran ilaçlar

Fenotiyazinler: klorpromazin, tiyoridazin, promazin

Antideprezanlar: amitriptilin, imipramin, desipramin, trazodon

Antiepileptikler: valproat, karbamazepin

Steroidler: glukokortikoidler, megestrol asetat

2.4.3. Fonksiyonel Değerlendirme

Bu değerlendirme sisteminin son komponenti, hastanın tedavisi ve prognozunu etkileyebilen medikal ve tıbbi sorunları belirler. Önce, hipertansiyonun mevcut olup olmadığını belirlemek açısından, kan basıncının dikkatle ölçülmesi gereklidir. Pletore görüldüğünde not edilmeli ve beraberinde hipertansiyon da varsa, Cushing sendromunu ekarte etmek için gerekli hormon tayinleri yapılmalıdır. İkincisi, hasta insülin rezistansı, bozulmuş glukoz toleransı veya diyabet yönünden incelenmeli; ailede diyabet mevcut ise, gebelik sırasında glikozüri saptanmışsa ya da makrozamili (doğum tartısı fazla) bebek doğurmuş ise glukoz tolerans testi yapılmalıdır. İnsülin rezistansı sıklıkla mevcuttur ve açlık durumunda ve eğer ölçülebilmisse glukoz tolerans testi esnasında insülin düzeyleri yararlı bilgiler verir. Üçüncü olarak, yüksek-dansiteli ve düşük-dansiteli lipoproteinler, trigliserid/kolesterol oranı ve mümkünse lipoprotein küçük A antijeni (Lpa antijeni) ölçülerek lipoprotein durumu incelenmelidir. Obezitede kardiyomiyopati olasılığının, belirgin şekilde fazla kilolu (BKI>35 kg/m²) bireylerde araştırılması gereklidir. Beşinci olarak, uyku apnesini ekarte etmek için, özellikle uyku esnasında pulmoner fonksiyon testleri ve arteriyel gazın ölçülmesi gerekir. Uyku apnesinden şüpheleniliyorsa, arteriyel kan gazları tayin edilmelidir. Altıncı olarak, hirsutizm ve adet düzensizlikleri, polikistik over sendromunu düşündürmelidir. Lüteinizan hormon, folikül stimülan hormon, testosteron ve seks hormon-bağlayıcı globülin düzeyleri ölçülerek, bu sendrom yönünden daha ileri değerlendirme yapılabilir. Yedinci aşamada, gerekli görülürse, safra taşları yönünden ultrasonografik inceleme düşünülebilir. Sekizinci olarak, sigara anemnezi derinleştirilmelidir. Dokuzuncusu, anketler veya iş-gücü testleri yardımı ile fizik kondisyon durumunun değerlendirilmesi gereklidir. Nihayet, tedavi için daha büyük sorun oluşturan abur-cubur yeme alışkanlığı gözden geçirilmeli, yeme davranışları belirlenmeye çalışılmalıdır (Bray, 1994).

2.5. Obezitenin Ölçülmesi

2.5.1. Vücut Kitle İndeksinin Belirlenmesi

Quetelet indeksi olarak da bilinen vücut kitle indeksi, kilogram cinsinden ağırlığın metre cinsinden boy uzunluğunun karesine bölünmesi ile elde edilir (Şekil2.1).

$$VKİ = \frac{\text{Ağırlık (kg)}}{\text{Boy (m}^2\text{)}}$$

Obezite fazla kilolu olmakla eş anlamlı değildir. Kemik, kas ve yağ ağırlıklarının toplamı vücut ağırlığını verir. Boy(cm)-100= ideal ağırlık, Borca indeksi adı ile bilinen eski bir formüldür. 170 cm boyunda bir insan bu formüle göre 170-100=70 kg olmalıdır. Ancak 170 cm boyunda bir sporcu 80 kg olduğu halde obez olarak nitelendirilmeyebilir. Çünkü ağırlığı normalin üzerinde olmasına rağmen yağ kitlesi normalin üzerinde değildir. Dolayısıyla kişi obez değildir. Tersine 170 cm boyunda 70 kg ağırlığında olup yağ kitlesi normalin çok üzerinde olan kişiler de vardır. Birinci örnekte kas kemik kitlesi artmış obez olmayan kilosu ağır bir kişi varken; ikinci örnekte ise kas kemik kitlesi az, yağ dokusu artmış ve kilosu normalden fazla olmamasına karşın obez bir kişi vardır. Salt boy ağırlık ölçümü ile yapılan değerlendirmenin yetersiz kaldığı görülmektedir. Bu durumda önerilen ölçü vücut kitle indeksidir (Bray, 1994).

VKI'nin vücut yağ kitlesi ile korelasyonunun iyi olduğu gösterilmiştir. Bununla beraber çocuklar, gebeler, ödemi olan hastalar, çok kısa boylu kişiler ve bazı özel durumlar (normal ağırlıkta metabolik olarak obez) dışında uygun bir obezite belirleme yöntemidir. Vücut kitle indeksi arttıkça eşlik eden hastalık riskinin de arttığı görülmektedir (Lissner et al., 1995). Çizelge 2.2'de VKI'nin değerlendirilmesi verilmiştir.

Çizelge2.2: Erişkin kişide VKİ değerlendirilmesi

Sınıflama	VKİ	Eşlik Eden Morbidite Riski
Zayıf	< 18.5	Düşük
Normal	18.5-24.5	Orta
Fazla kilolu	>25	Orta derece artmış
Pre-obez	25-29.9	Artmış
Obez 1	30-34.9	Yüksek
Obez 2	35-39.9	Ağır
Obez 3 (Morbid obez)	>40	Morbid

2.5.2. Beden Çevresi Ölçümleri

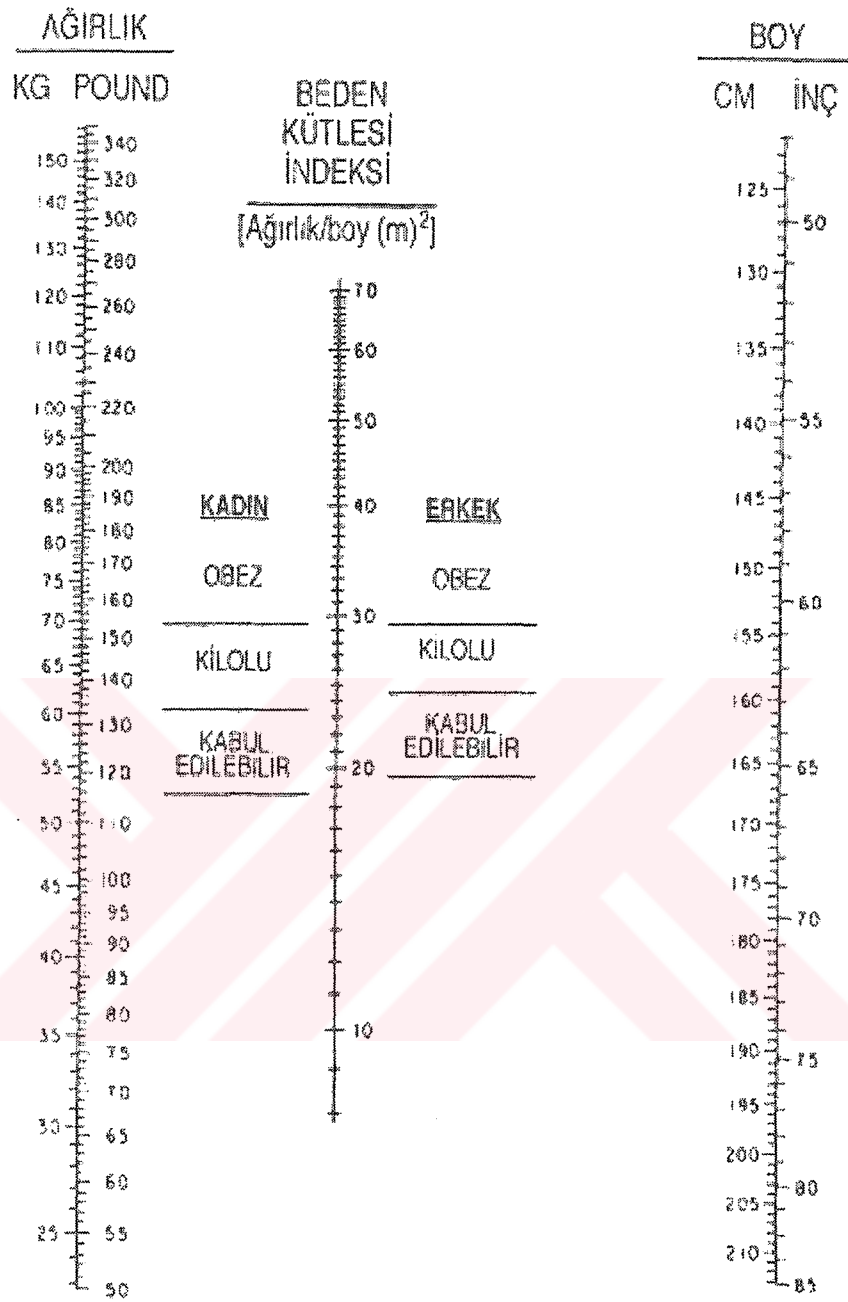
Bel ve kalça çevrelerinin birbirine oranı, özellikle karın bölgesindeki yağ birikimine eğilim oranını belirlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bel ve kalça çevresi oranı belirlemek için kullanılan nomogram Şekil 2.2'de verilmiştir (Bray, 1994).

2.5.3. Deri Kıvrımı Kalınlığının Belirlenmesi

Skapula altı bölge : Erkeklerde 22 mm üstü; kadınlarda ise 27 mm üstü obez olarak kabul edilir.

Triseps ortası : Erkeklerde 22 mm'nin üstü; kadınlarda 30 mm'nin üstü obeziteyi göstermektedir.

Boy ve beden çevresi ölçümüne kıyasla, deri kıvrımı kalınlığının doğruluk düzeyi düşük olmasına karşın; gövde ve ekstremitelerde dört ayrı kısımdan ölçüm değerleri alınması vücut yağ kütlesi hakkında fikir verebilmektedir. Gövdeden alınan değerler ekstremitelerden alınan değerlere bölünerek elde edilen oran bu tahmin için kullanılmaktadır ancak standartları bulmak oldukça zordur (Bray, 1994).



Şekil:2.1: Vücut kitle indeksini belirlemede kullanılan nomogram (Bray, 1994).

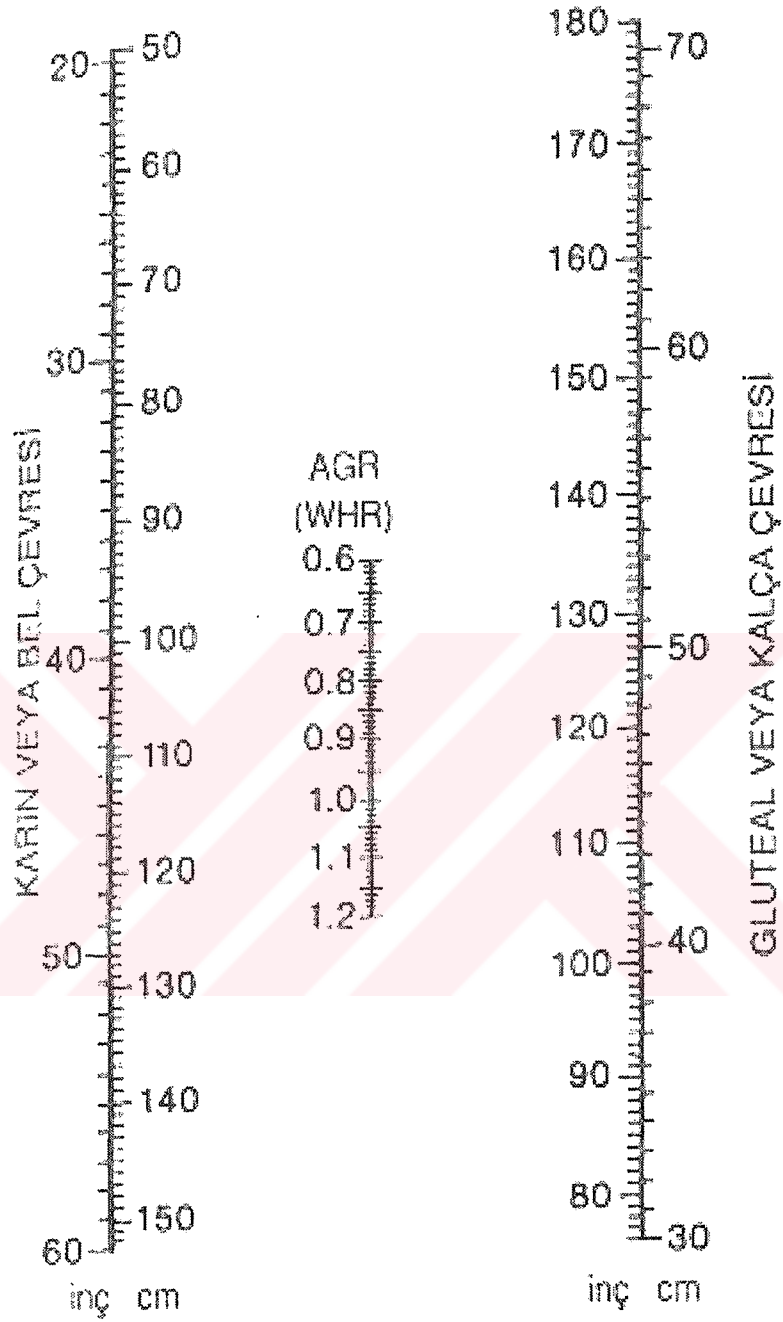
2.5.4. Enstrümental Yöntemler

Vücutta bulunan yağ kütlesi ölçümlerinin çeşitli aletler kullanılarak yapıldığı yöntemlere enstrümental yöntemler adı verilmektedir. Dual foton absorpsiyometri (DPA), X-ışını absorpsiyometrisi, biyoelektrik impedans analizi gibi yöntemlerin maliyetleri yüksek olmasına rağmen oldukça güvenilirdir. Ayrıca Kompüterize Tomografi (CT) ya da magnetik rezonans görüntüleme (MRI) teknikleri ile viseral yağ oldukça doğru bir şekilde belirlenebilir. Bu konuda ultrasonografi tekniğinden de yararlanır. Ultrasonografi cilt yağ dokusu kalınlığını ve olası viseral yağ miktarını gösterebilmektedir (Bray, 1994).

2.6. Obezitenin Moleküler Temeli

Obezite, beslenmenin kontrolü, enerji etkinliği ve adipogenezis mekanizmalarında meydana gelen bozuklukların sonucu; alınan enerji ile harcanan enerji arasındaki dzensizliğe bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu üç metabolik yol üzerinde görev alan çeşitli enzimler, proteinler ve bunların taşınmasında görevli yapılar ya da bu yapıların bağlandığı reseptör proteinlerden herhangi birisini kodlayan genler üzerindeki mutasyonlar ya da polimorfizimler obeziteye neden olabilmektedir.

- Beslenmenin Konrolü: Biyokimyasal yollar doygunluk ve açlık duygularını belirlerler ve hem miktar hem de kaliteden sorumludurlar. Bununla birlikte yiyeceğin temel tipini , iştahı, yiyeceğin alım sıklığı tercihini belirlerler. Bu faktörler iç faktörlerin yanısıra aynı zamanda çevre faktörleri ve sosyal alışkanlıklara da bağlıdır.
- Enerji Verimliliğinin Kontrolü: Biyokimyasal yollar hangi enerji biçiminin yiyeceklerden alınacağını kontrolünü de yaparlar. Vücutta termogenezisin aktivasyonu ile yiyeceklerde taşınan enerjinin yağ olarak depolanması yerine ısı olarak harcanması sağlanır.
- Adipogenezis: Yağ depolamada özelleşmiş hücrelerde (Adipositlerde) adipogenezis gerçekleştirilir. Adipoz doku, çevre dokularda hormon

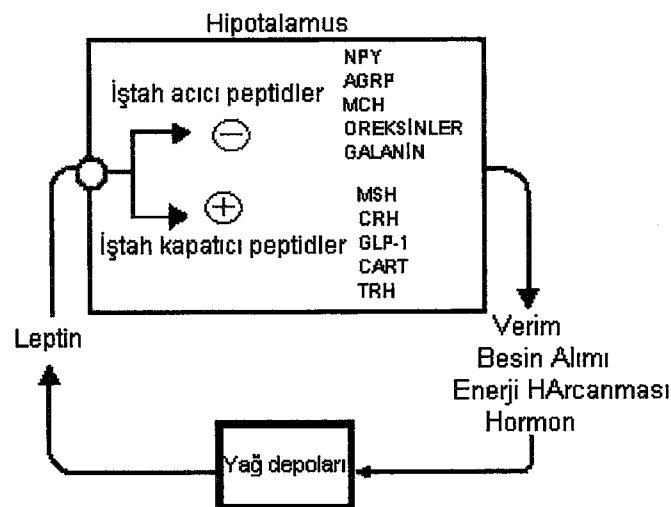


Şekil 2.2 : Bel ve kalça çevresini belirlemek için kullanılan nomogram (Bray, 1994).

düzenleyici yakıtın dağılımı üzerinde bir pivotal etkiyi kullanan düzenleyici sistemin merkezidir ve bu obezitenin birçok komplikasyonlarını içerir (Palou et al., 2000).

2.6.1. Beslenmenin Kontrolü

Beslenme davranışının düzenlenmesinde farklı görüşler bulunmaktadır. İştah kontrol mekanizmasındaki zaman görüşü bunlardan biridir. Bu görüşe göre iştahın kısa süreli kontrolü, fiziksel sinyaller ve beslenmeden sorumlu sindirici peptidlerin bırakılması ile gerçekleştirilirken; kronik ya da orta uzun dönem kontrolü vücutta enerji kaynaklarının düzeylerini işaret eden sinyaller (leptin gibi) tarafından gerçekleştirilmektedir. Sinyaller enerji kaynaklarının hazır durumunu işaret etmektedir. Burada dış enerji durumu ile iç enerji durumu hakkındaki tüm bilgileri birleştiren biyomoleküllerin farklı tipleri bulunabilmektedir. Bu biyomoleküllere örnek olarak birkaç metabolit (glukoz, keton cisimler, amino asitler, glukuronidler), hormon (insülin), oleoil- esterone ve ilgili bileşikler önerilmiştir. Bunlarla birlikte bu sinyal sisteminde genetik ve moleküler terminolojisi en ayrıntılı olarak araştırılan molekül leptin hormonudur. Beyaz yağ hücrelerinden salınan leptin molekülü beslenme üzerine etkisini leptin reseptörü üzerine bağlanarak göstermektedir. Bu bağlanmayla birlikte bir çok peptid yapılı molekül salınarak beslenmenin kontrolü gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.3). (Palou et al., 2000)



Şekil 2.3: Leptin molekülünün beslenme üzerine etki mekanizması (Palou et al., 2000)

2.6.2. Enerji Verimliliğinin Kontrolü

Tüm biyoenerjik reaksiyonlarda bir miktar enerji, ısı (termojenik) olarak serbest kalmaktadır. Bu ısı miktarının artırılması ya da azaltılması; yağ hücre mitokondrilerinde bulunan termogenin veya “uncouple protein” (UCP) tarafından kontrol edilmektedir. Uncouple proteinler besinlerden elde edilen enerjinin; ATP yerine ısı olarak harcanmasını sağlamaktadır. UCP1, UCP2 ve UCP3 olarak tanımlanan moleküller 1997 yılından itibaren bilinmektedir ve bu gen ailesi besinlerin mitokondriyal oksidasyonu süresince enerji kullanımını yönetmektedir (Boss et al., 1997 ; Gonzales et al., 2000).

2.6.3. Adipogenezis

Obezitenin olası nedenleri düşünülürken adipositlerin sayısı, olgunlaşması ve farklılaşmasını düzenleyen faktörler de göz önüne alınmalıdır. Orta düzey obezitede (hipertrofik obezite) artan trigliserid içeriğine bağlı olarak adipozitlerin boylarında da artış olmaktadır. Daha uç noktadaki ya da erken yaşta meydana gelen obezitede (hiperplastik obezite) ise adipoz hücrelerinin sayılarında artış söz konusudur. Yaşam süresince yeni adipositlerin yapımı, kapasitesi ve boyutlarını; yeme sıklığı, içeriği ve çevresel faktörler etkilemektedir (Palou et al., 2000).

Adiposit hücre hatları, multipotent embriyonik öncülerden ayrılırlar. Adipositlerdeki farklılaşmanın ve gen ifadesinin temelini öğrenmek için ayrıntılı çalışmalar yapılmaktadır. Adipogenezisi yöneten özel transkripsiyon faktörleri tanımlanmıştır. Bu faktörler üç tane olup C/EBP, PPAR ve ADD (veya SREBP) dir (Palou et al., 2000) .

2.7. Obezite Genleri

Obezite hem çevresel hem de genetik etkileşimlerin bir arada ortaya çıktığı çok faktörlü bir problemdir. Bu hastalık çok farklı doku, organ ve sistemler üzerinde etkilidir. Obeziteye neden olduğu düşünülen 200'den fazla aday gen vardır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda monogenik (tek gen mutasyonuna bağlı) sendromlar

dışında mutlaka obezite ile sonuçlanan tek bir genetik defekt veya mutasyon ortaya konamamıştır. Diğer bir deyişle obezite çok karmaşık bir yapıya sahip olan poligenik bir hastalıktır. Bu genlerden monogenik kalıtım gösteren en önemlileri, Melenokortin-4 reseptör geni, Proopiomelanokortin, Leptin ve Leptin reseptör genleridir. Beta-3 Adrenerjik reseptör geni de obezitye yol açtığı düşünülen aday genlerden biridir (Özata, 2003).

2.7.1. Leptin (OB) ve Leptin Reseptör (OBR) Geni

Yaklaşık 20 kb büyüklüğünde üç ekzondan oluşan Leptin geni (OB), 7. Kromozom üzerinde q31.3 bandında yerleşim gösterir (Friedman et al., 1991). Üç ekzondan oluşmakla birlikte ilk ekzonu protein yapısına katılmaz . 167 amino asitten oluşan leptin proteini; beyaz yağ dokusu , mide ve plasentadan salgılanır (Masuzaki et al., 1997).

OB geninin dolaşım ürünü olan leptinin ekspresyonu hayvan ve insanların yağ depolarının artımıyla birlikte artar. Bu artış besin alımını azaltırken enerji harcanmasını artırır (Guidice et al., 2000).

Leptin, beyindeki leptin reseptörüne bağlanarak görev yapmaktadır. Leptin reseptörü, 1. kromozomun p32 bandı üzerinde yer alır. Uzun ve kısa olmak üzere iki formu vardır. Uzun form leptin reseptörleri, Sınıf I sitokin reseptör ailesine aittir ve Nöropeptit Y'nin (NPY) baskılanmasında görev alır (Magni et al., 2000). NPY'nin azalmasıyla iştah azalmakta, sempatik sistem aktivitesi yükselmekte, enerji harcanması artmakta ve periferik metabolik ortam değişmektedir (Clement et al., 1998).

2.7.2. Proopiomelanokortin (POMC) Geni

Kortikotropin hormonu (ACTH), hipofiz bezinin ön lobunda sentezlenir ve adrenal korteksi stimüle eder. İnsan ACTH'ı, 4541 moleküler ağırlığındadır ve 39 amino asitten oluşur (Lee et al., 1961). ACTH geninden, ACTH, lipotropin, alfa-MSH, beta-MSH, gama-MSH ve endorfin olmak üzere 6 hormon sentezlenmektedir. ACTH ve beta lipotropin (beta-LPH) büyük bir öncül peptitten türetilir. Bu hormonlardan her

birinin, farklı biyolojik aktiviteleri olan peptitleri içerdği bilinmektedir. Öncül peptit, proopiymelanokortin (POMC) olarak adlandırılmıştır (Chretein et al., 1979).

POMC geni kromozom 2'de p23 bandı üzerindedir ve polisistroniktir. Bu gen, iki büyük intron içerir: biri yaklaşık 3.5 kb.dır, ortak öncülün N-terminal fragmentini keser. Diğeri, mRNA'nın 5' UTR'ın bir parçasını, sinyal peptidin tümünü ve N-terminal fragmentin 8 amino asidini kapsar (Baxter, 1981). Hayvan modellerinde alfa MSH'ın rolünün beyindeki melanokortin-4 reseptörünü aktive ederek besin alınımını kontrol etmek olduğu gösterilmiştir (Fan et al., 1997).

2.7.3. Melanokortin-4- Reseptör (MC4R) Geni

Melanokortin sistemi, hipotalamusta yağ dokusundan gelen leptin mesajını enerji dengesine yansıtan önemli bir yoldur. POMC'den köken alan ve bir nöropeptid olan α MSH tarafından aktive edilir. 5 melanokortin reseptörü arasında MC3 ve MC4 reseptörleri beyinde bulunur. MC4 reseptörünün enerji dengesinin düzenlenmesinde rol oynadığı bulunmuştur. Genetik olarak MC4R geni çıkartılmış farelerde hiperfaji ve obezite görülmüştür (Huszar et al., 1997).

İnsan MC4R geni, 18. kromozomun q22 bandında yer alır. Genin toplam büyüklüğü 1671 bç dir ve tek bir ekzondan oluşur. MC4R ortaya çıkan mutasyonların %4 gibi yüksek bir sıklıkta obeziteye neden olduğu bulunmuştur (Vaisse et al., 2000).

2.7.4. Beta-3 Adrenerjik Reseptör (ADRB3) Geni

Beta-3 Adrenerjik reseptör (ADRB 3) geni otozomal dominant tipte geçiş gösteren obeziteye yatkınlığa neden olduğu düşünülen aday genlerden birisidir. ADRB3 geni 8. kromozomun p12-p11.2 kolunda yer almaktadır ve 2644 bç (baz çifti) lik mRNA' ya sahiptir (Mitchell et al., 1998).

ADRB3 geni Beta-3 adrenerjik reseptör proteinini kodlamaktadır. Emorine ve arkadaşları tarafından 1989 yılında izole edilen Beta-3 Adrenerjik Reseptörü insanlarda beyaz yağ dokuda (adipoz) bulunur ve lipolizis (yağların parçalanması)

ve termogenezinin (enerji harçanması-ısı üretimi) düzenlenmesinde görev alır (Emorine et al., 1989).

Obez hastalar üzerine yapılan çalışmalar ADRB3 geninin 64. pozisyonunda (W64R) triptofanın arjinine dönüşümüyle sonuçlanan mutasyonun, kilo kapasitesinde artışa neden olduğunu göstermiştir (Lowe et al., 2001).

Adrenerjik reseptörler ve Beta-3 Adrenerjik reseptörün, yapısı ve işleyiş mekanizmaları ayrıntılı olarak incelenerek; moleküler mekanizmanın daha iyi anlaşılması sağlanacaktır.

2.8. Adrenoseptörler (Adrenerjik Reseptörler)

Katekolaminler, biyolojik olarak aktif olan aminler olup beyinde ve otonom sinir sisteminde nörotransmitterler olarak görev yaparlar. Bu maddelerin en yaygın olarak bilinenleri epinefrin (adrenalin), norepinefrin (noradrenalin), isopirotenol, dopamin, ibobamin ve doputamin'dir (Şekil 2.4). Katekolaminlerin etkileri, hücre yüzey reseptörleri vasıtasıyladır. Bu reseptörler, aktiviteleri bu reseptörlerce düzenlenen farklı efektör proteinler için G proteinlerle bağ yapmıştır. Her bir G protein alfa, beta ve gama alt ünitelerinden oluşmuş bir heterotrimerdir. Farklı G proteinleri, sahip oldukları alfa ünitelerine göre ayrılırlar. Adrenoseptörler için özellikle önemli G proteinler;

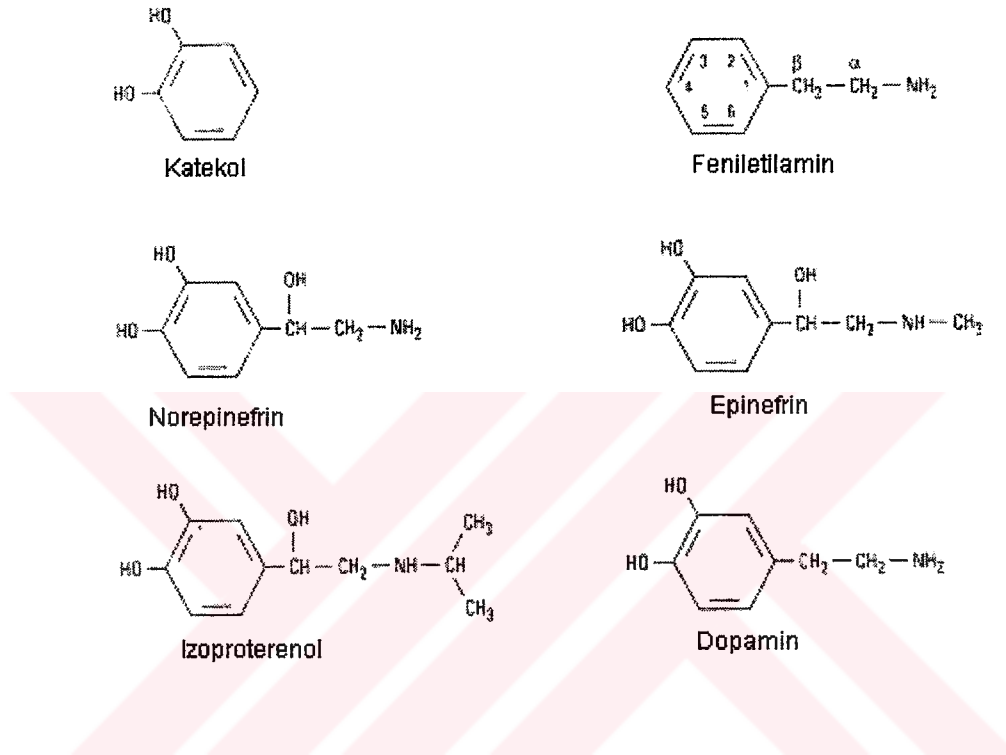
Gs: Adenil siklazı stimüle eden G protein

Gi: Adenil siklazın inhibitörü G protein

Gq: Fosfolipaz C için alfa reseptör bağlı reseptör.

Katekolaminlerce G protein-bağlı (çiftli) reseptörlerin aktivasyonu, uygun G proteinin alfa alt ünitesinden GDP'nin ayrılması ile gerçekleşmektedir. Bu ayrılmayı takiben GTP, G proteine bağlanarak alfa alt ünitesinin beta-gama ünitelerinden ayrılmasını sağlar. Aktive olmuş GTP bağlı alfa alt ünitesinin düzenlenmesi, efektörlerin aktivitesiyle gerçekleştirilir. Adrenoseptörlerdeki aktive olmuş alfa alt ünitesinin efektörlerine örnek olarak adenil siklaz, cGMP fosfodiesteraz ve fosfolipaz C verilebilir. Alfa alt ünitesinin inaktivasyonu; kendisine bağlı GTP'nin GDP ve Pi'ye

dönüşümü ile gerçekleştirilir. Bunu takiben alfa alt ünitesiyle beta-gama alt üniteleri tekrar birleşir (Hoffman, 1998).



Şekil2.4: Katekolaminlerin kimyasal yapıları (Hoffman, 1998)

Katekolaminler, temelde iki reseptör üzerinde etkilidir. Bu reseptörler alfa ve beta reseptörlerdir. Alfa reseptörlerin potansiyel serileri epinefrin \geq norepinefrin \geq izoproterenol iken beta reseptörlerin potansiyel serileri izoproterenol $>$ epinefrin \geq norepinefrin şeklindedir (Hoffman, 1998).

2.8.1. Adrenoseptörlerin Etkili Olduğu Sistemler

Adrenoseptörlerin farklı tipleri vücut içerisindeki birçok sistem üzerinde etkiye sahiptir. Bu sistemler:

1. Kardiovasküler Sistem
 - a) Kan Damarları
 - b) Kalp
 - c) Kan Basıncı

2. Göz
3. Solunum Sistemi
4. Gastrointestinal Sistem
5. Genital- Üriner Sistem
6. Ekzokrin Bezler
7. Metabolik Etkiler
8. Endokrin Üzerine Etkileri
9. Metabolik Sinir Sistemi Üzerine Etkileri

Reseptör çeşitleri, etkili oldukları doku ve görevleri çizelge 2.3 te verilmiştir (Hoffman, 1998).

Çizelge 2.3: Adrenerjik reseptör çeşitlerinin bulunduğu dokular ve görevleri

Tip	Doku	Görev
Alfa 1	Çoğunlukla vasküler düz kaslarda	Kasılma
	Göz bebeği dilatör kaslar	Kasılma
	Kılları hareket ettiren düz kaslar	Kılları dik pozüsyona getirmek
	Rat karaciğeri	Glikoneogenezis
	Kalp	Kasılmanın şiddetinin artırılması
Alfa2	Postsinaptik CNS adrenerjik reseptörleri	Muhtemelen çeşitli
	Plateletlerde	Agregasyon
	Adrenerjik ve kolinerjik sinir terminallerinde	Transmitterlerin serbest bırakılmasının inhibisyonu
	Bazı vasküler düz kaslarda	Kasılma
	Yağ hücrelerinde	Lipolizisin inhibisyonu
Beta1	Kalp	Kasılmanın şiddetinin ve oranının artırılması

Beta2	Solunum, Uterusa ait vasküler düz kaslarda	Düz kasların gevşemesinin yönetilmesi
	İskelet kaslarında	Potasyum alımının kontrolü
	İnsan karaciğeri	Glikoneogenezisin aktivasyonu
Beta3	Yağ hücreleri	Lipolizisin aktivasyonu

2.8.2. β Adrenoseptörler

β adrenoseptörler başlangıçta agonist potansiyellerine tanımlı olarak $\beta 1$ ve $\beta 2$ adrenoseptörler olarak ayrıldılar. $\beta 1$ adrenoseptörler adrenaline ve noradrenaline eşit afinite sergilerken, $\beta 2$ adrenoseptörler adrenaline göre noradrenalin için daha yüksek seçicilik göstermektedirler. Bu reseptörler alt tiplerinin keşifleri, seçici agonist ve antagonist geliştirilmesinin yolunu açmıştır.

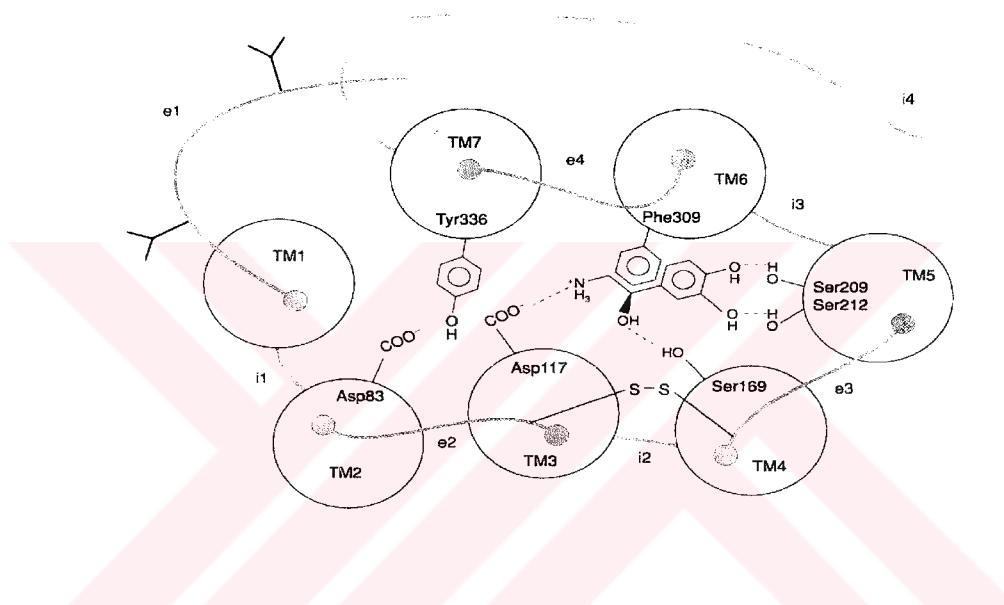
β agonistler kullanılarak daha sonraki çalışmalarda tipik olarak β antagonistlerine duyarsız görünen başka bir reseptör alt tipi ile karşılaşılmıştır. Bu reseptör $\beta 3$ adrenoseptör olarak adlandırılmıştır. Daha yakın farmakolojik kanıtlar başka bir reseptör alt tipi olan $\beta 4$ 'ü ortaya çıkarmıştır (Hoffman, 1998).

2.8.3. $\beta 3$ Adrenoseptörler

$\beta 3$ adrenoseptörler $\beta 1$ ve $\beta 2$ adrenerjik reseptörlerden oldukça farklı bir profile sahiptir. Kemirgenler, insanlar ve diğer memelilerde türden-türe farklılıklar tanımlansa da karakteristik $\beta 3$ özelliklerinin bir çoğunu paylaşırlar. İnsan $\beta 3$ reseptörlerinin doğal olarak oluşan varyantları, Pima Kızılderilileri, Japon ve batılı obez hastalarda kalıtsal obezite ile ilişkilendirilmiştir. Aynı zamanda kilo artışı, $\beta 3$ geni hasara uğratılmış dişi fareler üzerinde de görülmüştür .

Bu örnekler lipid metabolizmasının düzenlenmesinde $\beta 3$ reseptörün önemini ve obezitenin gerçek formlarının tedavisinde ilaçlar için olası bir hedef olarak gösterilmesini sağlayacaktır.

β_3 adrenoseptörler G protein bağı reseptör ailesine ait 408 amino asit rezidülü peptid zincirinden oluşmaktadır. G-protein reseptörler, yedi transmembran segmentini oluşturan 22 ila 28. rezidülere ait yedi hidrofobik uzantı tarafından karakterize edilmektedir. Transmembran bölgeleri (TM), üç hücre içi ve üç hücre dışı ilmeklerle (loop) bağlıdır (Şekil2.5). Bu reseptörlerin amino asit terminali hücre dışında bulunur ve glikosillenmiştir. Karboksil terminali ise hücre içindedir ve β_3 reseptörlerde herhangi bir fosforlanmış bölgeye sahip değildir.



Şekil 2.5: Beta 3 Adrenerjik Reseptör yapısı (<http://www.adrenoceptor.com/homemail5.html>)

β reseptör alt tipleri ile karşılaştırmalarda özgün bölgelerin sayılarının sınırlı olduğu ve bunların temelde transmembran segmentlerinde ve hücre içi loopların proksimal bölgelerinde olduğu görülmüştür. β_3 ile diğer türlerin karşılaştırmaları insan, sığır, kemirgen ve köpekgillerde yaklaşık %80-%90 lık yüksek homolojinin varlığını göstermiştir. β_3 sekansları üzerinde yapılan detaylı araştırmalar sonucunda kodon 64'te insanlarda triptofan amino asidinin yerleştiği bu gölgede diğer türlerde arjinin amino asidinin yer aldığı bulunmuştur (<http://www.adrenoceptor.com/homemail5.html>).

Bilgisayar modellemesi, $\beta 3$ ligant bağlama bölgelerini belirlemiştir. Yedi transmembran domaininden en az dördü ligand bağlamak için karakteristiktir. Gerekli amino asitler yönlendirilmiş mutagenез ve fotoafinite ile tanımlanmıştır. Bu bölgeler TM3 te Asp117, bütün biyolojik aminlerin bağlanmasında, TM4te Ser 169, Etanolaminin yan zincirlerindeki hidroksiller ile hidrojen bağı oluşturmak için ; TM5 de Ser 209 ve Ser 212, birçok biyojenik amin reseptörlerde bulunmakta ve katekol yan zincirinin hidroksili ile hidrojen bağı oluşturmak için olduğu düşünülmektedir. TM6 Phe 309 Katekolaminlerin aromatik zincirleri ile etkileşimlerinde görev almaktadır. Üç TM domaini ikisinde Gs aktivasyonunda gerekli Asp83 TM2 ve Tyr 336 yı taşıyan ise TM7 dir. (<http://www.adrenoceptor.com/homemail5.html>).

Bu tez çalışmasının ikinci konusu olan Gilbert sendromunun moleküler değerlendirmesini yapılmadan önce; bu hastalığın klinikte de tanısını koymayı sağlayan yüksek bilirubin oluşumu ve atılımı mekanizmalarının anlaşılması gerekmektedir.

2.9. Kan Doku

Kan dokusu canlı organizmalarda özelleşmiş, hücreler arası maddesi sıvı olan bir dokudur. Kanın esas görevi taşımadır ve birçok maddeyi organlara ve dokulara götürürken aynı zamanda birçok maddeyi buralardan alıp uzaklaştırır. Kan dokusu, plazma ve kan hücrelerinden (kanın şekilli elemanları) meydana gelir. Plazmanın içeriğinde; globulinler, albuminler, inorganik tuzlar ve çeşitli sistemlerden gelen enzimler ve hormonlar vardır.

Kanın şekilli elemanını oluşturan kan hücreleri 3 grupta toplanabilir. Bunlar eritrositler (alyuvarlar =kırmızı kan hücreleri), lökositler (akyuvarlar = beyaz kan hücreleri) ve trombositlerdir (Noyan, 1996).

2.10. Eritrositler

Eritrositle insanda 1 mm^3 kanda ortalama 5 milyon kadar olup, en bol bulunan kan hücreleridir. Değişik canlı gruplarında sayı ve şekil bakımından farklılıklar gösterirler. Alyuvarların yapımı, canlı organizmanın doğumuna kadar geçen sürede vücudun farklı kısımlarında gerçekleştirilir. Fetus'ta hayatın başlangıcında saccus vitellinus'

taki kan adacıklarında; f3tal hayatın 3. ayından 5. ayına kadar karaciğer ve dalakta yapılır. 5. aydan f3tal hayatın sonuna kadar ve t3m hayat boyunca kemik iliği tarafından yapımına başlanır. Eritositlerin asıl g3revleri dokulara oksijen taşımak olup, akciğerlerden aldıkları oksijeni h3crelere g3t3r3rken; h3crelerden aldıkları karbondioksidi de akciğerlere g3t3r3rl3r. Memeli hayvanlar ve insanda eritrosit h3creleri çekirdek, ribozom ve mitokondri taşımaz. B3ylelikle sitoplazmalarına daha fazla hemoglobinin sığdırabilirler. Hemoglobin h3cre ağırlığının 1/3' 3n3 oluşturur. Eritrositler hemoglobin proteinini oluşturarak, fonksiyonlarını gerçekleştirebilmek için gerekli fiziksel dayanıklılığı sağlayacak bir ortam oluştururlar (Noyan, 1996).

2.10.1. Hemoglobin Yapımı

Hemoglobin molek3l3 yetişkin bir insanda kemik iliğinde yapılır. Yapısını oluşturan hem ve globin birbirine uygun g3nl3k miktarlarda yapılır ve 8 gr globin, 280 mg porfirin ve 27 mg demir her g3n yenilenir. Hemoglobin molek3l3n3n yapımında esansiyel amino asitler ve demirin sağlanması esastır. Bu sentezde bakır, piridoksin, B₁₂, folik asit'te yardımcı olarak g3rev alır.

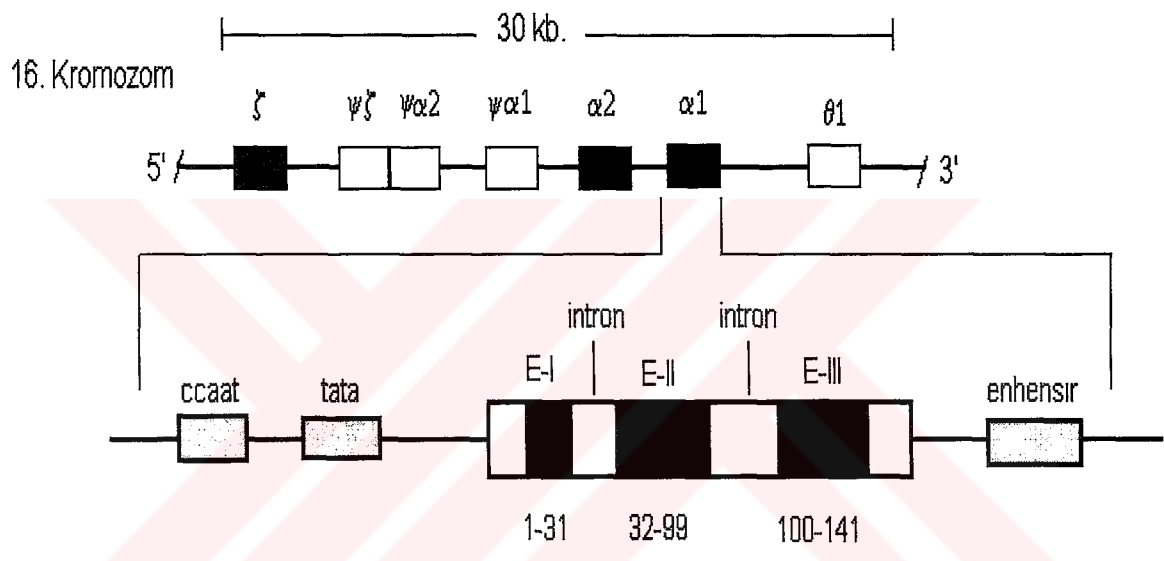
İnsan v3cudunda 4.5 gram kadar demir bulunmaktadır ve bunun b3y3k çoğunluğu hemoglobin yapısının içerisindedir. Demirin bir kısmı depo formda ve 3zellikle ferritin formunda karaciğer, dalak, kemik iliği gibi organlarda bulunur. Gerekli olduğu hallerde hemoglobin sentezi için bu kaynaklara başvurulur. Demir ayrıca miyoglobinin ve bazı enzimlerin yapısına katılmaktadır ancak buradaki demir miktarı hemoglobine kıyasla oldukça azdır (Yenson, 1984; Noyan, 1996).

2.10.1.1. Hem Grubu Oluşum Mekanizması

Olgunlaşmamış eritrositlerin mitokondrilerinde meydana getirilen protoporfirin, demiri ferro halinde ya transferrinin tarafından h3cre zarına kadar getirilenden ya da h3crelerde depolanmış olandan alır. Mitokondrilerde bulunan hem sentetaz ya da ferro katalaz tarafından demir protoporfirin içerisine yerleştirilir (Yenson, 1984).

2.10.1.2. Globinin Oluşum Mekanizması

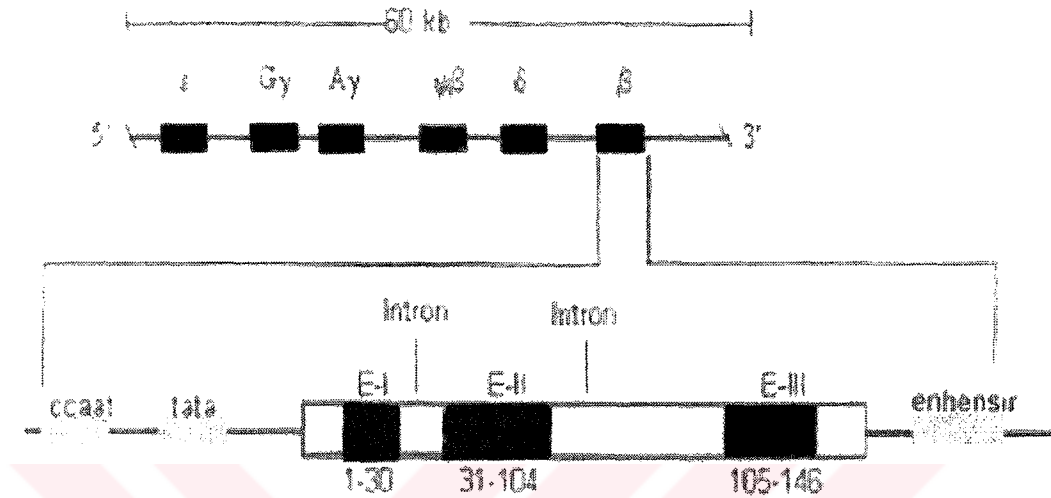
Globin yapısı iki α ve iki β peptid zincirlerinin bir araya gelerek oluşturdukları bir tetramer yapısıdır. α gen kümesi 16. kromozom üzerinde yer alır ve yaklaşık 30 kb büyüklüğündedir (Şekil 2.6). β gen kümesi ise 11. kromozom üzerinde yer alır ve büyüklüğü 60 kb kadardır (Şekil 2.7).



Şekil 2.6: Alfa Gen Kümesi

Globin yapısının oluşumu aşamasındaki farklılığa göre, normal erişkin bir insanda, üç farklı hemoglobin bulunur. İki α ve iki β dan oluşan HbA'nın baskın olmasıyla birlikte; β yerine γ katılımıyla oluşan HbF ve δ zincirini taşıyan HbA₂' de az miktarda kanda bulunur (Sözen, M.M., 2000). HbA'nın ribozomlarda oluşumu sırasında öncelikle α -peptid zinciri yapılır, tamamlanır ve ribozomlardan ayrılır. Tamamlanmış olan α zinciri ribozomda yapılmakta olan bir β -peptid zincirine bağlanır. Daha sonra birlikte ribozomdan ayrılırlar. β zincirinin ribozomlardan ayrılışının α zinciriyle olan ilişkisi, globin yapımı için bir dengeleyici bir sistem olarak çalışmaktadır. α ve β peptid

zincirlerinin birleşerek oluşturdukları dimer yapısı ikinci bir dimer yapısıyla daha birleşerek tetramer yapıdaki globini oluşturur (Yenson, 1984) .



Şekil 2.7: Beta Gen Kümesi

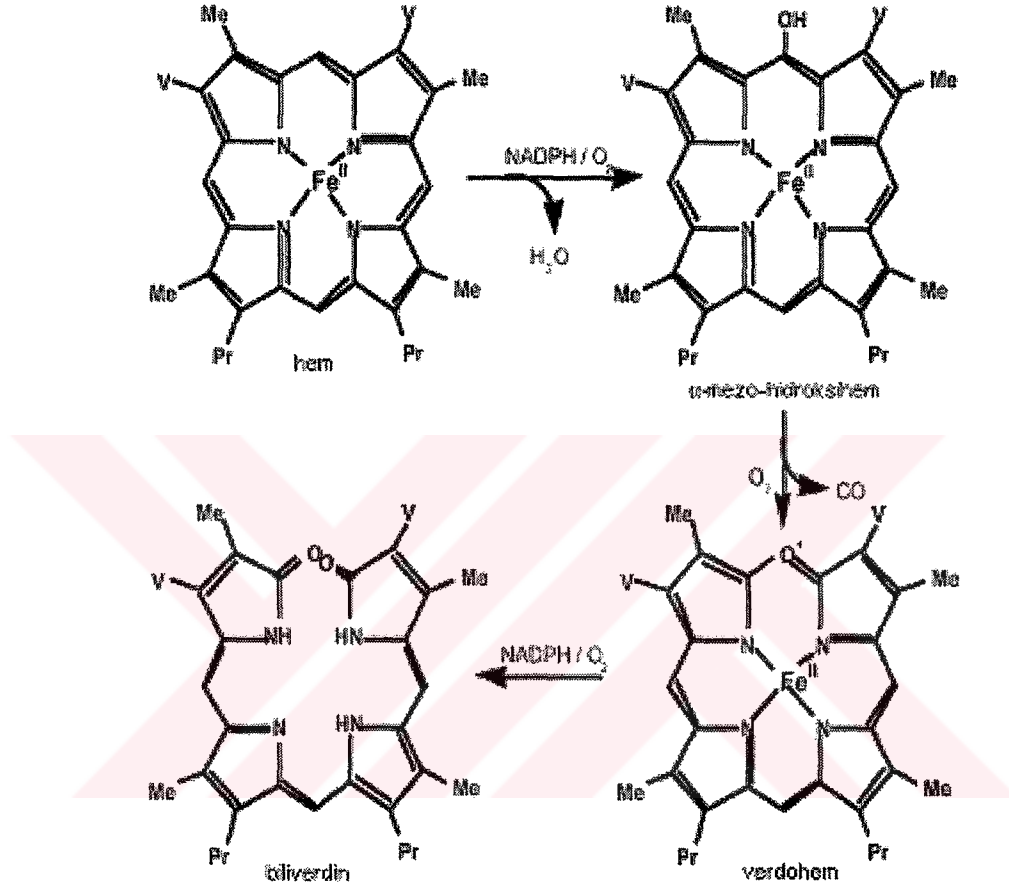
2.10.2. Hemoglobinin Yıkımı

Kemik iliğinden dolaşıma geçişinden 120-130 gün sonra eritrositlerin yaşam süreleri sona erer ve dolaşımdan alınarak bileşenleri degrades edilir. Günlük 6-8 gram hemoglobin sentezini takiben 6-8 gram da hemoglobinin parçalanması gerekmektedir. Buda miktar olarak 300 miligram hem'e denk gelmektedir. Hem'in tekrar kullanılamamasından dolayı öncelikle parçalanması, bunu takibinde dışarıya atılması gerekmektedir. Hem tekrar kullanılamamasına karşın, yapısındaki demir muhafaza edilir. Yaşlanan ve hasarlı olan eritrositler dalak tarafından dolaşım sisteminden uzaklaştırılır. Hemolizis meydana geldiğinde eritrositler parçalanır ve hemoglobin plazma içerisine bırakılır (Baggott , 2002).

Hemolizisin olası nedenleri:

- Eritrosit kırılabilirliği
- Isı yanıkları
- Eritroblastozis fetalis

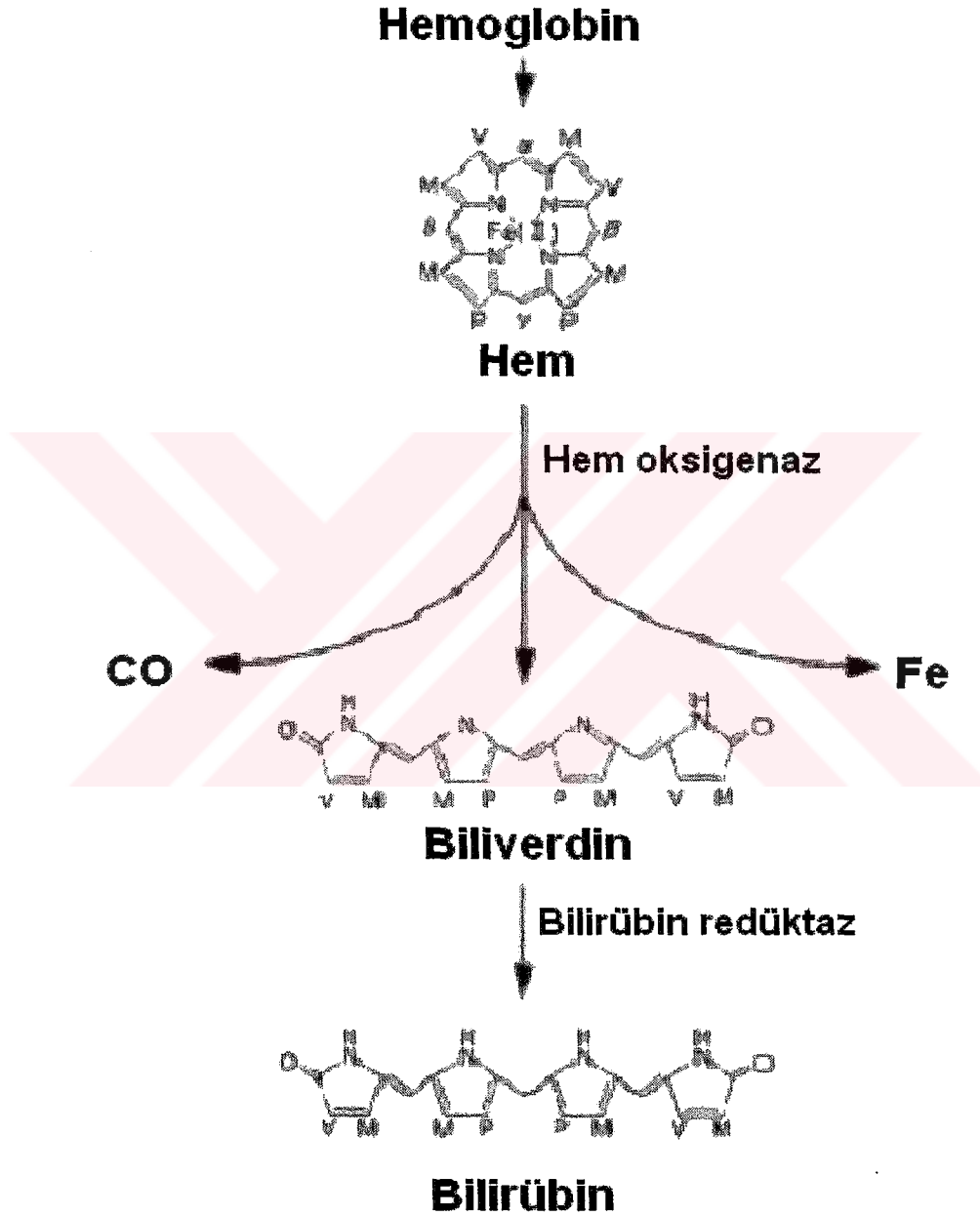
Hem metabolizması hem oksijenaz tarafından oksidatif kırınım ile gerçekleştirilir. Hem oksijenaz enziminin hem grubunu katalizlemesinin ardından iki ara ürün α -mezo –hidroksihemin ve verdohem meydana gelir ve son ürün olan biliverdin oluşur. (Şekil 2.8) (Baggott, 2002).



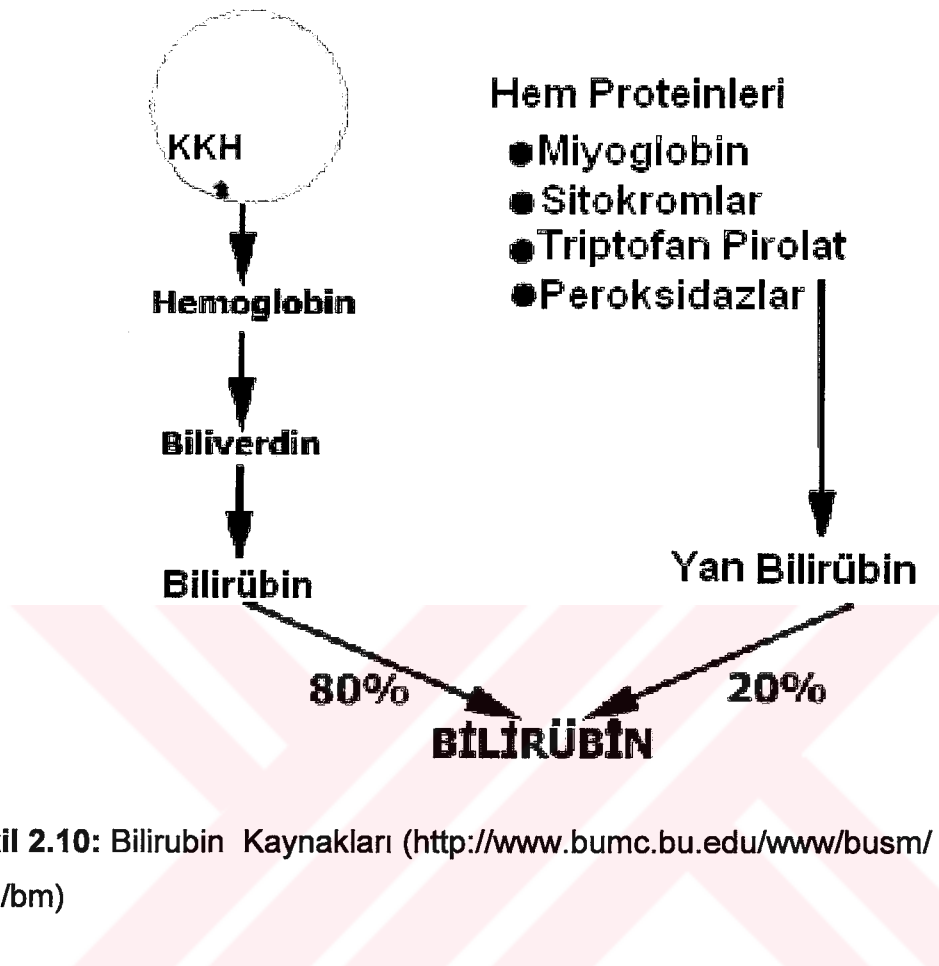
Şekil 2.8 : Hem grubunun biliverdine parçalanması sırasında oluşan ara ürünler (Baggott, 2002).

Bu reaksiyon sırasında porfirinin α metil köprüsü oksitlenerek, alfa metil köprüsünden karbonmonoksit çıkışı olur. Biliverdinin oluşumu sırasında tetrapirrol halka sisteminden ayrılan demir (ferrus) iyonu transferrine bağlanarak demir depolarına veya bazı proteinlerin sentezinde kullanılmak üzere kemik iliğine taşınır. Bu sırada globin ise hücre içi proteazlar tarafından hidrolize uğrayarak yapı taşlarına ayrılır. Biliverdin yeşil renkte düz tetrapirroidür. Her iki ucundaki pirolda de OH grupları bulunmaktadır (Şekil 2.9). Bilirubin redüktaz enzimi, tetra pirol zincirinin

ortasındaki γ metilen köprüsünü yıkarak kırmızı- turuncu renkteki bilirubini oluşturur. Dolaşımdaki bilirubinün % 80'i hem parçalanmasının son ürünüdür. Geriye kalan %20 ise, miyoglobin veya sitokromlar gibi diğer hem proteinlerinden gelir (Şekil 2.10).



Şekil 2.9: Hemoglobinin Bilirubine yıkımı (Baggott, 2002)



Şekil 2.10: Bilirubin Kaynakları (<http://www.bumc.bu.edu/www/busm/cme/modules/hbili/bm>)

Eritrositler normal olarak hem'den bilirubine metabolize edilmek üzere, retiküloendotelyal sistem tarafından dolaşımdan alınır. Hemoglobinin 1 gr'nın parçalanması sonunda 35 mg bilirubin oluşur. Organizmada iki tür bilirubine rastlanır.

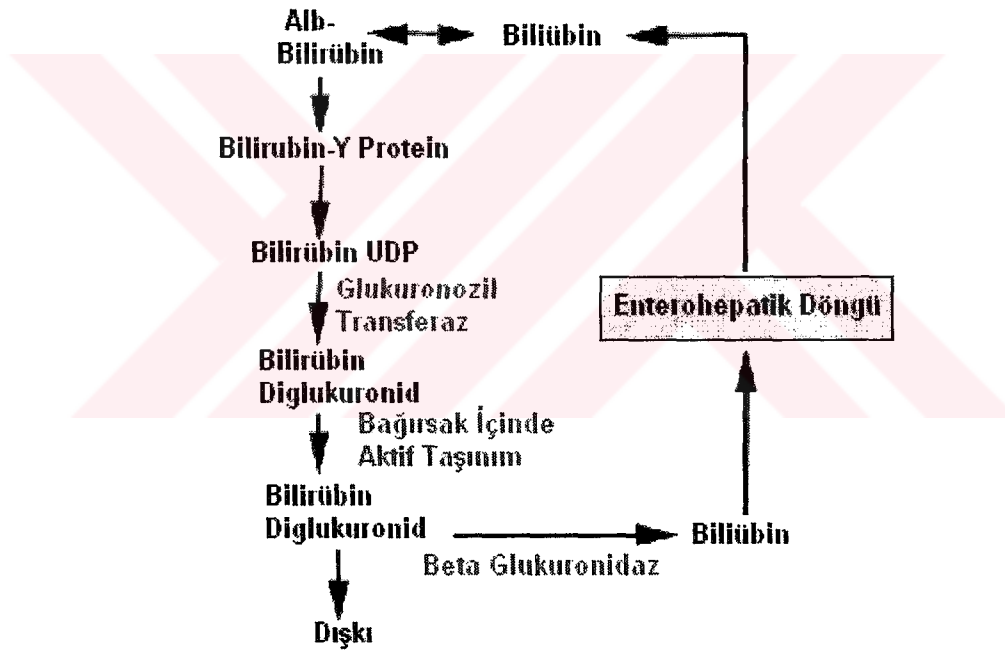
1) Konjuge Olmayan Bilirubin:

Kan serumunda bulunur ve suda çözünmez. Bu bilirubin çeşidi kan serumunda bulunduğu zaman lipitte çözünen bir organik anyon şeklindedir. Büyük bir çoğunluğu serum albumine bağlıdır.

2) Konjuge bilirubin (bilirubin glukotonat veya diglukuronat):

Kanda ya hiç yoktur ya da çok az vardır. Suda çözünür haldedir ve safra ile bağırsaktan atılır.

Bilirubinün yüksek lipid çözünürlüğü; davranışını ve daha sonraki metabolizmasını belirler. Lipid çözünürlüğü bir taşıyıcı tarafından kanda taşınması zorunluluğunu ortaya çıkarır. Fizyolojik taşıyıcısı, hücre membranının lipid tabakasında çözünebilen serum albüminidir. Bilirubin suda çözünür maddelerle birleşmelidir. Bu onun su çözünürlüğünü artırır, lipid çözünürlüğünü düşürür ve atılımını kolaylaştırır. Albumin bilirubini karaciğere taşır. Bilirubin süratle alınır ve hepatositlerdeki bağlama proteinlerine (Y ve Z proteini) transfer edilir. Glukuronozil transferaz daha sonra bilirubin diglukuronid oluşturmak için bilirubinle birleşir (<http://www.bumc.bu.edu/www/busm/cme/modules/hbili/bm>).



Şekil 2.11: Bilirubinün Karaciğer döngüsü

Bu konjugasyon aşaması, bilirubini suda çözünür ve safradan bağırsağa taşınabilir hale dönüştürür. Yeni doğanların kısa bağırsakları, bilirubinün bir kısmını birleşmiş formundan birleşmemiş forma dönüştüren beta- glukuronidaz enzimini taşır. Bu birleşmemiş bilirubin tekrar emilebilir ve intestinal lümeninden dolaşıma dönebilir. Bu, bilirubinün enterohepatik dolaşımı olarak bilinir. Birleşmiş bilirubinün geriye kalan kısmı dışkıya salınır ve tipik sarı renk verir (Şekil 2.11) (Baggott, 2002).

Hepatositler içerisinde bilirubin piropionat yan gruplarıyla glukuronik asit esterleşir. Bu reaksiyon endoplazmik retikulum membranı içinde üridin difosfat glukuronat glukuronozil transferaz enzimi (UDP-Glukuronozil transferaz) tarafından gerçekleştirilir. Reaksiyon sonunda oluşan bilirubin monoglukuronatlar birleşerek bilirubin diglukuronatları meydana getirir. Bir kısım bilirubin aktif SO₄ ile esterleşerek bilirubin- sülfat birleşimini oluştururlar. Bir kısım bilirubin ise birleşmemiş formda kalır. Bilirubin tüm formları karaciğer hücreleri tarafından safra kanalcıklarına salgılanarak safraya karıştırılır ve buradan bağırsağa geçerler. Bağırsaktaki bilirubin kalın bağırsakta bulunan bakteriyel enzimler olan β-glukuronidazlar tarafından glukuronik asit ve sülfat konjugasyonundan sıyrılır. Bilirubin ürobilinojene indirgenir. Kalın bağırsakta ürobilinojenin absorpsiyonu düşüktür. Absorbe olan bu az miktar karaciğer tarafından tekrar safraya atılır. Bir kısımda idrarla vücudu terkeder. Bağırsakla karaciğer arasındaki bu döngü enterohepatik dolaşım olarak adlandırılır. Ürobilinojenin kalın bağırsaktan absorbe olmamış kısmı mikrobiyal enzimler tarafından ster kobiline çevrilerek dışkıyla beraber atılır. (Yenson, 1984; Baggott, 2002).

2.11. Sarılık

Sarılık, dokularda bilirubin depolanması sonucu, deri ve mukozanın sarıya boyanmasıdır. Serum bilirubin düzeyi 2-3 mg arasında olduğu zaman klinik olarak belirgin hale gelmektedir.

Hiberbilirubinemi, bilirubin metabolizmasında meydana gelen bir gitmezliğin sonucu ortaya çıkar. Bozukluğun meydana geldiği yere bağlı olarakta hierbilirubinemi, konjuge ya da konjuge olmayan tipde olabilir (Menteş 1984).

Konjuge olmayan bilirubin artış nedenleri:

- a) Aşırı yapım
- b) Hepatik yakalama azlığı (Karaciğer hücrelerince yakalanma azlığı)
- c) Hepatik konjugasyon azlığı (Karaciğer hücrelerinde konjugasyonun azlığı) şeklindedir. Konjuge bilirubin artış nedeni hepatik atılımdaki bozukluktan dolaydır. Sarılığın patofizyolojik sınıflandırması Çizelge 2.4'te verilmektedir.

Konjuge Olmayan Hiperbilirubinemi	Konjuge Hiperbilirubinemi
Bilirubinün aşırı yapımı	Azalmış hepatik eksresyon
Hemolitik Bozukluklar	Kalitsal
Kalitsal	Rotor sendromu
Akkiz	Dubin – Johnson sendromu
Ineffektif eritropoez	Obstrüksiyon
Defektif hepatik alım	Intrahepatik
Sepsis	Hepatoselüler hastalık
Uzamış açlık (< 300 kal /gün)	Primer biliyer siroz
İlaçlar	İlaçlar
Yenidoğan ve prematüre infantlarda sitoplazmik-bağlayıcı proteinlerin azlığı (Y ve Z)	Ekstrahepatik
Azalmış hepatik konjugasyon	Safra taşları,
Kalitsal	Safra yolları, Pankreas ve Vater ampullası kanseri
Gilbert sendromu	Safra yolları striktürü
Crigner-Najjar sendromu, Tip I ve II	Biliyer atrezi
İlaçlar	Sklerozan kolanjitis
Hepatoselüler nedenler	

Çizelge 2.4 : Sarılığın patofizyolojik sınıflandırması

2.11.1. Doğumsal Sarılık Tipleri ve Yeni Doğanlarda Sarılık

Doğumdan sonra 18 saat içerisinde ortaya çıkan ve 2 haftadan uzun süren sarılıklar muhtemelen patolojiktir. Bunlar;

a-Kernikterus: Kanda çok miktarda konjuge olmamış bilirubin vardır. Birleşmemiş bilirubin lipidlerle bağlanarak, yağca zengin beyin dokusunda toplanır. Klinik özellikleri kusma, kas tonusunda artma, halsizlik, siyanoz ve sonunda solunum yetersizliğidir. Zamanında doğanlarda 5 gün içerisinde ölüm; prematüre doğanlarda ise 5-10 gün içerisinde ölüm gerçekleşir. Ölümün gerçekleşmediği vakalarda ileriki günlerde nörolojik bozukluklar görülür (Palmer, 1983).

b- Fizyolojik Sarılık: Glukuronozil transferaz enziminin aktivitesinin normal düzeye gelinceye kadar geçen sürede meydana gelen sarılıktır. Fetüste konjuge olmamış bilirubin, plasenta membranından anne kanına geçerek uzaklaştırıldığından fetüste konjugasyon gerekli değildir. Bu nedenle doğumda sarılık görülmez. Yenidoğanların % 25'inde 24 saatten önce farkedilir ve 5 gün en yüksek seviyesine ulaşır. 9 ve 14. günler arasında da kaybolur (Palmer, 1983).

c- Menadione Sarılığı: Doğum esnasında, anneye intravenöz olarak verilen yüksek K vitamini benzerleri; prematürelere erken hiperbilirubinemiden sorumlu olabilir (Palmer, 1983).

d- Anne Sütü Sarılığı: Anne sütüyle beslenen bebeklerde, uzun süre kanda konjuge olmamış bilirubin seviyesinin yüksek kalması bazı durumlarda sütteki glukuronozil transferaz inhibitörü (pregnenediol) nedeniyledir. Sarılık bebeğin yaşamının 2-4 haftaları arasında belirir ve emzirmeye devam edilirse 2 ay kadar sürebilir (Palmer, 1983).

e- Byler Hastalığı: İntrahepatik kolestaz ve konjuge bilirubin ile safra tuzlarının hepatositler içerisinde taşınmasında bozukluk vardır (Palmer, 1983).

f- Lucey-Driscoll Sendromu: Glukuronosil transferaz inhibitörü varlığı nedeniyle konjuge olmamış bilirubin seviyesi oldukça yükselir (60 mg / 100 ml). Kan değişimi yapılmazsa bebekte kernikterus ortaya çıkar (Palmer, 1983).

g- Crigner-Najjar Hastalığı: Kalıtsal, hemolitik olmayan hiperbilirubinemidir. Kernikterus çabuk gelişir. Glukuronozil transferaz enzimini kodlayan gendeki mutasyonlar nedeniyle enzim işlevindeki bozukluk sonucu ortaya çıkan hiperbilirubinemidir. Konjuge olmayan bilirubin düzeyi 50 mg/100 ml veya daha yüksektir. Safrada bilirubin azdır. Feçeste ürobilinojen düşüktür (Aktan, 1988).

h- Gilbert Hastalığı: Kalıtsal konjuge ve hemolitik olmayan hiperbilirubinemidir. Glukuronozil transferaz enziminin aktivitesinin bozulması sonucu ortaya çıkar. Crigner-Najjar sendromuna nazaran vakaların hastalığı hafif seyreder. Hastalarda yorgunluk, dispepsi, dalgalanan hafif sarılık belirtileri gözlenir (Aktan, 1988).

l- Dubin- Johnson (Sprintz- Nelson) Hastalığı: Sarılık 12-15 yaşlarında başlar. Daha çok birleşmiş olmakla birlikte her iki bilirubin de artar. Senelerce süren dalgalanan sarılık, bitkinlik, bulantı ve ağrılar gözükür. Otozomal dominant geçiş gösterir (Aktan, 1988).

i-Mavero-Hepatik: Dubin-Johnson hastalığının tüm özelliklerine ilaveten melanüri görülür (Palmer, 1983).

j- Rotor Sendromu: Hemolitik olmayan, Dubin-Johnson hastalığının başka bir şeklidir. Hastalarda serbest ve konjuge bilirubin miktarında artış söz konusudur. Karaciğer anatomisi tamamiyle normaldir. Karaciğerde normal dışı bir pigmentasyon gözlenmez. Hepatomegali yoktur (Aktan, 1988).

k- Dev Hücreli Hepatit: Çeşitli karaciğer hasarlarına karşı oluşan, spesifik olmayan bir reaksiyondur. 40 veya daha fazla nukleuslu dev sitoplazmik kitleler görülür. Hepatositlerin kaybolmasıyla karaciğerin hücre dizisi bozulmuştur. Hemosiderin

hepatositlerde birikir. Bebek ancak birkaç gün yaşayabilir. Sonlara doğru siyanoz belirgindir (Palmer, 1983).

l- Galaktozemi: Fosfogalaktozürütil transferaz enziminin bozukluğu ya da eksik sentezlenmesi nedeniyle galaktoz-1-fosfat birikimiyle sonuçlanan kalıtsal bir hastalıktır. Tüm sorun süt içmeye bağlıdır. Karaciğer biyopsisinde; hepatositlerde şişme, ince vakuolleşme ve dejenerasyon vardır. Proteinüri ve aminoasidüri her zaman vardır. Hastalarda iştahsızlık, kusma, diyare ve kilo kaybı sık görülen belirtilerdir. Sarılık erken ortaya çıkar ve sarılıkla ilerleyen hepatomegali görülür. Hastaların % 50' sinde katarakt gelişimi gözlenir (Palmer, 1983).

m- Von Gierke Karaciğer Glikojen Depo Hastalığı: Karaciğer hücrelerinde glikojen birikimi sonucu, beslenme bozukluğu olan, bebek yüzlü, gelişmesi geri kalmış hepatomegalili çocuklar görülür. Hepatositler vakuollüdür ve granüllü madde içerir. Hiperkolesterinemi, hiperlipidemi, asidoz ve asetonüri, yağ ve lipid metabolizması hızlandığı için görülebilir. Açlık kan şekeri düşüktür (Palmer, 1983).

n- Mauriac Sendromu: Diyabet, cücelik, hepatomegali, karaciğer ve böbreklerde aşırı glikojen depolanması söz konusudur. Jejunumda villus atrofi vardır (Palmer, 1983).

o- Primer Hemokromatozis: Bağırsağın blok mekanizmasının ortadan kalkması sonucu demir emilimi artar ve vücutta demir depolanır. Dokularda 20-60 gr demir birikir (normal 3.5-4 gr). Portal siroz gelişir. Karaciğer çok büyür ve hepatoma oluşur. Genellikle hastalık ilk olarak orta yaşta farkedilebilir. Hasta 20 yaşından küçükse bu hastalık nadiren düşünülebilir (Palmer, 1983).

ö- Wilson Hastalığı: Bakır ve amino asit metabolizmasında bozukluk vardır. Seruloplasmin düşük yapılmasıyla birlikte bakırın aşırı emilimi söz konusudur. Hastalığın ilk belirtisi 15-20'li yaşlarda karşılaşılan ekstrapiramidal nörolojik bozukluklardır. Vakaların %35'inde ilk olarak saptanan karaciğer hastalığıdır. Hastalık iki şekilde seyreder. Birincisinde; 4 yıl içinde ölüme sonuçlanan akut ateşli şekil ve ikincisindeyse; daha kronik seyirli devam eden (sonunda ölüme biten) psödosklerotik

şekildir. Laboratuvar bulgularında, daima aminoasitüri, serumda seruloplasmin, feçeste bakır azalması ve idrarda bakır artması vardır (Palmer, 1983).

p- Polikistik Hastalık: Hastaların çoğunda portal hipertansiyon ve varisler gelişmiştir. Karaciğer parenkiminde küçük, normal dışı safra kanallarının gruplaşması nedeniyle hastalık ortaya çıkar. Yıllar boyunca kistler yavaş yavaş büyürler. Hastalar orta yaşta ve şikayetler karaciğerin büyüklüğüne ve ağırlığına aittir (Palmer, 1983).

r- Doğumsal Fibrozis: Portal alanlarda fibrozis bulunur; fazla sayıda ufak safra kanalları görülür. Polikistik hastalığın bir şeklidir (Palmer, 1983).

s- Caroli Hastalığı: Doğumsal hepatik fibrozle beraber karaciğer kanallarının kese şeklinde genişlemesi söz konusudur. Safra taşı ve kolanjit insidensi yüksektir (Palmer, 1983).

ş- Alfa₁ Antitripsin Eksikliği: İleri derecede alfa₁ antitripsin eksikliği bulunan çocuklarda birinci yıl içerisinde karaciğer hastalığının belirtileri görülür. Neonatal hepatit, hepatomegali ve splenomegali bulunur. Doğumdan sonra birkaç ay içerisinde ölüm görülebilir. (Palmer, 1983).

2.12. Gilbert Sendromu ve Moleküler Temeli

Gilbert ve arkadaşları tarafından ilk defa yirminci yüzyılın başlarında tanımlanmıştır. (Batman, 1993). Bu sendromda orta ve hafif bir hiperbilirubinemi söz konusu olup bilirubinüri yoktur. Karaciğer testleri normaldir. Sendrom, bilirubinin, glukuronik asit ile birleşmesinden sorumlu UDP- glukuronozil transferaz enziminin sentez düzeyindeki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Serum bilirubin konsantrasyonu 3 mg/dl düzeyinde olup daha yüksek değerlerde rastlanılabilir. Bilirubin düzeyindeki yükselmelere stres, ateşli enfeksiyon hastalıkları, alkol alımı, aşırı efor, yorgunluk ve açlık gibi durumlar yol açabilir (Aktan, 1988).

2.12.1. UDP- Glukuronozil Transferaz Enzimi

Glukuronidasyon, küçük lipofilik moleküllere glukuronik asidin kovalent olarak eklenmesi mekanizmasıdır. Bu reaksiyon, hem içten gelen hem de dışarıdan gelen

yabancı kimyasalların biyo-inaktivasyonları ve eliminasyonlarını sağlayan önemli bir işlemdir (Makhenzie, 1997). Bilirubin, steroidler, morfin, zidovidin ve parasetamol içeren bazı terapötik ilaçlar bu yolla önemli derecede temizlenirler. Glukuronidasyon birinci derecede bir detoksifikasyon işlemiyse de, karboksilik asit gurubu içeren bazı ilaçlar , steroidal olmayan anti- inflamatuvar ajanlar gibi, glukuronidasyon ile proteinler ve diğer hücrel makromoleküllere bağlanarak daha reaktif ürünlere dönüşebilirler. Bu reaksiyonları katalizleyen UDP-glukuronozil transferazlar, doku özgüllüğü gösteren, endoplazmik retikulumda bulunan bir multienzim ailesidir. Bu enzimlerin bir çoğu karaciğerde bulunurken bir kısmında burun epitelyumu (UGT2A) ve gastrointestinal yolda (UGT1A8 ve UGT1A10) bulunur. UGT enzimlerinde meydana gelebilecek polimorfizmler, enzimin katalitik etkinliği ve ekspresyon düzeyini etkileyebileceğinden dolayı kimyasal toksiteye sebep olma açısından önem taşırlar (Jedlitschky et al.,1999).

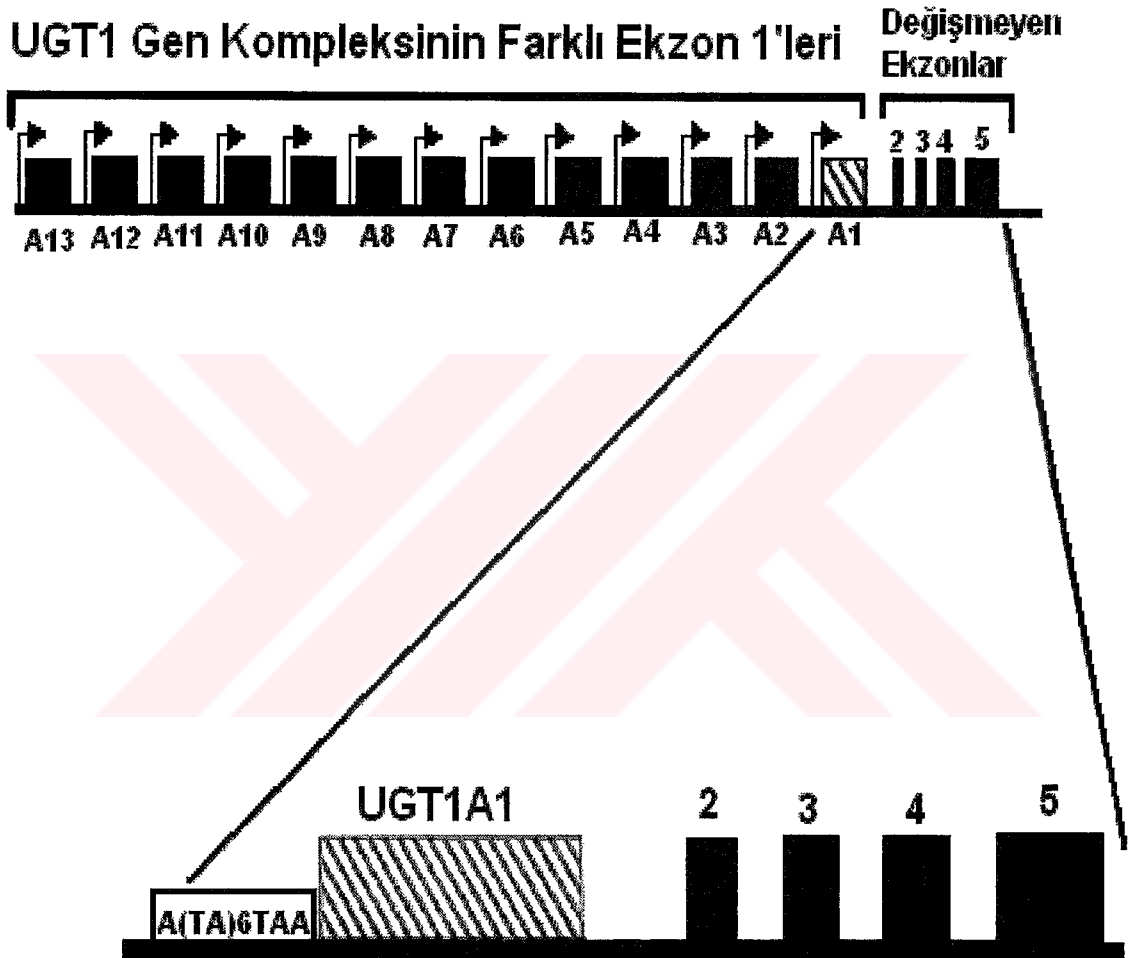
2.12.2. UDP- Glukuronozil Transferaz Gen Ailesi

Bu güne kadar 25 insan UGT geni tanımlanmış ve sekans benzerlikleri göz önüne alınarak iki aile içerisinde toplanmıştır (Tablo 2.13). UGT genlerinin 16 tanesinin fonksiyonel bir proteini kodladığı bulunmuştur. Günümüze kadar yapılan çalışmalar, her bir UGT'nin geniş oranda substrat glukuronidasyon kapasitesine sahip olduğunu ve bir bileşiğin birçok UGT enzim çeşidi tarafından glukuronidize edilebileceğini göstermiştir. Bu üstüste çakışan substrat özgüllükleri ve UGT özgül problemlerin eksikliği her bir UGT çeşidinin görevinin tespiti için yapılan çalışmaları zorlaştırmaktadır (Mackenzie et al., 2000).

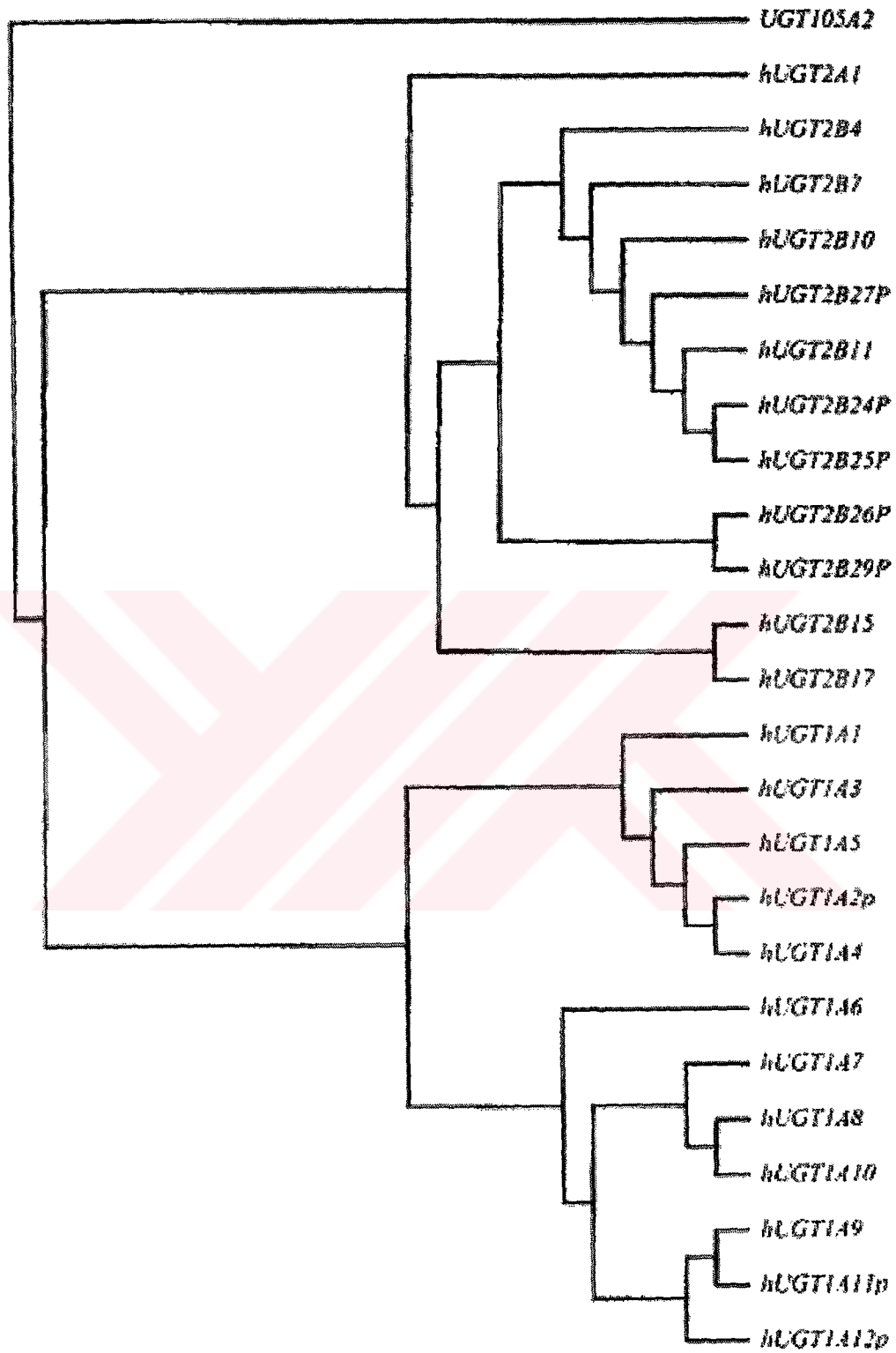
2.12.3 UGT1 Gen Yapısı

Farklı UGT1 izoformlarını kodlayan UGT1 geni, dört ortak (ekzon 2-5) ve UGT izoformlarını kodlayan 13 değişken ekzonu içeren kompleks bir yapıya sahiptir (Şekil 2.14). Gen lokusu bölgesel olarak ayrılmış ve insan 2q37'de fiziksel olarak haritalanmıştır. İzoformların sentezi sırasında sabit ekzonların yanısıra değişkenler içerisinde özgün olanın mRNA splayı gerçekleştirilir (Mackenzie et al., 2000). UGT1 gen kompleksinde meydana gelen genetik bozukluk sonucu ortaya çıkan sarılık tiplerinden Crigler Najjar tip I en şiddetlisi olup, çoğu mutasyonu terminasyon

(sonlandırma) ve çerçeve kayması şeklinde 2. kodon ve 5. kodon arasındadır. Fenobarbital terapiyle tedavi edilebilir tip II Crigler Najjar sendromu tip I'e nazaran daha az şiddetlidir. Gilbert sendromu en yaygın olanı olup (%2-19 farklı populasyon çalışmaları) bu üç sendromun en ilimlisidir (Clarke et al., 1997).



Şekil 2.12: UGT gen kompleksi (Clarke et al., 1997)



Şekil 2.13: UDP Glukuronozil Transferaz Gen Ailesi (Mackenzie et al., 2000)

2.13. Gilbert Sendromu ve UGT1A1 Promotor Bölgesi Varyasyonu

UGT1A1 promotorundaki düzenleyici TATA kutusunda bir TA insersiyonu, Gilbert'li hastalardaki hiperbilirubinemi ile ilişkilidir (Bosma et al.,1995). Genel populasyon taramasında serum bilirubin ve UGT1A1 TATA promotor genotipi arasındaki ilişki tespit edilmiştir. Güney İskoclarda ve Igloodik Kanadalılarında yapılan çalışmalarda sırasıyla %10-13 ve %17-19 TA insersiyon genotipine sahip oldukları bulunmuştur. Toplamda bu populasyonların %41 -51'i heterozigottur (Clarke et al., 1997). UGT1A1 geninin promotorundaki değişik TA tekrarlarının frekansı, beyaz populasyonları ile karşılaştırıldığında Afrika populasyonundan daha yüksek; Asya populasyonundan ise daha düşüktür. Afrika populasyonu TA tekrar dizi uzunluğu açısından da diğer populasyonlara göre değişkenlik göstermektedir. Afrika populasyonunda TA 8 tekrarı diğer populasyonlara nazaran daha yaygın olarak görülmektedir (Tsezou et al., 2000) . Gilbert sendromuna yol açan UGT1A1 genindeki polimorfizimle hayatın ilk 2 günü süresince neonatal sarılığın hızla yükselmesi, kalıtsal sferositosizli kişilerde gelişen safra taşı, G₆PD ve heterozigot β talasemili hastalardaki hiperbilirubineminin oluş derecesindeki artışla ilişkilendirilmektedir (Sampietro et al., 1997).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. İncelenen Örneklerin Toplanması

Bu çalışma kapsamında toplanan kan örnekleri, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları A.B.D. ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Pediatrik Hematoloji Bölümü'ne gelen kişilerden alınmıştır.

ADRB3 genindeki polimorfizmin araştırılması amacıyla 155 obez ve 116 normal bireye ait kan örnekleri toplanmıştır. Bu bireylere ait vücut kitle indeksleri hesaplanmış ve aile hikayeleri alınmıştır. VKİ ≥ 30 'un üzerinde ve ailesel obezite hikayesi olan bireyler hasta grubu, VKİ ≤ 25 olan bireyler kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir.

UDP glukuronozil transferaz genindeki TA insersiyon polimorfizminin frekansının belirlenmesi amaçlı çalışmada, seçilen hastaların serum bilirubin düzeylerine bakılarak; 3g/dl'nin üzerindeki 45 hasta birey ve 2g/dl'nin altında olan 21 normal bireye ait kan örnekleri toplanmıştır. Çalışmaya alınan tüm hastaların karaciğer fonksiyon testleri normal olup yalnızca serum bilirubin düzeyleri yüksektir.

Çalışma kapsamında yer alan her bireyden yaklaşık 4-5 ml periferik kan örneği antikoagulant madde olarak EDTA içeren tüplere alınıp, genomik DNA izolasyonları gerçekleştirildi.

3.2. Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Yen ve arkadaşlarının geliştirdiği DNA izolasyon yöntemi modifiye edilerek genomik DNA izolasyonu yapıldı (Yen et al., 1992).

1- 400 μ l kan 1.5 ml'lik ependorf tüp içerisine alındı.

2- Kan örneği TE tamponu ile 1 ml'ye tamamlandı.

TE Tamponu

10 mM Tris

1 mM EDTA pH: 7.6

3- 13000 rpm'de 1dakika santrifüj edildi.

4- Üst kısımdaki süpernatant atıldı ve üzerine tekrar TE tamponu eklendi. Bu işlem üç kez tekrarlandı.

5- Üstteki süpernatant atıldıktan sonra pelette toplanan akyuvar tabakası üzerine lizis tamponu ilave edildi. Son hacim TE tamponu ile 500 µl'ye tamamlandı.

Lizis Tamponu

1 M NaCl 90 µl

%10 Sodyum dodesil sülfat 80 µl

10 mg/ml Proteinaz K 5 µl

6- Tüpler 56 °C de 2 saat inkübasyona bırakıldı.

7- Tüplerin üzerine eşit hacim fenol- kloroform (1:1) ilave edildi.

8- Tüpler iyice karıştırılarak 10 dakika buz içerisinde bekletildi.

9- Tüpler tekrar karıştırıldı ve 3000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Bu işlem ile hücresel artıkların çökerek DNA'dan uzaklaştırılması sağlanır.

10- Üstte kalan berrak kısım temiz bir tüp içerisine alındı.

11- Üzerine % 100'lük etil alkol ilave edildi ve tüpler nazikçe çalkalanarak DNA çöktürüldü.

12- % 100'lük etil alkol uzaklaştırılarak üzerine % 70 lik etil alkol ilave edildi.

13- % 70 lik etil alkol ortamdaki uzaklaştırdı ve tüplerden alkolün tamamıyla uçması için birkaç dakika beklendi.

14- Alkolün tüp içerisinde tamamıyla uçtuğundan emin olduktan sonra üzerine 200-300 µl steril distile su konularak DNA'nın çözülmesi sağlandı.

3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), bir gen ya da DNA bölgesinin; bu bölgeye ait kalıp ve uygun primerler yardımıyla in vitro olarak çoğaltılması işlemidir. Kary Mullis ve arkadaşlarınca (1986) ortaya atılan; Saiki ve arkadaşlarınca (1988) geliştirilen bu yöntem, çok değişik kaynaklardan izole edilen DNA materyalinin belirli bir kısmının çoğaltılmasını sağlamaktadır.

Polimeraz zincir reaksiyonun her basamağı 3 evreden oluşmaktadır.

a) Denatürasyon :

Çift sarmal DNA bu aşamada yüksek sıcaklığa maruz kalınca, sarmalları bir arada tutan hidrojen bağları açılarak tek sarmal DNA haline geçer.

b) Primerlerin bağlanması (annealing):

Çoğaltmak istediğimiz bölgeye spesifik primer adını verdiğimiz oligonükleotidler DNA tek sarmalı üzerinde komplementer oldukları bölgelere bağlanır.

c) Primerlerin uzatılması (Extention):

PZR reaksiyon karışımı içerisinde yer alan dNTP, MgCl₂ ve Taq polimeraz enzim tamponu, Taq polimeraz enziminin spesifik primerin bağlı olduğu kalıp DNA'yı, 70-75 °C arasında bir sıcaklıkta çoğaltması için gerekli tüm maddeleri içermektedir. Kalıp DNA'ya bağlı primerler enzim tarafından bu maddeler kullanılarak uzatılır. Yeni oluşan sarmal bir sonraki döngü için kalıp görevi görür (Saiki et al., 1988).

a) ADRB3 geninin PZR ile çoğaltılması:

ADRB3 geni kodon 64 Trp-> Arg değişiminin saptanması için yapılacak amplifikasyonda kullanılacak primerlere ait diziler aşağıda verilmiştir.

ADRB3 F (direkt) 5' –GCGCCAATACCGCCAACACC – 3'

ADRB3 R (revers) 5' TCCACCGAGGTCCACAGCTCG –3'

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan reaksiyon karışımı :

1 Örnek , 100 µl toplam hacim için ;

10 X Reaksiyon Tamponu	10 µl
25 mM dNTP karışımı	0,6 µl
ADRB3 F (100 pmol/ µl)	1 µl
ADRB3 R (100 pmol/ µl)	1 µl
DMSO (% 5)	5 µl
dH ₂ O	83 µl

Kalıp DNA 4 µl olacak şekilde hazırlandı.

Reaksiyon başına 0.5 µl (2.5 ünit) Taq DNA polimeraz kullanıldı.

Uygulanan PZR programı :

94 °C	45"	}	30 döngü
64 °C	45"		
72 °C	1' 30"		
72 °C	7'	}	1 döngü

Bu amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünün boyu 286 bç dir.

b) UGT1A1 geninin PZR ile çoğaltılması:

UGT1A1 geni, promotorunda bulunan TA tekrarlarını içine alacak şekilde 243 bç. boyunda çoğaltılmıştır. Bunun için kullanılan primerlere ait diziler şu şekildedir.

UGT 1 SD (direkt) 5'– AAGTGA ACTCCCTGCTACC – 3'

UGT1 SR (revers) 5'– AACAGTATCTTCCCAGCATG – 3'

Polimeraz Zincir Reaksiyonu için kullanılan reaksiyon karışımı :

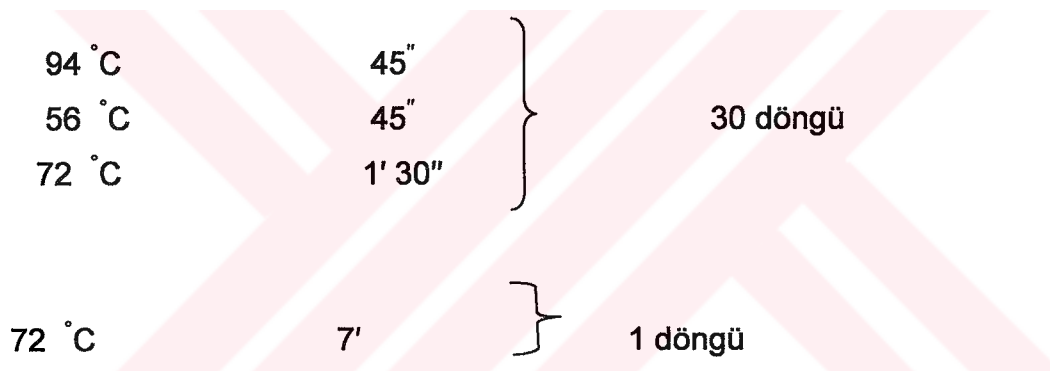
1 Örnek , 100 µl toplam hacim için ;

10 X Reaksiyon Tamponu	10 µl
25 mM dNTP karışımı	0,6 µl
UGT 1 SD (100 pmol/ µl)	1 µl
UGT1 SR (100 pmol/ µl)	1 µl
dH ₂ O	88 µl

Kalıp DNA 4 µl olarak olacak şekilde hazırlandı.

Reaksiyon başına 0.5 µl (2.5 ünit) Taq DNA polimeraz kullanıldı.

Uygulanan PZR programı :



Bu amplifikasyon sonrasında elde edilen ürünün boyu 243 bp dir.

Amplifikasyon ürünleri %1 lik 1 X TBE ile hazırlanmış agaroz jelde kontrol edildi.

10 X TBE: 0.9 M Tris, 9 M Borik asit, 20 mM EDTA, pH 8.3

3.4. Restriksiyon Parça Boyu Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) Analizi

DNA'yı özgül bölgelerden tanıyarak kesen restriksiyon enzimleri moleküler genetikte yaygın olarak kullanılmaktadır. DNA örneklerinin bu enzimlerle kesilmesi sonucunda farklı uzunluklarda DNA fragmentleri oluşur. Bu fragmentler restriksiyon parça boyu polimorfizmi olarak adlandırılır.

ADRB3 genindeki polimorfizmin taranmasında Mva I (Bst NI) restriksiyon enzimi kullanıldı. Enzimin tanıma dizisi CC↓ (A/T) GG dir.

Amplifikasyon ürünleri Mva I enzimiyle ticari firmanın önerdiği koşullar ile kesildi .

Kesim reaksiyonu tüp içerisinde;

22.5 µl PZR ürünü

2.5 µl 10 X Mva I Tamponu

5 U Mva I Enzimi olacak şekilde hazırlandı.

Reaksiyon, 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda kesim örneklerine 6X durdurma tamponu ilave edilerek reaksiyonlar durduruldu.

6X durdurma tamponu: %0,25 brom fenol mavisi ve %40 (w/v) sükröz çözeltisi

3.5. Restriksiyon Endonükleaz Enzimi Kesim Örneklerinin Nondenatüre Edici Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi ile Kontrolü

Mva I enzimi ile kesim sonucu elde edilen DNA fragmentleri, nondenatüre edici poliakrilamid jele yüklenerek bant paternleri incelendi.

Poliakrilamid jel, akrilamid ve N-N'- metilen bisakrilamidin polimerleşmesiyle meydana gelir. Polimerleşme reaksiyonunda akrilamid molekülleri yanyana bağlanarak düz zincirler oluştururken; bisakrilamid molekülleri ise akrilamid molekülleri ile çapraz bağlanarak ağa benzer bir yapı oluşturur. Jelin ayrıştırma gücü akrilamid ve bisakrilamid oranlarıyla belirlenir.

Mva I enzimi ile kesilen PZR örneklerine ait fragmentler %6'lık poliakrilamid jel kullanılarak ayrıştırılmıştır. Jel aşağıda verilen oranlarda hazırlandı.

Akrilamid	1.44 g
Bisakrilamid	0.075 g
10 X TBE tamponu (ph 8.3)	2.5 ml

Son hacim 25 ml olacak şekilde distile suyla tamamlanarak çözüldü . Karışım süzüldü ve havası alındı. 6 µl TEMED (N,N,N',N' – tetramethylenediamine) ve 300 µl % 10'luk amonyum persülfat eklenerek elektroforez camlarının arasına döküldü. Jelin polimerleşmesi için 40 dakika beklenildi. Jel polimerleştikten sonra camlar elektroforez tankına yerleştirilerek 120 volt akımda 15 dakika ön yürütme yapıldı. Herbir kuyucuğa 7 µl (25 µl kesim ürünü + 2.5 µl 6 X durdurma boyası) yüklenerek 120 volt akımda 50 dakika elektroforez uygulandı. Elektroforez sonrası jel, etidyum bromür ile boyanarak UV ışığında oluşan kesim fragmentleri incelendi.

3.6. Denatüre Edici Poliakrilamid Jelde UGT1A1 Genindeki Tekrar Sayılarının Tespiti

UGT1A1 genindeki TA insersiyonu % 6'lık denatüre edici poliakrilamid jel kullanılarak tespit edilmiştir.

a) Kullanılacak Camların Hazırlanması:

Kullanılacak camlar önceden iyice yıkanıp etanol ile temizlendikten sonra camlardan birine jelin cama yapışmasını sağlayan yapıştırıcıdan (Bind Slane) 600 µl, camın üzerine eşit biçimde dağıtıldı. 10 dakika sonra cam alkol (etanol) ile 3 ila 4 defa silindi.

Elektroforezde kullanılacak diğer cama ise 20 µl kayganlaştırıcı madde (sigma coat) dökülerek cama homojen şekilde sürüldü.

% 6' lık denatüre poliakrilamid jelin hazırlanması

100 ml jel için

Akrilamid	5.7 g
Bisakrilamid	0.3 g
Üre	45 g

10X TBE tampon	10 ml
dH ₂ O	80 ml karıştırılarak çözüldü.

Jel çözüldükten sonra son hacim 100 ml'ye tamamlandı ve süzülerek havası alındı. Jeli camlar arasına dökmeden hemen önce 600 µl amonyum persülfat (APS) (0,1 gr/1ml) ve 45 µl TEMED eklenerek karıştırıldı. Hazırlanan camların arasına hava kabarcığı kalmayacak şekilde dökülerek polimerleşmesi için en az 45 dakika beklendi.

Jele Yüklenecek Örneklerin Hazırlanması:

7 µl PCR ürünü, 2 µl formamidli boya (denatürasyon sonucu açılan DNA zincirlerinin tekrar birleşmesini engellemektedir) ile karıştırıldı. Yüksek miktarda boya, örneklerin yürümesi sırasında jelde sürtünmeye neden olmaktadır. Bu nedenle boya miktarı jelde en iyi sonucu veren miktarı bulana kadar düşürülmüştür. Örnekler 95 C°'de 4 dakika denatüre edildi. Örnekler bekletilmeden buza alındı. Denatüre edilen örneklerden 5 µl jele yüklenerek 30 mA sabit akımda 5 saat yürütüldü. Elektroforez sonrası örneklerin gözlenebilmesi için gümüş boyama metodu kullanıldı.

Gümüş Nitrat ile Boyama :

1- Elektroforez işleminden sonra jel % 10 luk asetik asit çözeltisine alınarak 15- 20 dakika bu çözelti içerisinde bekletildi. Kullanılan asetik asit çözeltisi atılmayarak boyama sonunda reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

2- Fiksasyon işlemi sonrasında jel, asetik asit tamamıyla uzaklaşacak şekilde, distile su ile yıkandı.

3- Jel, gümüş nitrat çözeltisi (3 gr/lt) içerisine alındı. 20 dakika bu çözelti içerisinde bekletildi.

4- Gümüş nitrat dökülerek distile su ile kısa bir yıkama işlemi yapıldı.

5- Sodyum karbonat (45gr/lt) çözeltisine alınarak bantların gözle görünür hale gelmesi sağlandı.

6- % 10' luk asetik asitle boyama işlemi durduruldu.

Distile su ile yıkanarak asetik asitte uzun süre beklemenin jelde vereceği sararma engellenir.

3.7. DNA Dizi (Sekans) Analizi

Denatüre edici poliakrilamid jelde TA tekrar sayıları belirlenen örnekler, DNA dizi analizi tekniği ile tekrar incelenerek daha önce elde edilen sonuçlar doğrulanmıştır.

Zincir sonlandırma metoduyla, nükleotid dizilerini belirlemek için, Amersham T7 Sequenase kiti (T7 Sequenase PCR product sequencing kit / Amersham International) kullanıldı (Sanger, 1977).

Sekans reaksiyonunda, sekansı yapılacak diziye özgü primerler kullanılarak tek zincirli DNA kalıpları uzatılır. Reaksiyon karışımı içerisinde bulunan ve serbest 3' OH grubu taşımadığı için zincir uzamasını engelleyen nükleotid analoglarının (dideoksi nükleotid trifosfat, ddNTP) zincire eklendiği noktada uzama durdur. Dört ayrı dNTP (ATP,CTP,GTP,TTP) ve ddNTP'nin (ddATP,ddCTP,ddGTP,ddTTP) kullanıldığı reaksiyon tüplerinde sequenase enzimi tarafından katalizlenen reaksiyon, ddNTP'nin yapıya girdiği noktada durur. Sekans işlemi tamamlandığında içerisinde EDTA ve formamidli boya bulunan boya ile reaksiyon durdurulur .

UGT1A1 geni promotor bölgesine ait DNA dizi analizi reaksiyonu aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi.

1. Çift zincirli amplifikasyon örneği	7 µl
Exonükleaz I (10 U/ µl)	0.6 µl
Shrimp alkalın fosfotaz (2 U / µl)	0.7 µl

Karışım 37 °C de 20 dakika inkübasyona bırakıldı. Ekzonükleaz I enzimi, PCR reaksiyonu sonrası ortamda kalan primerleri ve tek zincir reaksiyon ürünlerini parçalarken, Shrimp alkalın fosfotaz enzimi de PZR karışımı içerisinde bulunan dNTP' leri ortadan kaldırır.

Enzimlerin inaktivasyonu için 80 °C'de 20 dakika inkübasyon işlemi uygulandı.

2- Birinci basamaktaki reaksiyon devam ederken 4 farklı tüpe 2.5 µl ddACTP, ddCTP, ddGTP ve ddTTP'ler dağıtıldı.

3-Kalıbın ve Primerlerin Birleştirilmesi

Exo I ve SAP enzimler ile muamele edilen DNA örneğinin bulunduğu reaksiyon tüpüne 0,6 µl primer eklenerek 100 °C'de 3 dakika inkübe edildi ve hızlı bir şekilde buz içerisine alındı. Bu aşamada primerler amplifikasyon ürünleri ile komplementer oldukları bölgeden birleştiler.

4- İşaretleme Reaksiyonu

Sequenase Reaksiyon Tamponu (5X)	2 µl
DTT, 0.1 M	1 µl
1:5 dilüye edilmiş işaretleme karışımı	2 µl
³⁵ S dATP	0,5 µl (5µCi)
Sequenase Versiyon 2.0 DNA polimeraz	2 µl olacak

şekilde hazırlandı.

Primerle birleşmiş DNA karışımı ile karıştırılarak 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.

5- Sonlandırma Reaksiyonu

2. aşamada hazırlanan tüpler üzerine 3,5 µl işaretleme reaksiyon karışımı eklendi. 37 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı.

6- Reaksiyonlar 4 µl formamid içeren durdurma çözeltisi ile durduruldu.

7- Örnekler denatüre edilerek %6' lık denatüre poliakrilamid jele yüklendi.

3.8. İstatistik Analizi

Bu çalışma sonucu elde edilen tüm veriler Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paketi (SPSS) 10 programı kullanılarak istatistiksel olarak tek yönlü ANOVA yöntemi kullanılarak değerlendirildi. Veriler log data transformasyonuna uğratıldı.



4. Sonuçlar

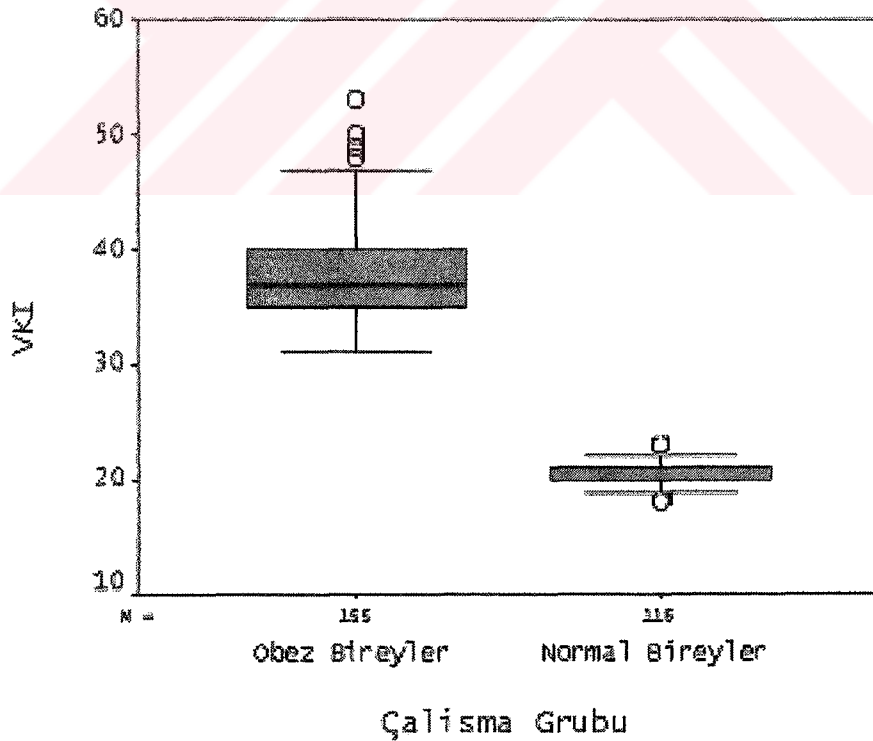
4.1. Obez Hastalarda ADRB3 Gen Polimorfizminin Taranmasına Ait Sonuçlar

Çalışma kapsamında 155 obez ($VKI \geq 30$) ve 116 kontrol ($VKI \leq 25$) olmak üzere toplam 271 bireye ait DNA rnekleri incelenmiştir. Bu bireylere ait klinik bilgiler izelge 4.1 ve Şekil 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1: Çalışma grubundaki bireylerin klinik zellikleri

	Obez	Normal
Birey sayısı	155	116
En yüksek VKI (kg/m^2)	57	24
En düşük VKI (kg/m^2)	31	18
VKI (kg/m^2) ortalaması	$38,0935 \pm 5,1139$	$20,6983 \pm 1,3782$

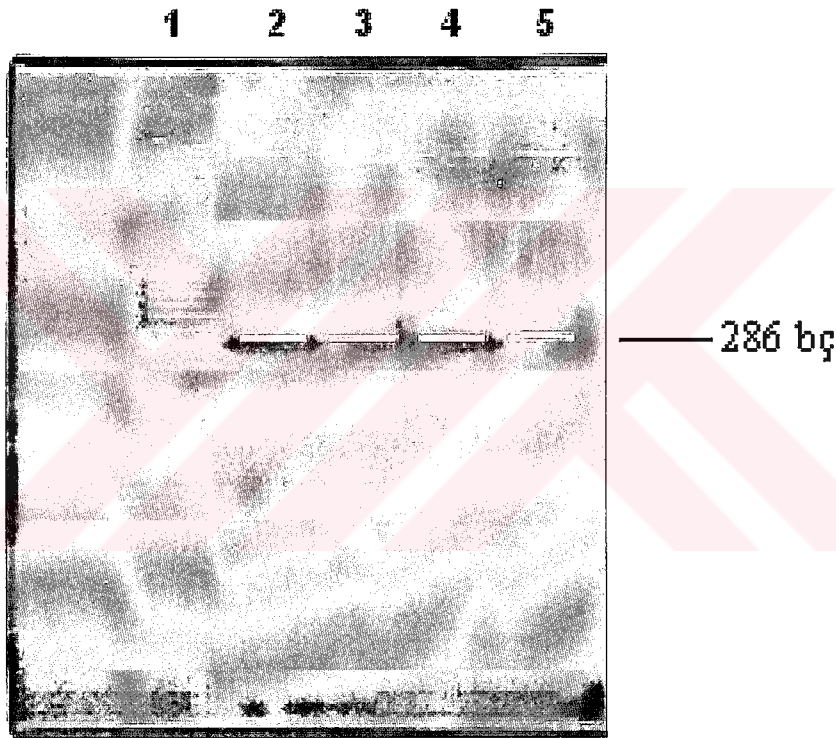
Değerler \pm standart sapma (SD) ortalaması olarak ifade edilmiştir.



Şekil 4.1: Çalışma grubundaki bireylerin VKI' ye göre dağılımı

4.1.1. ADRB3 geninin amplifikasyonu

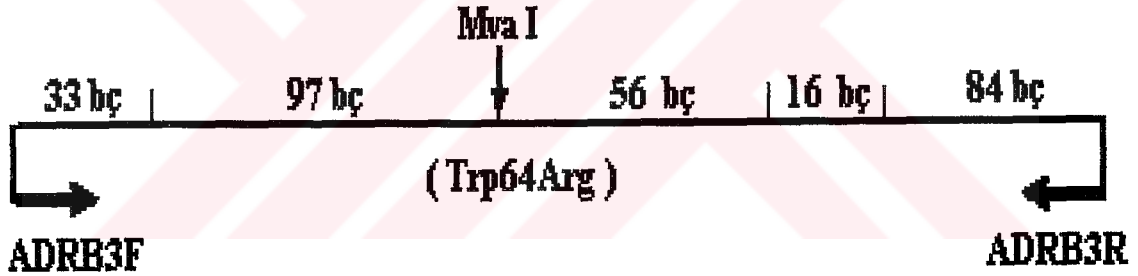
Beta 3 adrenerjik reseptör geni 1. ekzonu 64. kodonunda bulunan Triptofanı Arjinine dönüştüren polimorfizmin ($TGG^{Trp} \rightarrow CGG^{Arg}$ T→C) incelenmesi için PZR yöntemi kullanılmıştır. Gen bölgesi ADRB3F ve ADRB3R primerleriyle amplifikasyon boyu 286 bç olacak şekilde çoğaltılmıştır (Şekil 4.2).



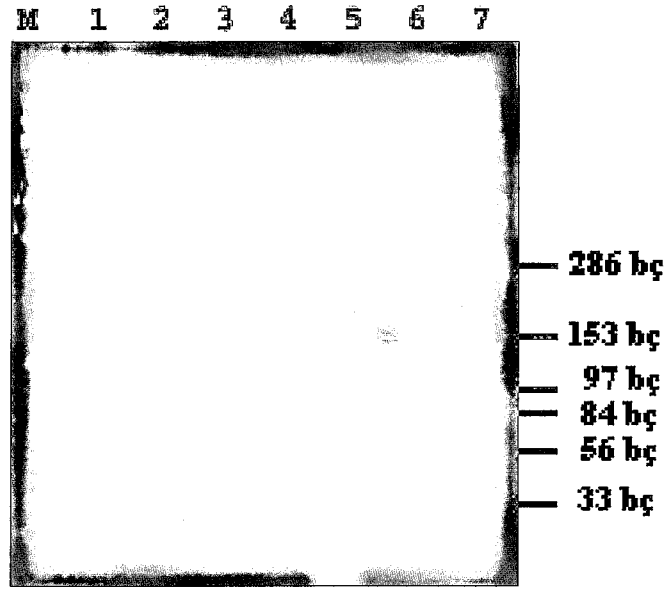
Şekil 4.2: ADRB3 geninin amplifikasyon ürünlerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi. 1 Marker (1100 bç DNA ladder) 2,3,4,5 ADRB3 geni amplifikasyon ürünü (286bç)

4.2. ADRB3 geninin Mva I enzimi ile kesimi

PZR ile çoğaltılmış ADRB3 geninin amplifiye edilen 286 bç'lik kısmı Mva I enzimi ile kesildi. Bu bölge içerisinde yer alan Trp64Arg polimorfizmi enzimin kesim noktalarından birini ortadan kaldırmaktadır (Şekil 4.3). Kesim örneklerinin poliakrilamid jelde yürütülerek farklı paternler tespit edildi (Şekil 4.4).



Şekil 4.3: ADRB3 geni 1. ekzonunda 286 bç lik amplifikasyon bölgesi üzerinde yer alan Mva I enziminin kesim noktaları ve kesim büyüklükleri



Şekil 4.4 : ADRB3 geni Trp64Arg polimorfizmi

- 1 Marker (1100 bç DNA ladder)
- 2 Kesilmemiş PZR ürünü
- 3,4,5,7 Trp64Trp genotipine sahip örnekler
- 6 Trp64 Arg genotipine sahip örnekler

Hasta ve kontrol grubu için ADRB3 gen polimorfizmine ait dağılımlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2: Obez ve kontrol grubunda ADRB3 gen polimorfizmi dağılımı

	Genotip	Sayı	Yüzde %	χ^2
	Trp/Trp	129	83.9	
Obez	Trp/Arg	25	16.1	
	Arg/Arg	0.0	-	$p(Trp) = 0.919$
	Trp/Trp	103	87.9	1.947 ns
Kontrol	Trp/Arg	14	12.1	
	Arg/Arg	0.0	-	$p(Trp) = 0.940$

Elde edilen sonuçların istatistiksel analizlerinin yapılabilmesi için çalışma grubu alt gruplara ayrılmıştır. Bu alt gruplar oluşturulurken VKİ ve cinsiyet faktörleri kullanılmıştır (Çizelge4.3).



Çizelge 4.3: ADRB3 çalışma grupları ve VKI değerleri

Gruplar	Birey Sayısı	Ortalama VKI	Standart Sapma	Standart Hata	En Düşük VKI	En yüksek VKI
1	92	37,8913	5,0458	,5261	31,00	57,00
2	37	37,8378	4,4691	,7347	32,00	57,00
3	53	20,7170	2,2221	,3052	18,00	35,00
4	50	21,1200	1,6492	,2332	18,00	24,00
5	18	41,1111	7,2102	1,6995	35,00	57,00
6	7	36,4286	2,5071	,9476	35,00	41,00
7	7	19,7143	,9512	,3595	18,00	21,00
8	7	20,5714	1,3973	,5281	18,00	22,00
Total	271	30,6900	9,5495	,5801	18,00	57,00

1 Trp-Trp Kadın } Hasta
2 Trp-Trp Erkek } Hasta

5 Trp-Arg Kadın } Hasta
6 Trp-Arg Erkek } Hasta

3 Trp-Trp Kadın } Kontrol
4 Trp-Trp Erkek } Kontrol

7 Trp-Arg Kadın } Kontrol
8 Trp-Arg Erkek } Kontrol

ADRB3 geninde yeralan polimorfizmin obezite yatkınlığına neden olup olmadığı ANOVA istatistik analiz yöntemi kullanılarak incelenmiştir ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4' te verilmiştir.

Çizelge 4.4: ADRB3 geninde hasta ve kontrol gruplarında VKI' inin polimorfizim ile ilişkisini gösteren ANOVA tablosu

DF	SS	MS	F	P
3	0,1011	0,0337	2,27	0,083
150	2,2300	0,0149		
153	2,3311			

DF: Serbestlik derecesi (n-1)

SS: Kareler toplamı

MS: Ortalama kareler

F: F dağılım değeri

p: Olasılığı

Eşit olmayan örneklem büyüklüğüne sahip log data transforme edilmiş dataların, tek yönlü ANOVA yöntemi ile analizi sonucunda farklılığın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulundu ($p > 0,05$) ve Türk toplumunda obezite ile polimorfizm arasında bağlantı olmadığı sonucuna varıldı.

4.3. UGT1A1 Geni TA İnsersiyon Polimorfizminin Taranmasına Ait Sonuçlar

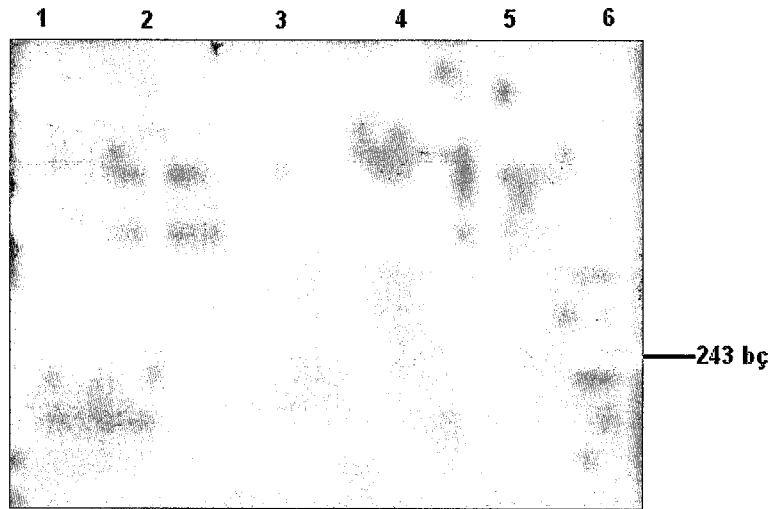
Çalışmanın ikinci kısmını oluşturan UGT1A1 genindeki TA insersiyon polimorfizminin incelenmesi için serum bilirubin konsantrasyonu 3 mg/dl üzerinde olan 45 hasta birey ve serum bilirubin konsantrasyonu 2 mg/dl altında 21 normal bireyin kanları alınarak DNA izolasyonları yapılmıştır (Çizelge 4.5). Polimorfizmin tespiti için denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezi ve sekans teknikleri kullanılmıştır.

Çizelge 4.5 : UGT1A1 çalışma grubunu oluşturan bireylerin klinik özeliği

	Doğuştan Sarıklı	Normal
Birey Sayısı	45	21
Serum Bilirubin Düzeyi	> 3mg/ml	<2mg/ml

4.4. UGT1 A1 Geni Promotor Bölgesinin Amplifikasyonu

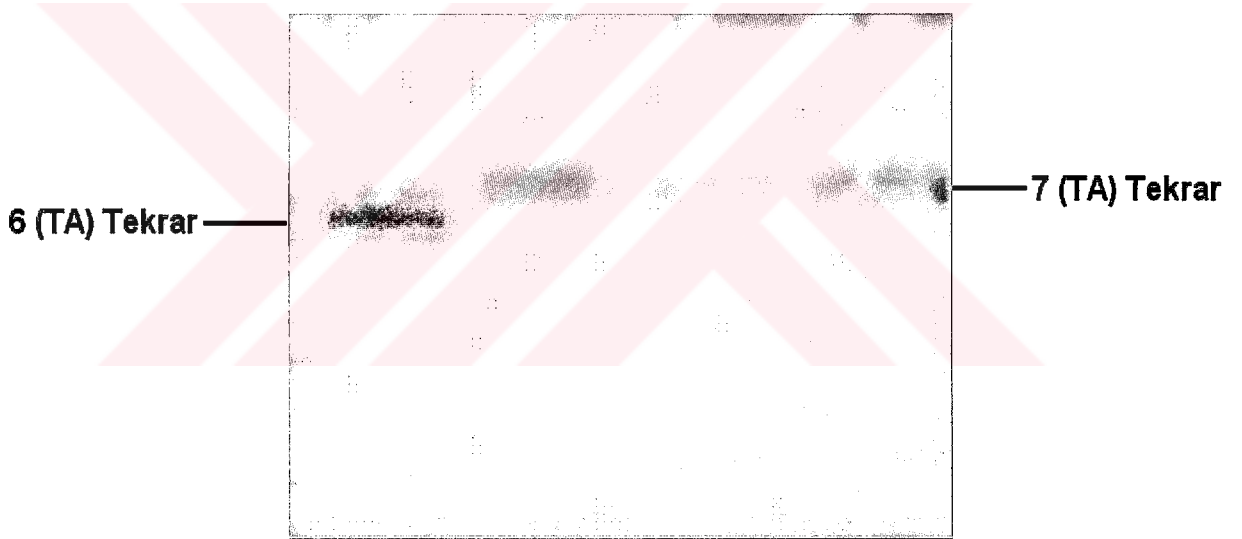
UGTSD ve UGTSR primerleri kullanılarak promotor bölgenin TA insersiyon polimorfizmini içeren 243 bç'lik kısmı PZR yöntemi ile amplifiye edildi. Amplifikasyon ürünleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5: UGT1A1 geni promotor bölgesi amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel görüntüleri 1 Marker (1100 bç DNA ladder) 2,3,4,5,6 UGT1 A1 geni amplifikasyon ürünü (243 bç)

4.5. UGT1 A1 Geninin Poliakrilamid Jel Elektroforezi:

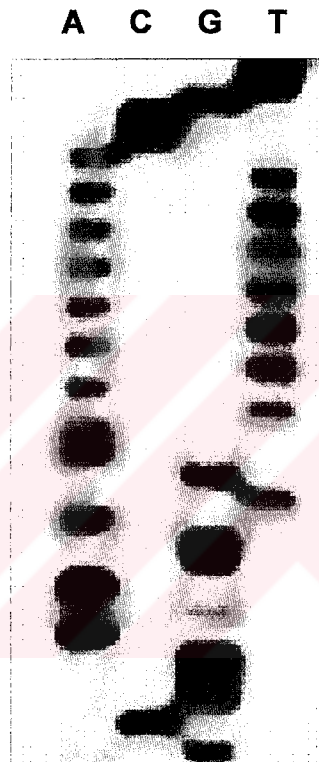
Amplifikasyon ürünleri, denatüre edici poliakrilamid jel elektroforezinde yürütülerek, promotor bölgelerinde yer alan TA tekrar dizisinin tekrar sayıları tespit edildi. 6 TA tekrarı içeren normal baz dizilimine göre, 2 baz çiftlik (7 TA tekrarı) insersiyonuna sahip olan örnekler jelde daha geride kalarak yürümüşür (Şekil 4.6).



Şekil 4.6: UGT1A1 geni 6 ve 7 (TA) tekrarlarının poliakrilamid jel görüntüsü

4.6. UGT1 A1 Geni TA İnsersiyon Polimorfizminin Sekans ile Kontrolü :

DNA dizi analizi (sekans) tekniği kullanılarak, poliakrilamid jel elektroforezinde tekrar dizi sayısı tespit edilmiş örneklerin sonuçları bu yöntem ile tekrar doğrulandı (şekil 4.7).



şekil 4.7: UGT1A1 geni promotor bölgesinde 6 (TA) tekrarının sekans analizinin görüntüsü

45 hasta 21 kontrol bireyin UGT1A geninin promotor bölgesindeki TA tekrar sayılarının sonuçları Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6 : UGT1A1 geni polimorfizm dağılım tablosu

	Hasta		Normal	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
6 Tekrar	30	%67	11	%50
7 Tekrar	13	% 29	6	%28
6/7 Tekrar	2	%4	4	%22

5. Tartışma

Obezite, vücudun enerji alımıyla enerji harcanması arasındaki dengeyi sağlayamaması sonucu, aşırı yağlanmasına bağlı bir hastalıktır. Obezite bir kişilik zaafı değil, bir hastalıktır ve dünyanın yaşadığımız yüzyılda karşılaştığı en ciddi sağlık problemlerinden biridir. Vücutta yağ birikimi, alınan ve harcanan enerji arasındaki ilişki, kişiden kişiye değişiklik gösterip bu değerler üzerinde çevre, kültür, psikolojik rahatsızlıklar ve genetik faktörlerin etkili olduğu bilinmektedir.

Obeziteye neden olan genetik faktörlerin ortaya çıkartılması son derece güçtür. Çok genli kalıtım gösteren bu hastalığa neden olduğu bilinen MC4R, LEP ve LEPR gibi genler üzerindeki mutasyonlar araştırmacılar tarafından bulunmuştur. Yapılan çalışmalar termogenezis ve lipolizis mekanizmalarında görev alan Beta 3 Adrenerjik reseptör genindeki bir mutasyonun obezite ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Obeziteye neden olan faktörlerin bilinmesi, özellikle de genetik temelini anlaşılması bu hastalık ile mücadelede tedavi ve rehberlik hizmetinin etkin bir biçimde verilebilmesini sağlayacaktır. Tez çalışması kapsamında, Beta-3 adrenerjik reseptörü kodlayan gen üzerindeki bir polimorfizmin obezite üzerine etkisi ve Türk toplumundaki frekansı incelenmiştir.

Sarılık, dokularda bilirubin depolanması sonucu, deri ve mukozanın sarıya boyanmasıdır. Klinik olarak belirgin hale gelebilmesi için serum bilirubin düzeyinin 2-3 mg ve üstünde olması gerekmektedir. Toplumumuzda sarılık çoğunlukla viral enfeksiyona bağlı sarılıkla eşdeğer olarak tutulmaktadır. Hiperbilirubinemi, bilirubin metabolizmasında meydana gelen bir gitmezliğin sonucu ortaya çıkar. Birçok faktörle birlikte genetik faktörler de hastalığın ortaya çıkmasında etkilidir. Genetik temeli olan ve yeni doğanlarda görülen sarılık zeka geriliği ve daha ilerisinde de çocuk ölümleri gibi ciddi sonuçlara yol açabilmektedir.

Gilbert sendromu, UGT glukuronozil transferaz genindeki mutasyona bağlı olarak serumda bilirubin miktarının yükselmesiyle sonuçlanan kalıtsal bir hastalıktır. Bu

enzimi kodlayan genin promotor bölgesinde meydana gelen bir TA insersiyonunun enzimin ekspresyon düzeyinde düşmeye neden olduğu literatürde bildirilmektedir.

Bu çalışmada, glukuronidasyondan sorumlu enzimi kodlayan genin (UGT1A1) promotor bölgesindeki polimorfizmin Türk Gilbert hastalarındaki frekansı incelenmiştir.

5.1. ADRB3 Genindeki Trp 64 Arg Polimorfizminin Obezite ile İlişkisi

ADRB3 geninin 827'inci pozisyonundaki Timin nükleotidinin Sitozin (T→C) nükleotidine dönüşmesi ile genin 64. kodonunda yer alan Triptofan aminoasidi Arjinin (TGG → CGG) aminoasidine dönüşmektedir.

Çalışma sonunda, obez kadın hastalarının % 16.3 (n=18) ünde, erkek hastaların %15.5 (n=7) inde kodon 64 polimorfizmi bulunmuştur. Kontrol grubunda kadınlarda %11.8 (n= 7), erkeklerdeki oranıysa % 12.2 (n=7) dir. Cinsiyet ayrımı yapmaksızın obez hasta gurubunda % 16.1 (n=25), kontrol gurubunda ise %12 Arjinin allelini taşıdığı bulunmuştur. Çizelge 4.2'de verilen allel sıklıklarının obez ve kontrol grubu için benzer olduğu görülmektedir.

Literatürde, farklı populasyonlar üzerinde yapılan çalışmalarda; İtalyan populasyonunda %13.6 (Tonalo et el., 1999), Fransız populasyonunda %9.5 (Clement et al.,1997), Japon populasyonunda %17 (Oizumi et al., 2001) ve Alaska Eskimo'larında %38 (Biery et al., 1997) olarak Arjinin allel frekansı olarak bulunmuştur.

Çalışmada Türk toplumunda Kodon 64 Arjinin polimorfizminin VKİ üzerine etkisinin istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının tespiti için, elde edilen veriler tek yönlü ANOVA istatistik testi ile incelenmiştir. Çalışma sonucu, istatistiksel olarak farklılığın (p=0,083) olmadığı gösterilmiştir (Çizelge 4.4). Şili, Meksika kökenli Amerikalılar ve Afrika kökenli Amerikalılarda (Santos et al., 2002; Silver et al., 1997; Lowe Jr et al., 2001) benzer olarak VKİ ile polimorfizm arasında ilişki bulunamamıştır. Fransız, Japon ve Japon kökenli Amerikalılarda (Clement et al.,1997; Oizumi et al., 2001; Tomokazu et al., 2001) obezite ile polimorfizm arasında ise ilişki saptanmıştır.

Obezite gibi poligenik bir hastalıkta şüpheli bir gendeki farklı sonuçlar beklenmedik olmamalıdır. Bu değişik sonuçlar birkaç faktöre bağlanarak açıklanabilir.

İlk olarak genetik alt yapının, Trp64Arg ADRB3 varyantlarının fenotipik ekspresyonunda rol oynayabileceğidir. Bunun yanında populasyonda Trp64Arg'nin varyantlarının etkisini obeziteye yol açabilecek başka bir gen ile etkileşimin değiştirebilir olabileceğidir. Bu görüşe destek olarak farklı fare soylarında ob (leptin) mutasyonunun değişik ekspresyon düzeyi verilebilir (Silver et al., 1997).

İkincisi çevrenin fenotipik ekspresyona etkisidir. Sardunya ve Aymara populasyonları arasındaki bir çalışma örnek olarak verilebilir. Sardunyalılarda yapılan çalışmada cinsiyet ve yaş parametreleri kontrolünde Trp64 polimorfizmi ve sistolik kan basıncı arasında istatistiksel bağlantı kurulmasına karşın, Aymara populasyonunda bu ilişki saptanamamıştır. Aymara populasyonun yaşadığı alan 4000 m'nin üzerinde olup bu yükseklikte kan basınç seviyesi deniz seviyesinde yaşayanlara göre düşüktür (Santos 2002). Bu yükseklik farkına bağlı kan basıncı değişikliği de çalışma sonucunu değiştirmiştir. Bu görüşe güzel bir örnek olarak Pima kızılderilileri ve Nauran ile yapılan çalışmalar verilebilir. Bu iki populasyon da yüzyıl öncesine göre artmış vücut ağırlığına sahiptirler. Beslenme alışkanlıklarındaki batılılaşma ve yerleşik hayat biçiminin artması her iki populasyonda da dramatik olarak obezitenin artmasına yol açmıştır (Silver et al., 1997).

Üçüncü faktör ise yapılan çalışmanın tasarımıdır. Örnek seçimi fenotipik karakterizasyon ve kullanılan istatistik yöntemleri farklı sonuçlar üzerinde direk olarak etki etmektedir.

5.2. UGT1 Genindeki TA İnsersiyon Polimorfizminin Gilbert Sendromu İle İlişkisi

Bilirubin glukuronidasyonundan sorumlu enzim olan bilirubin UDP glukuronozil transferaz enzimini kodlayan genin (UGT1A) promotor bölgesindeki TATA kutusundaki bir polimorfizm, enzimin sentez düzeyini düşürmektedir. Enzim

sentezinin düşüşü sonucunda artan bilirubin miktarı, Gilbert sendromunun ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

TATA kutusu, DNA'daki konsensus dizilerden (çeşitli genlerde RNA polimerazın etkin bağlanmasını sağlayan benzer diziler) birisidir. Ökaryotik genlerin çoğunda bulunan bu dizi RNA polimeraz II'nin transkripsiyon başlama faktörlerinin bir araya geldiği önemli bir noktadır. RNA polimeraz II'nin alt ünitesinden olan TATA bağlanma proteini (TBP, TATA bindig protein, TFIID) promotor bölgedeki TATA kutusunu tanıyarak DNA'ya bağlanmaktadır. Bu bağlanma en az yedi transkripsiyon faktörünü aktive ederek bir seri bağlanma sonucu transkripsiyonun öncül başlama kompleksini oluşturmaktadır. Transkripsiyonun başlamasında çok önemli olan bu noktada meydana gelen değişiklikler transkripsiyonun başlamasındaki etkinliğe bağlı olarak genin ifade düzeyinde değişikliklere de yol açmaktadır (Klug and Cummings, 2002). Bosma ve arkadaşları (1995) yaptıkları çalışmada normal TATAA (TA 6 tekrar) dizilimine TA insersiyonu sonucunda, genin ifade düzeyinin %18-%33 oranında düştüğünü göstermişlerdir.

Literatürde farklı populasyonlarda yapılan çalışmalar, TA polimorfizminin frekansının dağılımında çeşitliliğin var olduğunu göstermektedir. Literatürde Avrupa populasyonunda (TA)₆ tekrarının %38 (TA)₇ tekrarının %62, İtalyan populasyonunda (TA)₆ tekrarının %43 (TA)₇ tekrarının %57; Afrika populasyonunda (TA)₆ tekrarının % 42 (TA)₇ tekrarının % 48 ve Japon populasyonunda (TA)₆ tekrarının %7 (TA)₇ tekrarının ise %93 (Iolascan et al., 2000) bulunduğu rapor edilmiştir. Beyaz ve Afrika populasyonunda elde edilen sonuçlar birbirine yakın olup bu sonuç TA insersiyonunun dünyada homojen dağılmış, eski bir polimorfizm olduğunu göstermektedir. Asya populasyonundaki diğer populasyonlardan çok farklı allel frekans değeri; çalışmadaki bireylerin sayılarının azlığından ya da çalışılan populasyonun heterojenitesinden kaynaklanıyor olabilir.

Bu tez çalışmasında hasta grubunun (TA)₆ tekrarı allel frekansını %69 (TA)₇ tekrarı %31, kontrol grubunun (TA)₆ tekrarı %61 (TA)₇ tekrarı %39 olarak bulundu. Hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki frekans değerleri birbirine yakın çıkmıştır. Bu sonuç beyaz populasyon ile yapılan çalışmalara göre yakın olmakla birlikte hasta grubundaki (TA)₆ tekrar sayısının kontrol grubuna göre yüksek çıkması dikkate

değerdir. Literatürde UGT1A geninde Gly71Arg mutasyonunun Gilbert sendromuna yol açtığı bildirilmektedir (Iolascan et al., 2000). Çalışılan hasta grubundaki yüksek bilirubin düzeyi bu mutasyon açısından da değerlendirilerek artan bilirubin düzeyinin genetik nedenleri ortaya çıkarılabilir. Çalışma birey sayısı bakımından popülasyonun genel frekansını çıkarmak açısından yeterli olmamakla birlikte; Türk toplumunda yapılan ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır. Çalışmada kullanılan denatüre poliakrilamid jel tekniği sekans tekniğine nazaran oldukça ucuz ve zahmetsiz bir teknik olup popülasyon frekans çalışması için uygun bir tekniktir. Çalışılan birey sayısı artırılarak Türk toplumunun bu polimorfizm açısından allel frekansı çıkarılması hedeflenmektedir.



KAYNAKLAR

Aktan, H. 1988 Gastroentoloji. Makro Yayıncılık, Ankara.253-255s

Baggot,J.,2002 Heme degradation http://www-medlib.med.utah.edu/sharon/fa/heme/5_2.html

Batman,F.,1993, Sarılık ve Bilirubin metabolizması. Gastroenteroloji. Telatar, H., (ed.) Medikomat, Hekimler Yayın Birliği,Ankara 655-66

Baxter, J.D., 1981, Personal communication San Francisco Calif. 5

Biery, A.J., Ebbesson, S., Shuldiner, A.R., Boyer, B.B., 1997. The β_3 -adrenergic receptor TRP64ARG polymorphism and obesity in Alaskan Eskimos. International Journal of Obesity 21, 1176-1179

Bosma, P.J., Chowdhury, J.Y., Bakker, C., Gantla S., Boer, A.D., Oostra, B.A., et al., 1995, The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucucuronosyltransferase-1 in Gilbert's syndrome. The new England Journal of Medicine 2:1171-1175

Boss, O.; Samec, S.; Paoloni-Giacobino, A.; Rossier, C.; Dulloo, A.; Seydoux, J.; Muzzin, P.; Jacobino, J.-P., 1997. Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. FEBS Lett.408: 39-42,.

Bray, G.A., 1994, Lipid bozuklukları (çev.ed., İlhan Satman), Blimsel ve Teknik Çeviri Vakfı,İstanbul

Bringham, C.L., Muller, J.L., Palupu, A., Spinelli, J.J., Anis, A.A., 1999, The cost of obesity in Canada. Canadian Medical Association Journal.160:483-488.

- Chretien, M., Benjannet, S., Grossard, F., Gianoulakis, C., Crine, P., Lis, M., Seidah, N.G 1979. From beta-lipotropin to beta-endorphin and proopiomelanocortin. *Canad. J. Biochem.* 57:1111-1121
- Clarke, D.J., Moghrabi, N., Monaghan, G., Cassidy, A., Boxer, M., et al., 1997, Genetic defects of the UDP-glucuronosyltransferase-1 (UGT1) gene that cause familial non-haemolytic unconjugated hyperbilirubinaemias. *Clinica. Chemica. Acta*, 63-74
- Clement, K., Vaisse, C., Lahlou, N., et al. 1998 A mutation in the leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 392:398-401
- Coşkun, H., 2002, Türkiye'de obezite sıklığı (prevalansı), <http://www.angelfire.com/mac/bilimteknoloji/genelsaglik.htm>
- Emorine, L.J., Marullo. S., Briend-Sutren, M.M., Patey, G., et al., 1989, Molecular characterization of human beta3 -adrenergic receptor. *Science* 245:1118-1121
- Fan, W.; Boston, B. A.; Kesterson, R. A.; Hruby, V. J.; Cone, R. D. Role of melano cortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 385: 165-168, 1997.
- Friedman, J. M.; Leibel, R. L.; Siegel, D. S.; Walsh, J.; Bahary, N., 1991 Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics* 11: 1054-1062,
- Giudice, E.M., Perrone, L., Forabosco, P Devoto, M., Carbone, M.T., Calabro, C., Toro, R., 2000, Linkage study of early-onset obesity to leptin receptor gene in Italian children. *Nutrition Research* 20: 1059-1063
- Gonzalez-Barroso, M. D.M., Ricquier, D., Cassard-Doulcier, A.M., 2000. The human uncoupling protein-1 gene (UCP1): present status and perspectives in obesity research. *Obesity Reviews* 1 (2), 61-71
- Hoffman, B.B., 1998, Adrenoceptor -activating & Other Sympathomimetic Drugs. *Basic & Clinical Pharmacology.* Katzung, B.G., (ed), Appleton&Lange Stamford. Pp 118-136

<http://www.adrenoceptor.com/homemail5.html>, Introduction to Beta- Adrenoceptors

[http://www.bumc.bu.edu/www/busm/cme/modules/hbili/bmNeonatal Hyperbilirubine mia, Bilirubin Metabolism](http://www.bumc.bu.edu/www/busm/cme/modules/hbili/bmNeonatal%20Hyperbilirubine%20mia,%20Bilirubin%20Metabolism)

Huszar, D.; Lynch, C. A.; Fairchild-Huntress, V.; Dunmore, J. H.; Fang, Q.; Berkemeier, L. R.; Gu, W.; Kesterson, R. A.; Boston, B. A.; Cone, R. D.; Smith, F. J.; Campfield, L. A.; Burn, P.; Lee, F., 1997 Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-141

Jedlitschky, G., Cassidy, A.J., Sales, M., Pratt, N., Burchell, B., 1999, Cloning and characterization of a novel human olfactory UDP- glucuronosyltransferase. *Biochem. J.* 340:837-843.

Klug, W.S., Cummings, M.R., 2002. *Genetik Kavramlar* (Ed. Oner C) Palme yayıncılık Ankara. 364-365 s.

Kopelman, P.G., 2000, Obesity as a medical problem. *Nature*.6;404(6778):635-643

Lee, T.H., Lerner, A.B., Buettner, V., 1961, On the structure of human corticotropin (adrenocorticotropi hormone). *J.Biol.Chem.*, 236:2970-2974

Lissner, L., Heitmann, B., 1995, Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 49:79-90

Lowe, W.L., Rotimi, C.N., Luke, A., Guo, X., Zhu., et al., 2001, The β_3 -adrenergic receptor gene and obesity in a population sample of African Americans. *International Journal of Obesity* 25: 54-60

Mackenzie, I.P., Miners, J.O., Mckinnon, R.A., 2000, Polymorphism in UDP Glucuronosyltransferase genes: Functional consequences and clinical relevance, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 38(9): 889-892

- Magni, P., Motta, M., Martini, L., 2000, Leptin: a passible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regulatory Peptides* 92:51-56
- Masuzaki, H.; Ogawa, Y.; Sagawa, N.; Hosoda, K.; Matsumoto, T.; Mise, H.; Nishimura, H.; Yoshimasa, Y.; Tanaka, I.; Mori, T.; Nakao, K., 1997. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Med.* 3: 1029-1033,. *Medicine.* 2:1171-1175
- Menteş, N.K., 1992 Klinik Gastroentoloji, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, İzmir
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA invitro- the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273
- Noyan, A., 1996, Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji, Meteksan Yayınları, Ankara, 659-686 s
- Oizumi, T., Daimon, M., Saitoh, T., Kameda, W., Yamaguchi, H., et al, 2001. Genotype Arg/Arg, but not Trp/Arg, of the Trp64 Arg Polymorphism of the β_3 -adrenergic receptor is Associated with Type 2 Diabetes and Obesity in a Large Japanese Sample *Diabetes Care.* 24:1579-1583
- Özata, M., 2003 Obezite tanı ve tedavisi GATA basımevi, ANKARA 6-7s
- Palmer, E.D., 1983, Pratik Gastroentoloji, (çev:Aras Geçioğlu, Ali Pusane, Sadık Perek), Formül Yayınları, İstanbul 150-159s
- Palou, A., Serra, F., Bonet, M.L., Pico, C.,2000, Obesity:molecular bases of a multifactorial problem. *Eur. J. Nutr.*, 39:127-144
- Pudel, V., Westenhoefer, J., 1992, Dietary and behavioural principles in the treatment of obesity. *International Monitor on Eating Patterns and Weight Control* 1: 2-7

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A., 1988, primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491
- Sampietro, M., Lupica, L., Perrero, L., Comino, A., Montemuros, F.M., Cappellini, M. Fiorelli, G., 1997, The expression of uridine diphosphate glucuronosyltransferase gene is a major determinant of bilirubin level in heterozygous β - thalassaemia and in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *British Journal of Haematology*. 99, 437-439
- Sanger, F., Ninlen, S., Coulson, A.R., 1977 DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *PNAS. USA* 74: 5963-5969
- Santos, L.J., Brova, F.P., Martinez, J.A., Montalvo, D., Albana, C., Carrasco, E., 2002, No evidence for a association between genetic polymorphism of β_2 and β_3 Adrenergic receptor genes with body mass index in Aymara natives from Chile. *Nutrition* 18: 255-258
- Seidell, S 1995. Obesity in Europe: scaling an epidemic. *Int. J. Obesity* 19:S1-S3
- Silver, K., Mitchell, B.D., Walston, J., Sorkin, J.D., Stern, M.P., Roth, J., Shuldiner, A.R., 1997, TRP64ARG β_3 -adrenergic receptor and obesity in Mexican Americans. *Hum. Genet.* 101:306-311
- Sözen, M.M., 2000, Revers transkriptaz- PCR Tekniği (mRNA ANALİZİ) ile Talasemiye Neden Olan Mutasyonların Alfa ve Beta Gen Ekspresyonları Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-2s.
- Tonola, G., Melis, M.G., Secchi, G., Atzeni, M.M., et. al 1999, Association of Trp64 Arg β_3 -adrenergic receptor gene polymorphism with essential hypertension in the Sardinian population. *Journal of Hypertension* 17:33-38

Tsezou, A., Tzetis, M., Kitsiou S., Kavazarakis, E., Galla, A., Kanavakis, E., 2000, A caucasian boy with Gilbert's syndrome heterozygous for the (TA)₈ allele. *Haematologica* 85(3): 319

Vaisse, C.; Clement, K.; Guy-Grand, B.; Froguel, P., 1998, A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nature Genet* 20: 113-114

Yen, M.Y., Yen, T.C., Panc, C., Liu, J., Wei, Y., 1992, Mitochondrial DNA mutation in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Invest. Opht. Visual Sci.* 33,2561-2566

Yenson, M., 1984, *İnsan Biyokimyası*, Sermet Yayınları, Kırklareli, 495-498s.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: İbrahim Çağatay KARAASLAN

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Yılı: 1978

Medeni Hali: Bekar

Eğitim ve Akademik Durum

Lise: 1991-1994 Yahya Kemal Beyatlı Lisesi

Lisans 1995-1999 Hacettepe Üniversitesi Fen
Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Deneyimi: 2002- Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri
Enstitüsü