



T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLUK ÇAĞI OBEZİTESİNDE ANNEKSİN A5 GEN  
POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ

Hazırlayan  
Emel ENSARİ

Temel Tıp Bilimleri Ana Bilim Dalı  
Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı  
Yüksek Lisans

Danışman  
Doç. Dr. H. Ömer ATEŞ

TOKAT – 2015

# ÇOCUKLUK ÇAĞI OBEZİTESİNDE ANNEKSİN A5 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ

Tezin Kabul Ediliş Tarihi: 21/12/2015

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Başkan : Doç. Dr. H. Ömer ATEŞ

Üye : Doç. Dr. Akın YILMAZ

Üye : Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ



Bu tez, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulunun 08/12/2015 tarih ve 27/01 sayılı oturumunda belirlenen jüri tarafından kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü: Doç. Dr. H. Ömer Ateş

Mühür  
İmza



T.C.  
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(21/12/2015)

Tezi Hazırlayan Öğrencinin

Adı ve Soyadı

Emel Ensari

İmzası

## ÖNSÖZ

Çalışmalarım boyunca bana yardım ve desteğini esirgemeyen, her zaman bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım danışman hocam Doç. Dr. Ömer ATEŞ'e, tez çalışmamda kullandığım hasta ve kontrol gruplarına ait kanların toplanmasında büyük bir özveriyle çalışan Arş. Gör. Dr. Serap BİLGE'ye, anabilim dalı öğretim üyelerimiz Doç. Dr. Nevin KARAKUŞ, Doç. Dr. Aydın RÜSTEMOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Serbülent YİĞİT'e, çalışmalarım sırasında her türlü desteğini esirgemeyen asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Nihan BOZKURT ve Arş. Gör. Saime SEZER'e, anabilim dalı yüksek lisans öğrencilerimiz Sümeyya Deniz ÇELİK ve Çisem Nildem DOĞAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Her zaman arkamda kocaman bir dağ gibi duran hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep arkamda hissettiğim, bugünlere gelmemde çok büyük emekleri olan canım aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Emel (ÖZSOY) ENSARİ

Tokat, Aralık 2015

## ÖZET

### ÇOCUKLUK ÇAĞI OBEZİTESİNDE ANNEKSİN A5 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ROLÜ

Hayati bir risk oluşturan anormal ya da aşırı yağ birikmesi olarak tanımlan obezite, küresel ve yaygın bir hastalık olup, morbidite ve prematür mortalite ile sonuçlanabilen, temel sağlık problemlerinden biridir. Çevresel ve genetik faktörlerin, obezitenin gelişimine katkıda bulunduğu çok iyi bilinmesine rağmen, obeziteye zemin hazırlayan genetik faktörler hala tam olarak anlaşılamamıştır.

Anneksin (ANXA5), antikoagulatif fonksiyonu olan bir proteindir ve trigliserid biyosentezinde rol aldığı düşünülmektedir. Trigliseridler lipid ve enerji metabolizmasına dahildir. ANXA5 ve lipid metabolizması arasındaki ilişki, obezite açısından önemli olabilir.

Bu çalışmada ANXA5 geninin iki farklı varyantı olan rs1050606 (-302T>G) ve rs11575946 (-1C>T) polimorfik bölgelerindeki değişimin çocukluk çağı obezitesi ile olan ilişkisi değerlendirildi. 200 obez çocuk ve 150 sağlıklı kontrol dahil edilen bu çalışmada TaqMan® Hidroliz Prob Kantitatif Real-Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) Tekniği kullanıldı.

Hasta ve kontrol gruplarına ait genotiplendirme analizleri sonucunda, ANXA5 geni her iki varyantının da çocukluk çağı obezitesi açısından bir risk faktörü oluşturmadığı görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** ANXA5, Çocukluk Çağı Obezitesi, Genetik Yatkınlık, TaqMan® Hidroliz Prob, qPZR

## ABSTRACT

### THE ROLE OF ANNEXIN A5 GENE POLYMORPHISMS IN CHILDHOOD OBESITY

Obesity, that is defined as unusual or excessive fat accumulation, is a universal and a common disease and because of the consequent morbidity and premature mortality, it is one of the major health concern. Although enviromental and genetic factors contributing to obesity development are well known, genetic factors predisposing to obesity are still not clearly understood.

Annexin A5 (ANXA5) is a protein that functions anticoagulative and it is thought to have a role play in triglycerides biosynthesis. Triglycerides are included in the lipid and energy metabolism. The relationship between ANXA5 and lipid metabolism may be very important for obesity.

In this study, the relation of two different variants of the ANXA5 rs1050606 (-302T>G) and rs11575946 (-1C>T) with childhood obesity were evaluated. TaqMan<sup>®</sup> Hydrolysis Probes Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR) Technique was used, in this study included 200 obese children and 150 healthy controls.

As a result of the analysis of genotyping of the patients and the control group, the both variants of ANXA5 gene was not seen as a risk factor for childhood obesity.

**Key Words:** ANXA5, Childhood Obesity, Genetic Susceptibility, TaqMan<sup>®</sup> Hydrolysis Probes, qPCR

## İÇİNDEKİLER

Sayfa

|                                                                     |             |
|---------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>ETİK SÖZLEŞME .....</b>                                          | <b>i</b>    |
| <b>ÖNSÖZ .....</b>                                                  | <b>ii</b>   |
| <b>ÖZET .....</b>                                                   | <b>iii</b>  |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                               | <b>iv</b>   |
| <b>İÇİNDEKİLER .....</b>                                            | <b>v</b>    |
| <b>TABLolar LİSTESİ .....</b>                                       | <b>vii</b>  |
| <b>ŞEKİLLER LİSTESİ .....</b>                                       | <b>viii</b> |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>                                | <b>ix</b>   |
| <b>1.GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>                                        | <b>1</b>    |
| <b>2.GENEL BİLGİLER.....</b>                                        | <b>4</b>    |
| 2.1.OBEZİTE NEDİR?.....                                             | 4           |
| 2.1.1.Vücut Kitle İndeksi.....                                      | 6           |
| 2.2.OBEZİTE EPİDEMİYOLOJİSİ .....                                   | 10          |
| 2.3.OBEZİTE ETİYO-PATOGENEZİ.....                                   | 14          |
| 2.4.OBEZİTE GENETİĞİ .....                                          | 17          |
| 2.4.1.Monogenik Obezite.....                                        | 19          |
| 2.4.2.Sendromik Obezite .....                                       | 19          |
| 2.4.3.Poligenik Obezite.....                                        | 21          |
| 2.5. ANXA5 GEN AİLESİ.....                                          | 21          |
| 2.5.1. ANXA5 Geni .....                                             | 22          |
| 2.5.2. ANXA5 Proteini .....                                         | 23          |
| <b>3.MATERYAL ve METOD .....</b>                                    | <b>27</b>   |
| 3.1.HASTA VE KONTROL GRUPLARININ TOPLANMASI.....                    | 27          |
| 3.2.ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER.....                      | 29          |
| 3.2.1.Cihazlar ve Sarf Malzemeler .....                             | 29          |
| 3.2.2.Kimyasal Maddeler.....                                        | 30          |
| 3.3.YÖNTEM .....                                                    | 30          |
| 3.3.1.Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu .....                 | 30          |
| 3.3.2.Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR) ..... | 32          |
| 3.3.2.1.TaqMan® Hidroliz Prob Tekniği.....                          | 35          |
| 3.3.3.DNA'nın Kantitatif Tayini.....                                | 36          |

|                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.4.ANXA5 Geni rs1050606 (-302T>G) Polimorfizminin Real-Time PZR İle Kantitasyonu ..... | 36        |
| 3.3.5.ANXA5 Geni rs11575945 (-1C>T) Polimorfizminin Real-Time PZR İle Kantitasyonu .....  | 38        |
| 3.4.İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER .....                                                         | 40        |
| <b>4.BULGULAR.....</b>                                                                    | <b>41</b> |
| 4.1.ARAŞTIRMA GRUBUNA AİT BULGULAR.....                                                   | 41        |
| 4.2.KANTİTATİF REAL TİME PZR VERİLERİ.....                                                | 42        |
| 4.3.ANXA5 GENİ SNP (-302T>G, rs1050606) REAL-TİME PZR VERİLERİ .....                      | 43        |
| 4.3.1. SNP rs1050606 Allelik Ayrım Grafiği .....                                          | 43        |
| 4.4.ANXA5 GENİ SNP (-1C>T, rs11575945) REAL-TİME PZR VERİLERİ.....                        | 47        |
| <b>5.TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>                                                          | <b>51</b> |
| <b>6.KAYNAKLAR .....</b>                                                                  | <b>57</b> |
| <b>7.ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                   | <b>66</b> |

## TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

|                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 2.1.</b> Vücut Kitle İndeksine Göre Fazla Kilolu ve Obez Bireylerin Sınıflandırılması.....                                 | 7  |
| <b>Tablo 2.2.</b> Çocuk ve Adölesanlarda Yaşa-Cinsiyete Bağlı Fazla Kilolu/Obez Tanımı Ölçüt Kriterleri.....                        | 9  |
| <b>Tablo 3.1.</b> Hasta ve Kontrol Grubu- Çalışmaya Dahil Edilip Edilmeme Kriterleri.....                                           | 28 |
| <b>Tablo 3.2.</b> ANXA5 Geni rs1050606 (-302 T>G) Polimorfik Bölgesi İçin Kullanılan Real-Time PZR Bileşenleri.....                 | 37 |
| <b>Tablo 3.3.</b> ANXA5 Geni rs11575945 (-1 C>T) Polimorfik Bölgesi İçin Dizayn Edilen Prob Çiftleri .....                          | 38 |
| <b>Tablo 3.4.</b> ANXA5 Geni rs11575945 (-1 C>T) Polimorfik Bölgesi İçin Dizayn Edilen Primer Çiftleri.....                         | 38 |
| <b>Tablo 3.5.</b> ANXA5 Geni rs11575945 (-1C>T) Polimorfik Bölgesi İçin Kullanılan Real-Time PZR Bileşenleri .....                  | 39 |
| <b>Tablo 4.1.</b> Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Cinsiyet, Yaş Ortalamaları ve VKİ Dağılımları .....                               | 41 |
| <b>Tablo 4.2.</b> ANXA5 rs1050606 (-302T>G) Polimorfik Bölgesinin Hasta ve Kontrol Gruplarındaki Genotip ve Allel Dağılımları ..... | 46 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

### Sayfa

|                                                                                                                                                         |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Okul Çağı Çocuklarında Obezite .....                                                                                                         | 5  |
| Şekil 2.2. 18 Yaş- Altı Erkek Çocuk ve Adölesanlarda Fazla Kilolu/Obezite Prevalansı ve Her Bir Bölgede Yer Alan En Yüksek Yüzdelere Sahip Üç Ülke..... | 12 |
| Şekil 2.3. 18 Yaş- Altı Kız Çocuk ve Adölesanlarda Fazla Kilolu/Obezite Prevalansı ve Her Bir Bölgede Yer Alan En Yüksek Yüzdelere Sahip Üç Ülke.....   | 13 |
| Şekil 2.4. ANXA5 Geninin 4.Kromozom Üzerindeki Yerleşimi.....                                                                                           | 22 |
| Şekil 2.5. ANXA5 Geninin Ekzon Bölgelerinin Gösterimi .....                                                                                             | 23 |
| Şekil 2.6. İnsan ANXA5 Proteinin Kristal Yapısı.....                                                                                                    | 25 |
| Şekil 3.1. Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PZR Cihazı .....                                                                                   | 34 |
| Şekil 3.2. TaqMan® Hidroliz Proplarının Temel Çalışma Prensibi.....                                                                                     | 36 |
| Şekil 3.3. ANXA5 Geni rs1050606 (-302 T>G) Polimorfik Bölgesi İçin Kullanılan Real-Time PZR Programı .....                                              | 37 |
| Şekil 3.4. ANXA5 Geni rs11575945 (-1C>T) Polimorfik Bölgesi İçin Kullanılan Real-Time PZR Programı .....                                                | 39 |
| Şekil 4.1. ANXA5 Geni Promotör Varyantları. ....                                                                                                        | 42 |
| Şekil 4.2. Hastalara Ait ANXA5 -302T>G TaqMan® Prob qPZR Allelik Diskriminasyon Grafiği.....                                                            | 44 |
| Şekil 4.3. Kontrol Grubuna Ait ANXA5 -302T>G TaqMan® Prob qPZR Allelik Diskriminasyon Grafiği .....                                                     | 45 |
| Şekil 4.4. Çocuk Obez Hastalara Ait Multikomponent Grafiği. ....                                                                                        | 48 |
| Şekil 4.5. Kontrol Grubuna Ait Multikomponent Grafiği .....                                                                                             | 49 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|               |   |                                           |
|---------------|---|-------------------------------------------|
| <b>µl</b>     | : | Mikrolitre                                |
| <b>ABD</b>    | : | Amerika Birleşik Devletleri               |
| <b>ALSM1</b>  | : | Sentrozom Ve Bazal Vücut İlişkili Protein |
| <b>ANXA5</b>  | : | Anneksin A5                               |
| <b>aPL</b>    | : | Antifosfolipid Antibadiler                |
| <b>AS</b>     | : | Alström Sendromu                          |
| <b>BBS</b>    | : | Bardet-Biedl Sendromu                     |
| <b>BDNF</b>   | : | Beyin Türevli Nörotrofik Faktör           |
| <b>CDC</b>    | : | Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi        |
| <b>DFLP</b>   | : | Çift Etiketli Floresan Boya               |
| <b>DNA</b>    | : | Deoksiribonükleik Asit                    |
| <b>DSÖ</b>    | : | Dünya Sağlık Örgütü                       |
| <b>DVT</b>    | : | Derin Ven Trombozu                        |
| <b>FAIM2</b>  | : | Fas Apoptotik İnhibitör Molekül 2         |
| <b>FTO</b>    | : | Yağ Kitle ve Obezite İlişkili Gen         |
| <b>GDO</b>    | : | Genetiği Değiştirilmiş Organizma          |
| <b>GNPDA2</b> | : | Glukozamin-6-Fosfataz Deaminaz 2          |
| <b>GWAS</b>   | : | Genom Çaplı İlişkilendirme Araştırmaları  |
| <b>MC4R</b>   | : | Melanokortin-4 Reseptör                   |
| <b>MGB</b>    | : | Küçük Oluk Bağlayıcı                      |
| <b>ml</b>     | : | Mililitre                                 |
| <b>MTMR9</b>  | : | Miyotübülerin- İlişkili Protein 9         |
| <b>NEGR1</b>  | : | Nöronal Büyüme Düzenleyici 1              |

|               |   |                                                  |
|---------------|---|--------------------------------------------------|
| <b>NHANES</b> | : | Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Araştırmaları |
| <b>POMC</b>   | : | Pro-Opiomelanokortin                             |
| <b>PS</b>     | : | Fosfatidil Serin                                 |
| <b>PWS</b>    | : | Prader Willi Sendromu                            |
| <b>PZR</b>    | : | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                      |
| <b>qPZR</b>   | : | Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| <b>RNA</b>    | : | Ribonükleik Asit                                 |
| <b>RPL</b>    | : | Tekrarlayan Gebelik Kaybı                        |
| <b>Rpm</b>    | : | Dakikadaki Devir Sayısı                          |
| <b>SEC16B</b> | : | Endoplasmik Retikulum Taşıyıcı Faktör            |
| <b>SH2B1</b>  | : | Src-Homoloji 2B Adaptör Protein 1 Geni           |
| <b>SNP</b>    | : | Tekli Nükleotit Polimorfizmleri                  |
| <b>Taq</b>    | : | Thermus Aquaticus                                |
| <b>Tm</b>     | : | Erime Sıcaklığı                                  |
| <b>TMEM18</b> | : | Transmembran Protein 18                          |
| <b>VKİ</b>    | : | Vücut Kitle İndeksi                              |

## 1.GİRİŞ ve AMAÇ

Obezite, aşırı yağ birikimi ile sonuçlanan vücut ağırlığındaki artış ile karakterize edilmekte olup, tüm dünyada sosyal bir sağlık problemi haline gelmiştir. Morbidite ve mortalite ile sonuçlanabilen bir hastalık olan obezite, metabolik sendrom, şeker hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, yağlı karaciğer hastalıkları ve kanser de dahil birçok hastalığın nedeni olmaktadır (Marseglia ve ark., 2015).

Günümüzde önlenabilir ölümlerin, sigaradan sonra gelen ikinci önemli nedeni obezitedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 1998 Deklarasyonu'nda, modernleşme ve ekonomik büyümenin standartlarda artışa yol açarak obeziteyi küresel bir epidemi haline getirdiğini, 2002 yılında ise, 21. yüzyılın en önemli sağlık sorunu olarak kalacağını bildirmiştir (Erbaş ve ark., 2015). Özellikle gelişmiş ülkelerde hızlı bir şekilde görülme sıklığı artan obezite, son zamanlarda gelişmekte olan ülkeler ve az gelişmiş ülkelerde de alarm verici boyutlara ulaşmıştır.

Yaşam tarzına bağlı olarak yaşanan değişiklikler, enerji alım ve tüketimindeki dengesizlikler, dünya çapında, obezite prevalansının artmasına yol açmaktadır (Seok ve ark.,2013). Çocukluk çağı obezitesi pek çok ülkede büyük bir problem haline gelmiştir ve çarpıcı şekilde daha da kötüye gitmektedir. 1990'lı yıllarda Brezilya ve Amerika'da yapılan çalışmalarda, her yıl tüm çocuk popülasyonunun % 0,5' i kadar fazla kilolu çocuk sayısının popülasyona eklendiğini göstermişlerdir. Kanada, Avustralya ve Avrupa'nın bazı bölgelerinde bu oran daha yüksektir ve her yıl tüm çocuk popülasyonunun %1'i kadar obez çocuk sayısı artmaktadır (Lobstein ve ark., 2004).

Ulusal Sağlık ve Beslenme İnceleme Araştırmalarının (NHANES) farklı yıllarda (1976-1980 ve 2003-2006) yapmış olduğu çalışma verilerine göre, çocuklar arasında

yaşla birlikte obezite prevalansı artmaktadır. Bu prevalans çarpıcı bir şekilde son 25-30 yıl içerisinde daha da artmaktadır: 2-5 yaş arası çocuklarda obezite prevalansı % 5'ten % 12,4'e; 6-11 yaş arası çocuklarda % 6,5'tan % 17'ye ve 12-19 yaş arası çocuklarda ise, % 5'ten % 17,6' ya çıkmıştır. Obez çocuklar, çocukluk ve ergenlik dönemlerinde tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar (yüksek kan basıncı ve yüksek kolesterol dahil) gibi çeşitli sağlık problemleri için daha fazla risk grubu içindedirler (Hernandez-Valeroa ve ark., 2013).

Obezite, multifaktöriyel bir hastalıktır, çoklu genler, çevresel faktörler ve çevre etkileşimleri obezitede ve kilo alımına eğilimde önemli bir rol oynamaktadırlar. Vücut ağırlığını belirli bir düzeyde tutmak genetik kontrolün altında olmasına rağmen, tek bir gendeki mutasyonlar nadiren şiddetli obezite ile sonuçlanır. Daha önce yapılan çalışmalar, vücut kitle indeksi (VKİ) ya da obezite ve genetik varyantların birbirleriyle ilişkili olduğunu ve çeşitli yollarla bağlantılı olan genlerdeki polimorfizimlerin, obezitenin gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir (Seok ve ark., 2013).

Anneksin A5 (ANXA5) geni ilk kez 1994 yılında Cookson ve ark.'ları tarafından tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda (Van Heerde ve ark., 1999) ANXA5 geninde Kozak sekansı (-1C>T) polimorfizmi keşfedilmiştir (Van Goor ve ark., 2005). Kozak sekansı polimorfizmi (ref SNP ID rs11575945, -1C>T) genin ekzon 2 bölgesinde ATG başlama kodonunun yukarı bölgesinde yer almaktadır ve genin bilinen en yaygın polimorfizmlerinden biridir (Hiddink ve ark., 2012; Kenis ve ark., 2003; Van Goor ve ark., 2005). ANXA5 geninin yaygın olarak bilinen bir diğer polimorfizmi, genin ekzon 1 bölgesinde yer alan olan -302 T>G, rs1050606 polimorfizimidir (Miyamura ve ark., 2011). Son yıllarda yapılan çalışmalar ANXA5 geninin promotör bölgelerindeki mutasyonların birçok hastalıkla bağlantılı olduğunu rapor etmiştir.

Tekrarlayan gebelik kaybı, pre-eklampsı ve gebelikle ilişkili trombolik hastalıklar gibi çeşitli hamilelikle ilgili rahatsızlıklarda ANXA5 geni promotör bölgesindeki genetik varyantların (özellikle rs11575945, -1C>T) ciddi bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir (Ota ve ark., 2013).

ANXA5, çözünebilir proteinler olan anneksinlerin en küçük üyesidir,  $Ca^{+2}$  bağımlı olup, negatif yüklü fosfolipidler içeren -özellikle fosfotidilserin- hücre membranına bağlanırlar (Carmeille ve ark., 2015).

ANXA5 proteini, ANXA5 geni tarafından kodlanan plasental, antikoagulant bir proteindir. Normalde plasental villuslarda oluşur ve ekspresyonunun antifosfolipid antikorların (aPL) varlığında azaldığı gözükmemektedir. ANXA5, plateletlerin yüzeyinde bulunan anyonik fosfolipidlere bağlanarak, pıhtılaşmayı engelleyici olarak fonksiyon görmektedir. Bol miktarda normal plasentada eksprese olmaktadır ve kodlanan genler kompleks bir promotör bölgesine sahiptir (Hayashi ve ark., 2013). ANXA5 geninin promotör bölgesindeki tekli nükleotit polimorfizimleri (SNP) tekrarlayan gebelik kaybı (RPL) ile son derece ilişkilidir ve M2 (A-C-C-A) haplotipini taşıyan kadınlarda, taşımayanlara göre 2,42-kat gebelik kaybı riski daha yüksektir. ANXA5 geninin (SNP:-302T>G) 5'- çevrilmemiş bölgesindeki bir SNP, Japon kadınlarda RPL'nin temel bir risk belirleyicisi olarak hizmet etmektedir (Miyamura ve ark., 2011).

ANXA5'in trigliserit biyosentezinde rol oynayabileceği düşünülmektedir. Trigliseridler, lipit (yağ) ve enerji metabolizmasına dahildir ki obezitenin değerlendirilmesinde çok önemli oldukları bilinmektedir (Seok ve ark., 2013). Bu çalışmanın amacı, çocukluk çağı obezitesinde önemli bir yer tutacağını düşündüğümüz ANXA5 geni promotör bölgesinde bulunan yaygın iki genetik varyantı olan rs1050606 ve rs11575945 polimorfizimlerinin obezite ile olan muhtemel ilişkisini incelemektir.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1.OBEZİTE NEDİR?

Obezite, sözcük anlamı olarak latince ‘obezus’ kelimesinden türetilmiştir. Şişman karşılığı olarak kullanılan ‘obezus’ iyi beslenmiş anlamına gelmektedir. İngilizce’de ise ‘obesity’ şişmanlık, ‘obese’ şişman ve ‘overweight’ fazla ağırlık, tartıda fazla gelen miktar anlamlarına gelmektedir. Genel olarak obezite, enerji alımının enerji tüketiminden fazla olduğu durumlarda ortaya çıkan klinik bir şablon olarak ifade edilmektedir (Ergül ve Kakım, 2011).

Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre ise, ‘obezite sağlığı bozacak şekilde vücutta anormal ya da aşırı yağ birikmesi olarak’ tanımlanmıştır.

Obezite; kalp hastalığı, tip 2 diyabet, hipertansiyon, inme, belirli tipte kanserler (endometrial, meme, prostat, kolon, vb), dislipidemi, safra kesesi hastalıkları, uyku apnesi ve diğer respiratuar problemler, osteoartrit gibi hastalıklar ile tüm sebeplere bağlı mortalitede artış, fertilitede azalma, duygusal gerginlik ve toplum tarafından damgalanma gibi çeşitli fiziksel ve psikolojik komplikasyonlara yol açmaktadır (Baltacı, 2008).

Çocukluk çağı obezitesi, küresel boyutlarda ciddi bir halk sağlığı problemidir ve pek çok ülkede prevalansı alarm verici seviyelere ulaşmıştır (Rex ve ark., 2014). Çocukluk çağı obezitesinde görülen bu artış özellikle gelişmiş ülkelerde gözlemlenmektedir. Son yıllarda obezitedeki bu artışın genellikle genetik faktörlerden ziyade çevresel ve yaşam tarzına bağlı faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Rathnayake ve ark., 2014).

DSÖ verilerine (Ocak 2007 ) göre, Avrupa Birliği Ülkeleri'nde 14 milyon çocuk fazla kiloludur. Çocukluk çağı obezitesi, 21. yüzyılda besin ve pediatrik bakımdan yüz yüze kalınacak en büyük zorluklardan biri olacağı düşünülmektedir (Şekil 2.1.), (Pysz ve ark., 2014).



**Şekil 2.1.** Okul Çağı Çocuklarında Obezite (<http://www.weightlossbucket.com/>)

Son zamanlarda yapılan çalışmalar obez çocuk ve adölesanların, muhtemelen yetişkinliklerinde de obez olacağı görüşündedirler. Bu yüzden yetişkinlerde olduğu kadar da obezite çocuk ve adölesanlar için de ciddi bir risk faktörü olmaktadır. İki yaşından daha önce obez olan çocukların yetişkin olduklarında obez olma ihtimalleri daha yüksek olmaktadır (Marseglia ve ark., 2015).

Çocukluk çağında görülen bu yüksek oranlardaki fazla kilo ve obezite, birçok sağlık sorununu da beraberinde getirmektedir. Psiko-sosyal problemlerden kan basıncı, kolesterol, trigliserit ve insülin direnci gibi kötü metabolik etkilere neden olabilmektedir (De Onis, 2014).

### 2.1.1.Vücut Kitle İndeksi

Vücut kitle indeksi (VKİ), fazla kilolu ve obez bireyleri sınıflandırmak için yaygınlıkla kullanılan ve kilo boy oranını veren basit bir indekstir. Bu indeks, herhangi bir kişinin kilogram cinsinden ağırlığının, kişinin metre cinsinden boyunun karesine bölünmesi  $[(\text{Ağırlık}) \text{ kg} / (\text{Boy}) \text{ m}^2]$  ile hesaplanmaktadır. VKİ, gerek cinsiyet gerekse tüm yaş gruplarına sahip bireylerde aynı şekilde kullanılması açısından popülasyon seviyesindeki fazla kilolu ve obezite ölçümlerinde en kullanışlı veri olarak tercih edilmektedir. Ancak bununla birlikte VKİ bulguları kabaca bir yol gösterici olup, farklı bireylerdeki aynı şişmanlık derecesini ifade etmemektedir (DSÖ, 2015).

DSÖ tarafından belirlenen VKİ limit değerleri ve ko-morbite riski Tablo 2.1.'de gösterilmiştir. Ancak VKİ değeri, vücutta yağ dağılımı hakkında bilgi vermemektedir (Çıtıl ve ark., 2015). VKİ ve vücut yağ içeriği arasındaki ilişki vücudun yapısı ve oranına göre farklılık göstermektedir. Aksine, kardiyovasküler hastalıklar ve diğer kronik hastalıkların risk faktörlerindeki değişiklikleri belirlemede kullanılan karının iç kısmı (intra-abdominal) ya da göbek çevresindeki yağ birikiminin ölçüm değeri, VKİ değerlerine göre bu tip hastalıklar için daha uygun gözükmemektedir. Bu yüzden, obezitenin tanımlanmasında merkezi bir yağ birikiminin değerlendirilmesi büyük oranda daha yardımcı olacaktır (Chan ve Woo, 2010).

**Tablo 2.1.** Vücut Kitle İndeksine Göre Fazla Kilolu ve Obez Bireylerin Sınıflandırılması (Chan ve Woo, 2010)

| Sınıflandırma  | VKİ (kg/m <sup>2</sup> ) | Ko-Morbite Riski |
|----------------|--------------------------|------------------|
| Düşük kilolu   | <18.5                    | Düşük            |
| Normal kilolu  | 18.5-24.9                | Ortalama         |
| Fazla kilolu   | 25-29.9                  | Artma            |
| Obez sınıf I   | 30-34.9                  | Orta             |
| Obez sınıf II  | 35-39.9                  | Şiddetli         |
| Obez sınıf III | ≥40                      | Çok şiddetli     |

DSÖ'ye göre, VKİ değeri 25 ve daha fazla olanlar fazla kilolu, 30 ve üstünde olanlar ise obez olarak değerlendirilmiştir.

Çocuk ve adolesonların fazla kilolu ve obez sınıflandırması yapmak için farklı ölçütler ve tanımlar kullanılmaktadır. Kullanılan standartlar fazla kilolu/obez yetişkin birey tanımlamasında değerlendirilen ölçütlerden farklılık göstermektedir. Fazla kilolu ve obez çocukları tanımlayabilmek için, uluslararası standartlarda kabul edilebilen, özel ölçümler, referans popülasyon değerleri ve yaş ve cinsiyete özel limit değerleri tanımlanmıştır (Cole ve ark., 2000). Çocukluk çağı VKİ, büyük oranda yaşla birlikte değişmektedir. Yeni doğanda, ortalama 13 kg/m<sup>2</sup>'den daha düşüktür, 1 yaşında 17 kg/m<sup>2</sup>'ye kadar çıkar, 6 yaşında 15,5 kg/m<sup>2</sup>'ye düşer, sonra 20 yaşında 21 kg/m<sup>2</sup>'ye çıkmaktadır. Yaşla bağlantılı olan limit değerleri açık bir şekilde çocuk obezitesini tanımlamak için kullanılmaktadır. Aynı temel prensibe dayanan farklı yaşlardaki çocuk obezitesini tanımlamaya yönelik farklı yöntemler ve referans yüzdelikler (persentil) de kullanılmaktadır (Şekil 2.2.). Örneğin, ABD'de fazla kilolu ve obez grupları

tanımlamak için, kendi belirledikleri yaş ve cinsiyete bağlı ulusal araştırma verilerine göre, 85. ve 95. VKİ persentil değerleri limit değerler olarak kullanılmaktadırlar (Cole ve ark., 2000). VKİ persentil eğrisi >85 persentil olan çocuklar aşırı kilolu, >90 persentil olanlar ise obez olarak sınıflandırılmaktadır. Ayrıca, yaşa göre vücut ağırlığı, boya göre ağırlık, deri kıvrım kalınlığının ölçümü ve yağ içeriği bakımından vücut kompozisyonu da çocuklarda obeziteyi tanımlamaya yönelik kullanılan metodlardandır (Babaoğlu ve Hatun, 2002).

**Tablo 2.2.** Çocuk ve Adölesanlarda Yaşa-Cinsiyete Bağlı Fazla Kilolu/Obez Tanımı Ölçüt Kriterleri (<http://www.hsph.harvard.edu/>, 2015)

| Organizasyon                                           | Çocukluk Çağı Obezitesi Sınır Değerleri Tanımları                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)</b>                       | <p><b><i>DSÖ Çocuk Büyüme Standartları (Doğum-5 Yaş)</i></b></p> <p>Obez: VKİ <math>&gt;3</math> Standart Sapma DSÖ Büyüme Standart Ortalamasının Üstünde</p> <p>Fazla Kilolu: VKİ <math>&gt;2</math> Standart Sapma DSÖ Büyüme Standart Ortalamasının Üstünde</p> <p>Düşük kilolu: VKİ <math>&lt;2</math> Standart Sapma DSÖ Büyüme Standart Ortalamasının Altında</p> <p><b><i>WHO Referans 2007 (5-19 Yaş)</i></b></p> <p>Obez: VKİ <math>&gt;2</math> Standart Sapma DSÖ Büyüme Standart Ortalamasının Üstünde</p> <p>Fazla Kilolu: VKİ <math>&gt;1</math> Standart Sapma DSÖ Büyüme Standart Ortalamasının Üstünde</p> <p>Düşük Kilolu: VKİ <math>&lt;2</math> Standart Sapma DSÖ Büyüme Standart Ortalamasının Altında</p> |
| <b>A.B.D. Hastalık Kontrol Ve Önleme Merkezi (CDC)</b> | <p><b><i>CDC Büyüme Çizelgesi</i></b></p> <p><i>2-19 yaş arası çocuklarda, yaş ve cinsiyete bağlı VKİ değerleri</i></p> <p>Obez: VKİ 95. Yüzde</p> <p>Fazla Kilolu: VKİ 85. Yüzde <math>&lt;95</math>. Yüzde</p> <p>Normal Kilolu: VKİ 5. Yüzde <math>&lt;85</math>. Yüzde</p> <p>Düşük Kilolu: VKİ <math>&lt;5</math>.yüzde</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

## 2.2.OBEZİTE EPİDEMİYOLOJİSİ

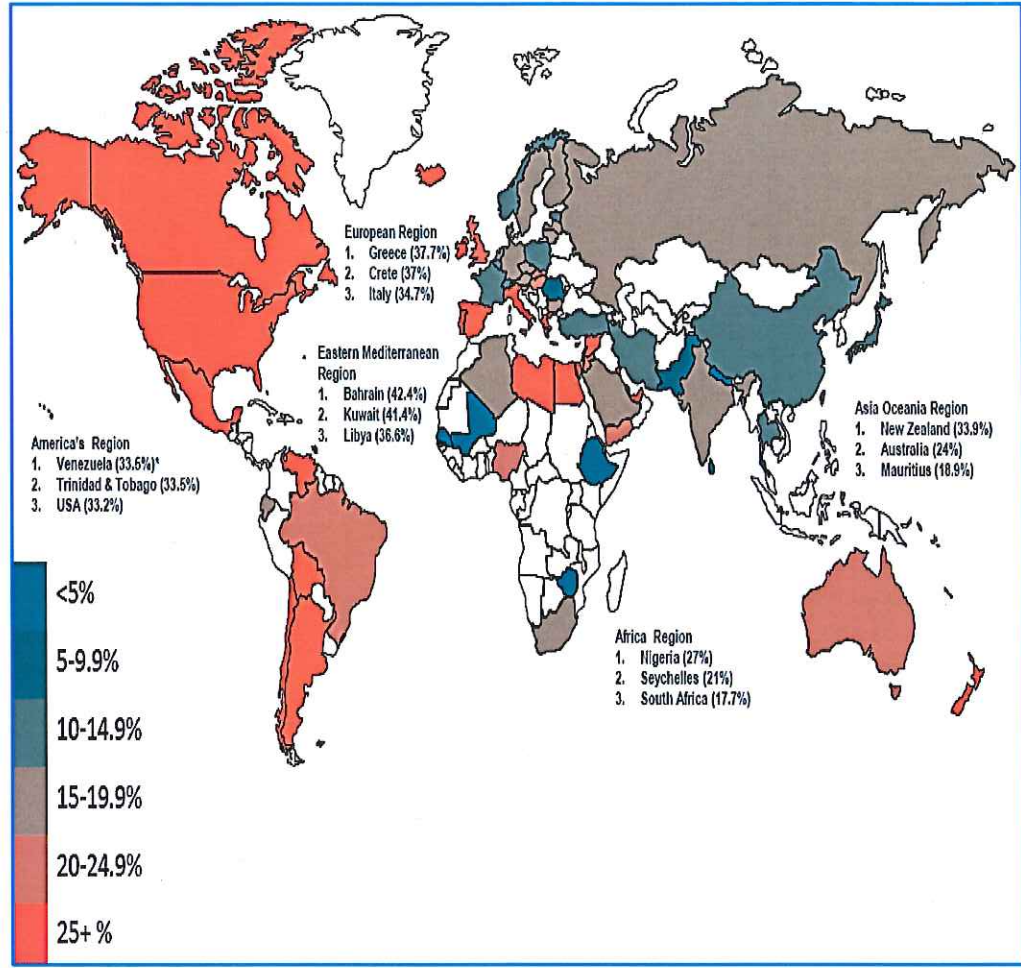
Çocukluk çağı obezitesi, epidemik boyutlara ulaşmıştır ve dünya çapında milyonlarca çocuk ve adölesanın sağlığını tehdit eden major bir rahatsızlık olarak karşımıza çıkmaktadır. Dünyada obezitenin en yaygın olarak görüldüğü ülkelerden biri olan ABD’de, elde edilen verilere göre, pediatrik ve adölesan popülasyonun yaklaşık %17’sinin obez yani şişman olduğu düşünülmektedir ( $VKİ: kg/m^2 \geq 95$ . persentil ). Öte yandan benzer raporlara dayanarak, %2 ila %7’lik bir kısmın ileri derecede çok şiddetli obez kategorisinde ( $VKİ: kg/m^2 \geq 95$ . persentil obez bireylerin %120’si. ) yer aldığını görmekteyiz (Michalsky ve ark., 2015).

Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ, 2015) göre, 1980’li yıllardan bu yana obezite dünya çapında sıkıntılı olmaya başlamıştır. 2013 yılında 5 yaşın altındaki 42 milyon çocuk, aşırı kilolu ya da obez olarak belirlenmiştir. 2014 yılı verilerine göre, 18 yaş ve üstü, 1.9 milyardan fazla genç aşırı obez yani fazla kilolu, bu gençler içerisinde 600 milyondan fazlası obez olarak belirlenmiştir. 2014 yılında, 18 yaş ve üzeri gençlerin %39’u aşırı kilolu, %13’ü ise obezdir. Dünyanın pekçok ülkesinde yaşayan aşırı kilolu ve obez insanlar, normal ağırlıklarının altında ve normal kilolu insanlara nazaran daha yüksek ölüm riski taşımaktadırlar. unutmayalım ki obezite önlenabilir bir hastalıktır!!!

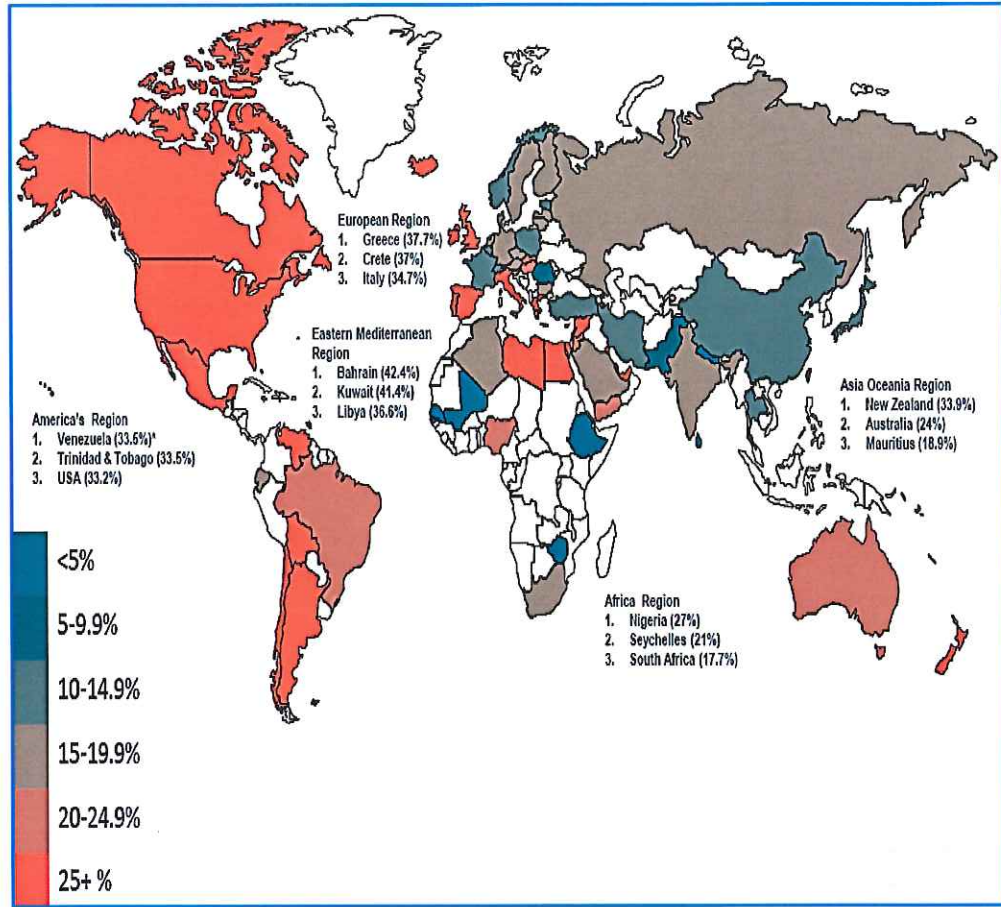
Yapılan başka bir tahmine göre 2030 yılında ABD’de yaşayan insanların %90’ı fazla kilolu, bunlar arasından ise %50’nin obez olacağı değerlendirilmiştir. Bu anlamda artan obezite hastalarının sayısına bağlı olarak beraberinde organ yetmezliği ve organ nakli için bekleyen hastaların sayısında meydana gelecek artıştan endişe edilmektedir. (Marszałek ve ark., 2015).

Dünya çapında, yaklaşık 43 milyon okul önceki çocuğun fazla kilolu ya da obez olacağı tahmin edilmekte olup, 92 milyonunun ise, fazla kilolu olma riski altında olduğu

ifade edilmiştir (De Onis ve ark., 2010). Afrikalı Amerikan ve İspanyol toplumlarına ait kültürlerde yetişen çocuklarda fazla kilolu ya da obez olma riski giderek artmaktadır. ABD’de yapılan yeni bir çalışma göstermektedir ki, anasınıfı çağındaki çocukların %12.4’ü obez, %14.9’u ise fazla kiloludur. Aynı zamanda çalışmada, 5 yaşındaki fazla kilolu çocukların, 14 yaşına geldiklerinde normal ağırlıktaki akranlarına göre 4 kat fazla obez olduğunu saptamıştır ve daha sonraki yaşlarında obez olan çocuklardan yarısı fazla kilolu sınırında, dörtte üçü ise, VKİ hesaplamasına göre %75. persentilin üzerinde bulunmuştur (Pulgaron ve ark., 2014).



**Şekil 2.2.** 18 Yaş- Altı Erkek Çocuk ve Adölesanlarda Fazla Kilolu/Obezite Prevalansı ve Her Bir Bölgede Yer Alan En Yüksek Yüzdelere Sahip Üç Ülke (Wordobesity.Org, 2015)



**Şekil 2.3.** 18 Yaş- Altı Kız Çocuk ve Adölesanlarda Fazla Kilolu/Obezite Prevalansı ve Her Bir Bölgede Yer Alan En Yüksek Yüzdelere Sahip Üç Ülke (Wordobesity.Org, 2015)

Şekil 2.2. ve Şekil 2.3.'de dünya genelinde 18 yaş ve altı kız-erkek çocuklarda obezite görülme sıklıkları resmedilmiştir. Şekillerde ifade edilen açık maviden koyu kırmızıya doğru giden renk skalasında açık/koyu mavi ile gösterilen bölgeler obezite açısından sıkıntılı olmayan ülkeler olup, parlak kırmızı ile ifade edilen bölgeler obezitenin dramatik boyutlara ulaştığının gösterildiği ülkeleri temsil etmektedir. Her iki şekilde de Türkiye % 10-14,9 yüzdellekle koyu mavi bölge kuşağında yer almaktadır.

Ülkemizde çocukluk çağı obezitesinin görülme sıklığı son 20 yılda %6-7'den %15-16'ya çıktığı düşünülmektedir. Özellikle 4-11 yaşlarında başlayan obezitenin,

yetişkin dönemde de devam etmesi halinde hipertansiyon, kalp hastalıkları ve diyabet gibi birçok hastalığı beraberinde getirdiği bildirilmektedir (Metinoğlu ve ark., 2012).

Obezitenin giderek yaygınlaşarak halk sağlığı sorunu haline gelmesi, tüm dünyada obezite ile mücadele çalışmalarının başlamasına neden olmuştur. DSÖ Avrupa Bölge Ofisi tarafından Avrupa Kıtasında, fazla kiloluluğun yetişkinlerin %30-80'ini etkisi altına aldığı, çocukların ve adölesanların yaklaşık %20'sinin fazla kilolu olduğu ve bunların üçte birinin obez olduğu belirtilmektedir. Aynı şekilde ülkemizde de sağlık bakanlığınca yürütülen çalışmalar mevcuttur. Sağlık bakanlığının, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü ve Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesince yürütülen "Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması-2010" ön çalışma raporuna göre Türkiye'de; 0-5 yaşta obezite sıklığı % 8,5 (erkek %10,1, kız %6,8), 6-18 yaşta obezite sıklığı % 8,2 (erkek %9,1, kız %7,3) olarak bulunmuştur. Bunlar arasından, 0-5 yaşta fazla kilolu olanlar %17,9, fazla kilolu ve şişman olanlar %26,4 ve 6-18 yaşta fazla kilolu olanlar %14,3, fazla kilolu ve şişman olanlar %22,5 olarak bulunmuştur (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2015)

### **2.3.OBEZİTE ETİYO-PATOGENEZİ**

Obezite, ciddi ve kronik bir hastalıktır. Genetik ve çevresel faktörlerin birbiriyle etkileşimi sonucu meydana gelen ve vücutta olması gerekenden fazla yağ dokusunun birikmesi nedeniyle oluşmaktadır. Obezite etiyolojisini etkileyen pek çok faktör vardır. Obezitenin gelişmesinde rol alan en önemli risk faktörleri içerisinde; fazla enerji alımı, yetersiz enerji tüketimi, düşük yağ oksidasyonu, psikolojik stres, sosyoekonomik gelir düşüklüğü, fiziksel aktivitede azalma, beslenme alışkanlıkları, yaş, cinsiyet, eğitim

düzeıı, evlilik, doğum sayısı ve genetik yatkınlık yer almaktadır. (Altunkaynak ve Özbek, 2006; Baltacı, 2008; Ergül ve Kakım, 2011).

Mevcut obezitenin bu kadar çok yaygın hale gelmesinin nedeni, enerji alımı ve fiziksel aktiviteler de dahil, enerji harcanması arasındaki dengesizliklerden kaynaklanmaktadır. (Wijnhoven ve ark., 2014). Vücutta enerji alımı ve yakımı bir denge halinde olmalıdır. Obezite pozitif enerji dengesinin bir sonucudur. Yani, alınan enerji harcanan enerjiden fazla ise, enerjinin depolanması söz konusudur ki ilk olarak bu enerji fazlalığı lipidler (yağlar) halinde beyaz adipositlerde (beyaz yağ hücreleri) depolanmaktadır. Enerji dengesi, besin tüketimi ve fiziksel aktivite tarafından sağlanmaktadır. Aynı zamanda bunlara ek olarak enerjinin ısıya dönüşümü şeklinde enerjinin harcanması söz konusudur. Bu hücrede iki şekilde gerçekleştirilir. İlk olarak mitokondriye zengin kahverengi yağ hücrelerinde kahverengi yağ şeklinde temel termogenez yolu ile, daha açık renkli kahverengi yağ hücrelerinde ise beyaz yağ şeklinde indüklenabilir termogenez yolu ile sağlanmaktadır. Termogenez, egzersiz, diyet ya da soğuya maruz kalma gibi oluşturulan yanıtlarda hücrelerin bizzat kendileri tarafından ya da sempatik sinir sistemi yolu ile tetiklenmektedir (Claussnitzer ve ark., 2015).

Adipoz (yağ) doku, ilk başlarda enerji depolanması, mekanik ve ısı yalıtımı için ve aynı zamanda termogenezin düzenlenmesine katılan pasif bir rezervuar olarak düşünülmekteydi. Ancak şimdilerde yağ dokunun hali hazırda ‘adipokinler’ olarak bilinen çeşitli biyoaktif peptidlerin sentezlenmesinde ve salınımında rol aldıkları bilinmektedir. Adipokinler, hem otokrin/parakrin hem de endokrinel seviyede hareket etmektedirler. Adipokinler, glukoz ve lipid metabolizmasının, enerji homeostazının, beslenme davranışlarının, insülin duyarlılığı, inflamasyon, immunité, adipogenezis (yağ

hücrelerinin oluşumu), vasküler fonksiyon ya da koagülasyonun düzenlenmesine katılmaktadırlar (Smitka ve Maresova, 2015).

Yağ doku, yağ hücrelerinin yanısıra stroma vasküler fraksiyon olarak adlandırılan endotel hücreler, sinir hücreleri, immüno-komponent hücreler özellikle monosit, makrofaj, T ve B lenfositleri, yağ dokusu türevli kök hücreleri ya da farklılaşmamış yağ dokusu öncül hücreleri içeren diğer hücre tiplerini de içermektedir (Smitka ve Maresova, 2015; Vieira-Potter, 2014). Bu farklı hücre tipleri arasındaki denge, enerji homeostazının sürdürülmesi ile yakından ilişkilidir. Bir yağ hücresinin büyüklüğü, ebatı, sayısı ve lenfositlerin polarizasyonu ve monositlerin infiltrasyonu metabolik ve obezite ilişkili hastalıklarla çok yakından bağlantılıdır (Vieira-Potter, 2014).

Çoklu hormonlar, mide-ilişkili hormonlar, adipokinler ve diğerleri de dahil obezitenin düzenlenmesi ve fizyopatolojisi ile ilişkilidirler. Girelin, mideden salınan bir peptid hormondur. Girelinin periferik olarak oreksijenik hormon gibi hareket ettiği ve ayrıca iştah açıcı özelliği olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çift-kör çapraz çalışmada, sağlıklı gönüllülere damardan girelin verildiğinde açık büfe bir kahvaltıda besin alımlarını %30 oranında arttırmışlardır. Diğer tüm mide türevli hormonlar anorektik ajanlar olarak iş görürler ve bu hormonlar besin alımının sınırlandırılmasından sorumludurlar, tokluk hissi vererek, aşırı çok yemenin bir sonucu olan hiperinsülinemi ve insülin direnci gibi hastalıklardan kaçınılmasını sağlarlar. Diğer anorektik yani besin alımını sınırlandırıcı önemli mide hormonları, peptid YY, kolesistokinin, oksintomodulin, glukagon benzeri peptid-1'dir (Kaila ve Raman., 2008).

## 2.4.OBEZİTE GENETİĞİ

Vücutta hayati bir risk oluşturan ‘anormal’ ya da ‘aşırı yağ’ birikimi olarak tanımlanan obezite (DSÖ, 2012), üç etmenin sonucu olarak ortaya çıkmaktadır: Genetik program, çevresel faktörlerin etkisi ve bu iki etmen arasındaki etkileşimdir (Poveda ve ark., 2014). Obezitede genetik faktörlerin etkisini ortaya koymak için çok sayıda aile çalışmaları, ikiz çalışmaları, aday gen çalışmaları, genom çapında bağlantı çalışmaları ve hayvan modelleri çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Ateş ve Karakuş, 2015).

Daha önceden yapılmış olan hem akraba hem de ikiz çalışmaları göre, obezitenin gelişmesinde genetik etkilerin önemi güçlüdür. Ancak bununla birlikte, temel olan belli başlı genlerin çoğu henüz bilinmemektedir ve birkaç varyant kesin olarak belirlenmiştir. Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmalarını (GWAS) kullanarak son zamanlarda, obeziteye zemin hazırlayan genlerin belirlenmesinde belirgin ilerlemeler kaydetmiştir (Poveda ve ark., 2014).

Daha önce yapılmış olan çalışmalar vücut ağırlığının, genetik kontrol ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Genetik etkiler bazal metabolizma üzerinde kişiden kişiye farklılık göstermektedir. Bundan dolayı bazı kişiler obeziteye daha yatkındır. Obez anne babalarının çocuklarının obez olma ihtimali %80 iken bu risk normal anne babaların çocuklarında %15’tir. Rankinen ve arkadaşları, vücut kitle indeksi (VKİ,  $\text{kg/m}^2$ ), bel çevresi ve yağlı vücut kitlesinin determinantları olarak, farklı çalışmalarda belirlenmiş olan çok sayıda tek nükleotit polimorfizmlerini (SNPs) bir derleme halinde sunmuştur. Bununla birlikte, vücut kitle indeksi ile alakalı en güçlü genetik öngörülerden biri, FTO (yağ kitle ve obezite ilişkili gen) geninin genetik varyantlarıdır ve obezite ile alakalı tüm kalıtımın sadece % 1 ‘ini bu genin varyantları açıklamaktadır (Knüpel ve ark., 2013).

Çoklu aday genler obezite patogeneğinde rol oynamaktadır: Özellikle beta-3 adrenerjik reseptör geni, peroksizom çoğaltıcı aktive edici reseptör gamma 2 geni, melanokortin-4 reseptör geni ve diğer genetik polimorfizmler katkıda bulunmaktadır (Kaila ve Raman., 2008).

Hotta ve ark.'ları, Japon toplumunda, SEC16B, TMEM18, GNPDA2, BDNF, FAIM2 ve MC4R geni polimorfizmlerinin obezite ile ilişkisini incelemiştir. Çalışmadan elde edilen veriler göre, SEC16B ve TMEM18 genlerine ait SNP'ler Japon toplumunda çarpıcı bir şekilde obezite ile ilişkili olduğu bulunmuştur. GNPDA2, BDNF, FAIM2 ve MC4R genlerindeki genetik varyantların ise, obezite ile bağlantılı olabileceğini göstermişlerdir (Hotta ve ark., 2009).

Genetik faktörlerin obezite gelişimini etkilediği çok açık bir şekilde ifade edilmiştir ve obezitenin genetik arka planı çoğunlukla tam olarak açıklanamamıştır. MTMR9 (miyotübülin-ilişkili protein 9) hipotalamusun lateral hipotalamik alanında, paraventriküler nükleusta ve kavisli nükleusunda lokalizedir ki, hipotalamus besin alımının düzenlendiği merkezdir. MTMR9 geninin ekspresyonu diyet yoluyla düzenlenmektedir. Bu nedenle MTMR9'un obezite ve genetik yatkınlık açısından ilişkisi araştırılmıştır. Yapılan çalışmaya göre, MTMR9 geninin birkaç varyantı çalışılmış olup, rs2293855 genotipinin obezite ile bağlantılı olduğu rapor edilmiştir ve obezitenin tedavisinde kullanılabileceği ileri sürülmektedir (Yanagiya ve ark., 2007).

Genel olarak obezite, üç genetik kategori altında sınıflandırılmaktadır. Monogenik obezite, tek gen mutasyonu, insersiyon ya da delesyon ile (örneğin, leptin/melanokortin yolağındaki bir mutasyon şiddetli obezite ile sonuçlanmaktadır) ilişkilendirilmiştir. Sendromik obezite, zeka geriliği (mental retardasyon), dismorfizm ya da Prader-Willi sendromu gibi organ-spesifik gelişimsel anomolileri bu gruba

dahildir. Poligenik obezite ise, çoklu genetik, sosyal, davranış ve çevresel faktörlerin tümünün etkileşimi sonucu meydana gelmektedir (Kupca ve ark., 2013).

#### **2.4.1.Monogenik Obezite**

SNP'ler, bir gen tarafından kodlanan proteinin işlevini önemli ölçüde bozduklarında mutasyon olarak adlandırılmaktadırlar. Şayet kodlanan bu protein, patojenik olarak önemli ise, bu mutasyon çevresel faktörlerden bağımsız olarak monogenik bir hastalığa neden olmaktadır (Semerci, 2004). Çok nadir olarak görülen ve genellikle çocukluk çağında ortaya çıkan tek bir genin neden olduğu obezite, monogenik (Mendeliyen genetik) obezite olarak adlandırılmaktadır (Clement ve Ferre, 2003). Günümüze kadar, yaklaşık 200 obezite vakası tek gen mutasyonları ile ilişkilendirilmiş olup, bu mutasyonlar ile bağlantılı 11 ayrı gen tanımlanmıştır. Monogenik obezite, çocuklarda belirgin bir şekilde fenotipte karakterize göstermektedir ve genellikle endokrin hastalıklar ile ilişkilidir (Mutch ve Clement, 2006).

Obezitenin monogenetik formunu oluşturan insan genleri iki gruba ayrılır: ilk grupta, leptin, leptin reseptörü ve pro-opiomelanokortin-POMC'yi kodlayan genler; ikinci grupta ise, melanokortin-4 reseptör-MC4R genindeki mutasyonlar bulunmaktadır (Semerci, 2004).

#### **2.4.2.Sendromik Obezite**

Klinik olarak obez olan fakat ilaveten zeka geriliği, dismorfik özellikler ve organ-spesifik gelişimsel anomolileri fark edilebilir şekilde gözle görülebilen, 20 ila 30 arasında mendeliyen hastalık tanımlanmıştır. Bu gibi vakalar sendromik obezite olarak anılmaktadır. Bu sendromlar, belirli genetik kusurlar ya da kromozomal anomalilerden

dolayı, özellikle bebeklik döneminden sonra meydana gelmektedir ve ya otozomal ya da X-kromozomu bağlantılı hastalıklardır. Prader-Willi sendromu (PWS), Bardet-Biedl sendromu (BBS) ve Alström sendromu (AS) en iyi bilinen sendromik obez hastalıkları olup, daha başka bu tarz vakalar da tanımlanmıştır (Mutch ve Clement, 2006; Chung ve Leibel, 2005).

PWS, 15q11-13 kromozomun babadan (paternal) gelen allelinin fonksiyonel kaybı sonucu meydana gelmektedir ve her 15000 ila 30000 doğumdan biri, bu sendromdan etkilenmektedir. PWS'li çocuklarda nispeten girelin yüksek seviyelerde bulunduğu için, hiperfaji (aşırı oburluk) ve aşırı kilo kazanımı gibi durumlar obeziteye katkıda bulunmaktadır (Mason ve ark., 2015).

BBS, nadir görülen sendromik bir hastalık olup, otozomal resesif bir geçiş göstermektedir. Hastaları fenotipik olarak ayırt etmek mümkün olmamakla birlikte hastalığa neden olan 12 farklı gen tanımlanmıştır (Chung, 2012). Bu grup hastalıkların prevalansı coğrafik bölgeye bağlı olarak 13500 ila 160000 bireyde bir gözükmektedir. Enerji dengesizliğinin leptin aktivitesindeki eksiklikten meydana geldiği düşünülmektedir. Erken obezite başlangıcı, kavramsal yetersizlik, gecikmiş ergenlik, renal anomaliler, post-aksiyal polidaktili ve distrofi gibi klasik özellikler görülmektedir (Mason ve ark., 2015).

AS, nadir görülen (Her 1,000,000 insandan birinden daha az) otozomal resesif bir hastalıktır, genetik olarak homojen rahatsızlık olarak karakterize edilmektedir. Genellikle yaşamın ilk yılından itibaren başlar ve kalori sınırlandırmaları yapılmadıkça hayat boyu devam etmektedir (Chung, 2012). Sendrom, ALMS1 genindeki bir mutasyondan kaynaklanmaktadır (Girard ve Petrovsky, 2011).

### 2.4.3. Poligenik Obezite

Poligenik ya da ‘yaygın’ obezite, bir bireyin genetik karakterinin, enerji alımı-tüketimi arasındaki dengesizliklerden doğan çevresel etmenlere yatkınlığı sonucu meydana gelmektedir. Birçok batı toplumunda çevre, kilo kaybından çok kilo alımına elverişli olup, fiziksel aktivite eksikliği ve bol yiyecek, poligenik obezite riskini bu toplumlarda arttırmaktadır (Mutch ve Clement, 2006).

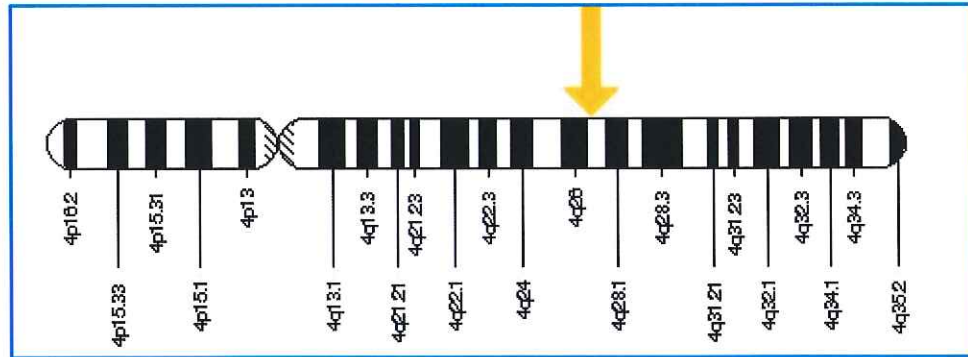
### 2.5. ANXA5 GEN AİLESİ

Anneksin (ANXA5) geni süper-ailesi, kalsiyum metabolizması, hücre adhezyonu, hücreler arası transport, büyüme ve farklılaşma ile alakalı moleküller olan kalsiyum, fosfolipitler ve bazı bilinmeyen reseptörlere affinite gösteren 4 homologlu tekrarlı yapısı son derece korunmuş kendine mahsus bir özelliğe sahiptir. Anneksinler, başarılı gen duplikasyonları yoluyla zamanla evrimleşmişlerdir. Farklı türlerin (bitki, fungi, protista, hayvan) moleküler filogenetik analizleri, gen yapıları ve genetik linkaj haritaları incelendiğinde, ANXA5 genlerinin yapı ve fonksiyonel olarak birbirine benzediğini ve diğer türlerin ANXA5 geni oluşum mekanizmasının insandaki ile paralel evrimselleşme süreci izlediği sonucuna varılmıştır. 125 ökaryotik türde yapılan filogenetik, gen organizasyonu ve genetik linkaj analizleri sonucu, en az 60 farklı gen alt familyası ve 500’den fazla anneksin geni tanımlanmıştır. ANXA5 geni subfamilyaları, ‘A’ dan ‘E’ ye kadar 5 temel bölüme ayrılarak bulunduğu türde omurgalı, omurgasız, fungi, bitki ve protistalarda uygun olduğu gen grubuna dahil edilmiştir.

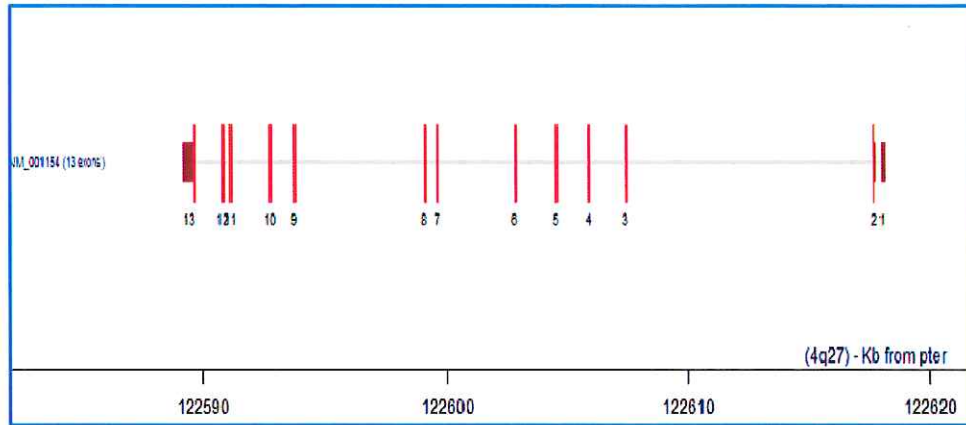
Anneksin A ailesi, 12 insan ANXA5 geninden meydana gelmektedir ve omurgalılarda predominanttır. B ailesi, diğer tüm omurgasız hayvanlarda bulunmaktadır ve insanlarda olmayan en az 20 farklı anneksin geni sunmaktadır. Diğer farklı türlerde ‘C, D, E’ familyaları tanımlanmıştır (Fernandez ve Morgan, 2003).

### 2.5.1. ANXA5 Geni

ANXA5 geni (Gen ID: 308), 4 numaralı kromozomun uzun kolunda (4q28.q32) lokalizedir, 1.6 kb uzunluğunda ve 320 amino asitlik bir polipeptidi kodlayan 13 tane ekzon bölgesi (Şekil 2.4. ve Şekil 2.5.) içermektedir. ANXA5 ayrıca, plasental antikoagulant protein I, vasküler antikoagulant- $\alpha$ , endoneksin II, lipkortin V, plasental protein 4 ve ankorin CII olarak da bilinmektedir (Seok ve ark., 2013).



**Şekil 2.4.** ANXA5 Geninin 4.Kromozom Üzerindeki Yerleşimi  
(<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ANXA5>)



**Şekil 2.5.** ANXA5 Geninin Ekzon Bölgelerinin Gösterimi ([http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_ANXA5.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ANXA5.html))

ANXA5 geni ilk kez 1994 yılında Cookson ve ark.'ları tarafından tanımlanmıştır. Daha sonraki yıllarda (Van Heerde ve ark., 1999) ANXA5 geninde Kozak sekansı (-1C>T) polimorfizmi keşfedilmiştir (Van Goor ve ark., 2005). Kozak sekansı polimorfizmi (ref SNP ID rs11575945, -1C>T) genin ekzon 2 bölgesinde ATG başlama kodonunun yukarı bölgesinde yer almaktadır ve genin bilinen en yaygın polimorfizmlerinden biridir (Hiddink ve ark., 2012; Kenis ve ark., 2003; Van Goor ve ark., 2005). ANXA5 geninin yaygın olarak bilinen bir diğer polimorfizmi, genin ekzon 1 bölgesinde yer alan olan -302T>G, rs1050606 polimorfizmidir (Miyamura ve ark., 2011).

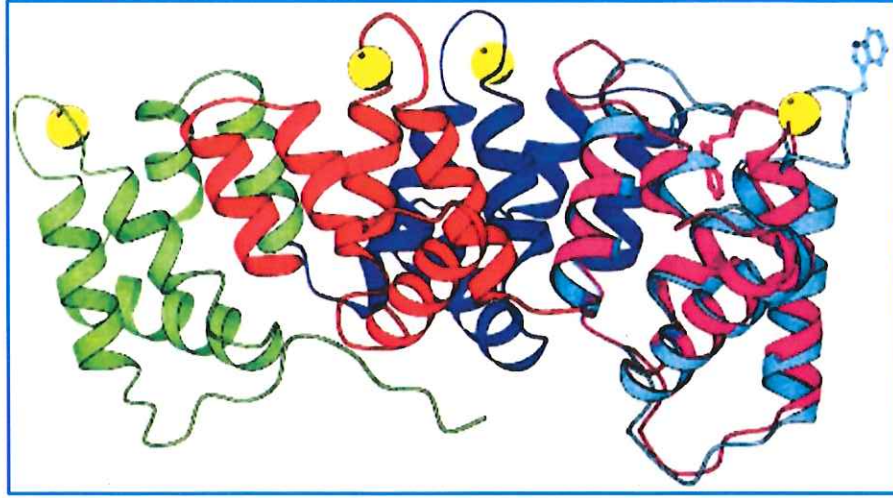
### 2.5.2. ANXA5 Proteini

Anneksin ismi, 'birlikte tutmak/getirmek' anlamına gelen yunanca 'annex' kelimesinden köken almaktadır. Anneksinler, özellikle hücre membranlarındaki bazı biyolojik yapılara birlikte tutunmaları ve bağlanmaları nedeniyle muhtemelen bu temel özelliklerine uygun olan 'annex' terimi tanımlanmıştır. Ancak, başlarda ilk

keşfedildikleri zamanlar olan 1970'lerin sonu ve 1980'lerin başında onların biyokimyasal özelliklerine uygun olmayan, 'synexin, chromobindins, lipocortins, calcimedins ve calpactins' gibi farklı isimlerle de anılmışlardır.

### *Anneksinin Moleküler Yapısı*

Her bir anneksin proteini 2 temel domainden oluşmaktadır: birbirinden ayrılan NH<sub>2</sub>-ucu (head) baş kısmı ve korunmuş COOH-ucu protein çekirdek kısmıdır. Çekirdek kısmında Ca<sup>+2</sup> ve membrana bağlanmayı sağlayan alanlar bulunmaktadır ve bu alanlar sayesinde diğer moleküllerle etkileşim kurulmaktadır. Anneksinin çekirdeği, 4 (ANXA6'da 8) internal (iç) segmentten ve anneksinler arasında homolojisi kolay bir şekilde tanımlanan doğrusal bir dizi sırasından oluşmaktadır. Anneksinin kristal yapısı, çok sayıda  $\alpha$ -helikal ve az bir şekilde hafif olarak bükülmüş sıkıca paketlenmiş disklerden ve iki temel alandan oluşmaktadır. Daha çok dışa bükükey alanlar Ca<sup>+2</sup> bağlayıcı alanların yeni tiplerini içermektedir (Tip II ve Tip III). Anneksin bu kısımlar üzerinden fosfolipidlerle periferik olarak bağlantı kurmaktadır. Daha fazla içe dönük alanlar ise, membrandan uzaktır ve bu yüzden bu alanların NH<sub>2</sub>- ucu domaini ya da sitoplazmadaki bağlayıcı moleküllerle etkileşim kurmada rol oynadıkları bilinmektedir (Şekil 2.6.) (Gerke ve Moss, 2002; Huber ve ark., 1990).



**Şekil 2.6.** İnsan ANXA5 Proteinin Kristal Yapısı. ANXA5 proteinin yapısı ilk kez 1990 yılında Huber ve ark.'ları tarafından çözülmüştür. Şekilde farklı renklerde gösterilmiş 4 anneksin tekrar domaini gösterilmektedir. Yeşil: Tekrar I, Mavi: Tekrar II, Kırmızı: Tekrar III ve mor/Açık Mavimsi: Tekrar IV. NH<sub>2</sub> ucu domaini molekülün şekilsiz ve iç bükey kısma doğru genişleyen kısmında (yeşil) yerleşmiştir. Tekrarı düşük ve yüksek Ca<sup>+2</sup> yoğunluğuna bağlı olarak konformasyonel değişiklik gözlenmektedir (Huber ve ark., 1990).

ANXA5, negatif yüklü fosfolipit yüzeyleri bağlayan kalsiyum-bağımlı proteinlerden olan anneksin ailesine ait bir proteindir ve ilk başlarda antikoagulant ve antitrombotik bir protein olarak keşfedilmiştir. Bu proteininin, protrombinaz kompleksini engellediği ve doku faktörü ekspresyonu yüzeyini down regüle ettiği gösterilmiştir. ANXA5'in şuan anti-inflamatuar ve anti-aterosklerotik özellikleri vardır, ve interferon  $\gamma$  sinyalini düzenlediği ettiği bilinmektedir (Ewing ve ark., 2012).

ANXA5, plateletler ve endotel hücrelerinde bol miktarda bulunan hücre içi bir proteindir ve lipit membranlardaki anyonik fosfolipitler için yüksek derecede afinite sergiler. Bu afinitesine dayanarak, flouresans etiketli- ANXA5, çoğunlukla akış sitometrik analizlerinde kullanılmaktadır. Bu şekilde, apoptoz yolağına giren hücreler belirlenmektedir ki bu esnada membrandaki lipit yoğunluğu hızlı bir şekilde

değişmektedir. ANXA5, sinsitiyotrofoblast membran füzyonu ve ekzositozu düzenleyen etkili bir antikoagulanttır. Kanseri hücrelerinde ANXA5'in ekspresyonu, hücresel enerji metabolizmasında ve membran düzenleyici fonksiyonunda ilişkili olan tümör infiltrasyonunda önemli bir faktördür. ANXA5 inflamatuvar maddelerin zararlarına karşı lipid membranı bariyerini korur, inflamatuvar moleköl seviyeleri ve obezite arasında bir ilişki vardır. Bu bulgulara göre, ANXA5 lipid metabolizmasında rol oynayabilmektedir (Seok ve ark., 2013).

### 3.MATERYAL VE METOD

#### 3.1.HASTA VE KONTROL GRUPLARININ TOPLANMASI

Bu tez çalışmasında, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniğine obezite şikayeti ile başvuran, antropometrik ölçümlerine göre obezite tanısı alan, yaşları 6-17 arasında değişen 200 okul çağında çocuk hasta grubu ile aynı yaş aralığında bulunan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniğine başvuran antropometrik ölçümlere göre obezite tanısı almayan ve bu çalışmaya katılmayı kabul eden 150 okul çağında çocuklardan oluşan sağlıklı kontrollerden EDTA'lı tüplere 5'er ml kan alındı ve kanlar +4°C 'de muhafaza edildi. Hasta ve kontrol grubundaki çocukların ailelerinden çalışmamıza dahil edildiklerine dair izinleri alındı. Obezite tanılı ve kontrol grubundaki çocukların çalışmaya dahil edilip edilmeme kriterleri Tablo 3.1.'de verilmiştir.

Bu çalışma için, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Değerlendirme Komisyonunun 14.10.2014 tarihli toplantısında 14-KAEK-204 kayıt numarası ile onay alınmıştır. Çalışmanın tamamı Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarları'nda yapıldı. Alınan kanlar kit yöntemi ile saflaştırılarak DNA'ları elde edildi. Elde edilen DNA'ların genotiplendirme işlemi için, allel spesifik TaqMan® Hidroliz Prob Kantitatif Real-Time PZR tekniği kullanıldı.

Çalışmalarımız Gaziosmanpaşa Üniversitesi etik kurulu yönergeleri doğrultusunda yapıldı.

**Tablo 3.1.** Hasta ve Kontrol Grubu- Çalışmaya Dahil Edilip Edilmeme Kriterleri

|                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Dahil Edilme Kriterleri</b></p>   | <p><b>Hasta Grubu</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiçbir rahatsızlığı bulunmaması</li> <li>• Eksojen obezite tanısı konulmuş olması</li> <li>• 6-17 yaş aralığında olması</li> <li>• Yazılı bilgilendirilmiş hasta olur formunu imzalamış olması</li> <li>• VKİ &gt;95 Persentil olması</li> </ul> <p><b>Kontrol Grubu</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiçbir rahatsızlığı bulunmaması</li> <li>• Eksojen obezite tanısı konulmamış sağlıklı bir birey olması</li> <li>• 6-17 yaş aralığında olması</li> <li>• Yazılı bilgilendirilmiş kontrol olur formunu imzalamış olması</li> </ul> |
| <p><b>Dahil Edilmeme Kriterleri</b></p> | <p><b>Hasta Grubu</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Herhangi bir metabolik ve/veya nörolojik bozukluğu olanlar, Okuma-yazma bilmeyen çocuk ve ergenler</li> <li>• Eksojen obezite tanısı konulmamış olması</li> <li>• 6-17 yaş aralığı dışında olması</li> <li>• Yazılı bilgilendirilmiş hasta olur formunu imzalamamış olması</li> <li>• VKİ &gt;95 Persentil olmaması</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                         |

| Dahil Edilmeme | Kontrol Grubu                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kriterleri     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Herhangi bir metabolik ve/veya nörolojik bozukluğu olanlar, Okuma-yazma bilmeyen çocuk ve ergenler</li> <li>• Eksojen obezite tanısı konulmuş olması</li> <li>• 6-17 yaş aralığı dışında olması</li> <li>• Yazılı bilgilendirilmiş kontrol olur formunu imzalamamış olması</li> </ul> |

### 3.2.ÇALIŞMADA KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

#### 3.2.1.Cihazlar ve Sarf Malzemeler

- Mikropipet Seti (Gilson)
- 10 µl, 200 µl, 1000µl'lik Pipet Uçları (RNaz DNAaz Free, Gilson)
- Etüv (Memmert, Beschickung-Loading 100-800)
- Otoklav (HMC Hirayama, HV-25L)
- Su Banyosu (Memert)
- Vorteks (Velp Scientifica, F20220176)
- Mikrosantrifüj (Mikro120, Hettich Zentrifugen D-78 532n)
- + 4°C ve – 20 °C Buzdolapları (Vestel, Arçelik )
- Real-Time PZR Cihazı (Real Time PCR, Applied Biosystem Step One Plus)
- MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Seri No 4346906 ve 4366932)

- MicroAmp® 96-Well Support Base (Seri No 4379590)
- MicroAmp® Optical Adhesive Film (Seri No 4360954 ve 4311971)
- Bilgisayar (Dell, Intel Core İ5; Sony Vaio Intel i5)
- Qubit® 2.0 Fluorometer Cihazı
- Saf Su Cihazı

### 3.2.2.Kimyasal Maddeler

- DNA İzolasyon Kiti (Geneall)
- TaqMan® SNP Assays ANXA5 Genotyping Assay rs1050606
- Taqman® SNP Assays ANXA5 Genotyping Assay rs11575945
- TaqMan® Genotyping Master Mix
- Nükleaz İçermeyen Su
- Qubit® dsDNA BR Assay Kit
- Saf Etanol (Merck)

## 3.3.YÖNTEM

### 3.3.1.Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Hasta ve kontrol gruplarından alınan 5 ml kan örnekleri vakumlu EDTA'lı tüplere alındı. DNA izolasyon aşamasına kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Periferik kandan DNA izolasyonu için, GeneAll® Exgene™ Blood SV kiti kullanıldı ve izolasyon aşamaları kitin prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Uygulanan kit protokolü adımları aşağıda verilmiştir.

1. Kanlar vortekslendi
2. 1,5 ml'lik ependorf tüplere sırasıyla 20 µl proteinaz K, 200 µl kan eklendi, 1-2 saniye vortekslendi, sonra 20 µl RNAazA eklendi
3. 1-2 saniye vortekslendi, oda sıcaklığında yaklaşık 2 dakika inkübe edildi
4. Üzerine 200 µl BL tampon çözeltisi ilave edildi ve 1-2 saniye vortekslendi
5. 10 dakika sıcak su banyosunda 56 °C 'de inkübasyona bırakıldı
6. Üzerine 200 µl saf etanol eklendi ve 1-2 saniye vortekslendi
7. Karışım SV kolonlara dikkatli bir şekilde aktarıldı ve 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi
8. Filtreli kısımda bulunan atık toplama tüpü atıldı ve yerine yenisi takıldı
9. Üzerine 600 µl BW tampon çözeltisi eklendi ve 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi
10. Filtreli kısımda bulunan atık toplama tüpü atıldı ve yerine yenisi takıldı
11. Üzerine 700 µl TW tampon çözeltisi eklendi ve 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi
12. Yıkama solüsyonlarının kalıntılarından tamamen kurtulmak için, boş tam hızda (140000 rpm) 1 dakika birkaç kez santrifüj edildi

13. Filtreli kolan son aşamada 1,5 ml'lik ependorflara takıldı
14. Üzerine 200 µl AE tampon çözeltisi eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi
15. Tam hızda (140000 rpm) 1 dakika santrifüj edildi
16. Ependorflara etiketleme işlemi yapıldı ve izole edilen genomik DNA çalışma aşamasına kadar saklanılmak üzere -20°C'de muhafaza edildi.

### 3.3.2.Kantitatif Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), in vitroda DNA'nın amplifikasyonu için hızlı ve güçlü bir tekniktir (Gibson ve ark., 2015). Saiki ve ark.'ları (1985) ile Mullis ve ark.'ları (1986–1987) tarafından PZR'nin tanımlanmasından sonra Higuchi ve ark.'ları interkalasyon yapan bir boyanın “Real-time PZR” kullanılması ile biriken PZR ürünlerini belirleyen bir sistem oluşturarak PZR kinetiklerini analiz edilebilir hale getirdi (Raymaekers et al., 2009; Vural, 2009).

Real-time PZR, DNA'nın amplifikasyonunu ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan çok yakın bir zamanda uygulamaya konulan popüler bir metottur. Gen anlatımının analizini değiştiren bu metot ile geleneksel PZR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PZR çoğaltımını görünür hale getiren ve aynı zamanda o anda monitorize edebilen floresan isaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Real-time PZR, “kinetik PZR”, “homojen PZR”, “kantitatif Real-time PZR” gibi farklı sinonimlerle de adlandırılmaktadır (Günel., 2007).

#### Real-Time PZR Tekniği Uygulamaları Alanları:

- Genomik veya viral DNA'ların DNA kopya sayısının belirlenmesinde
- Kantitatif mRNA ifade çalışmalarında
- DNA hasar ölçümlerinin belirlenmesinde
- Hastalık tanılamada
- Onkoloji çalışmalarında
- Mikrobiyolojide
- Araştırmaya yönelik çalışmalarda
- Fitopatojenlerin belirlenmesinde
- GDO'ların belirlenmesinde
- Klinik çalışmalarda miktar belirleme ve SNP genotiplendirmede
- İlaç tedavisi etkinliğinin belirlenmesinde tercih edilmektedir  
(Atlas Biyoteknoloji)

Bugün birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan Real-Time PZR cihazları mevcuttur (Şekil 3.1.). Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıkları, hızları ve kanal sayıları ile ayrılırlar. Ticari olarak satılanlar; “Stratagene M x 3000p, M x 3005p ve M x 4000”, “Applied Biosystems 7300 ve 7500”, “Chromo4”, “Smart Cycler”, “Rotor-Gene”, “LightCycler” en fazla kullanılanlardır (Günel., 2007).



**Şekil 3.1.** Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PZR Cihazı

Real-time PZR' da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Real-time PZR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresan boyalardan ya da diziye özgün problardan yararlanılmaktadır.

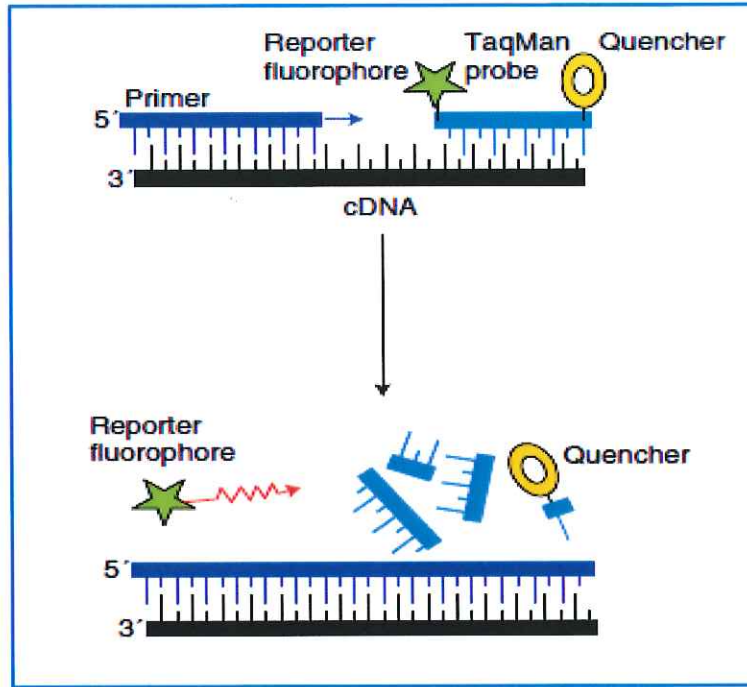
Son 15 yıl içerisinde, real-time PZR yöntemi ile DNA'yı belirlemek için çok sayıda metot tanımlanmıştır. Bu metotları iki temel gruba ayırmak mümkündür; ilk grup floresans ajanların kullanımı, ikinci grup ise diziye özgü problemlerin kullanımıdır. İlk grup, SYBR Green I ve Eva Green gibi çift zincirli DNA'nın arasına girerek bağlanan ajanların olduğu gruptur. Bu boyalar diziye özgü olmayan floresan boyalar olup, hem spesifik hem de spesifik olmayan amplifikasyon ürünlerine bağlanırlar.

Öte yandan diğer grup, oligonükleotidlere bağlanan floroforlar olarak iş görürler ve sadece spesifik PZR ürünlerini belirlemektedirler. Bu grup, PZR reaksiyonuna eklenen floresans molekülün tipine göre, 3 alt gruba ayrılmıştır: 1) primer problemler (primerler gibi fonksiyon görürler), 2) hidroliz problemler (uzama fazında bozunma ile birlikte floresan ışığı yayarlar ) ve hibridizasyon problemler (amplifikasyon reaksiyonu

sırasında hedef DNA'ya bağlandığı zaman floresans bir sinyal verirler), 3) analog nükleik asitlerdir (Navarro ve ark., 2015).

### 3.3.2.1. TaqMan® Hidroliz Prob Tekniği

Roche moleküler sistemleri tarafından geliştirilen bu hidroliz problemleri çift etiketli floresans problemleri (DFLP) veya TaqMan® olarak da bilinmektedirler. Taqman metodunun temeli, tamamlayıcı (komplementer) bir hedef ile hibridize edilmiş etiketli bir probdan ayrılan *Thermus aquaticus* (Taq) DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesine dayanmaktadır (Şekil 3.2.). Probu 5' ucuna bir 'reporter' haberci, 3' ucuna bir 'quencher' söndürücü bağlanmaktadır. Tamamlayıcı amplicon, probta mevcut değil ise, prob bozunmadan kalır ve düşük floresans belirlenir. Eğer PZR tamamlayıcı bir hedef ile sonuçlanırsa, PZR'ın her bir annealing adımında, prob tamamlayıcı hedef dizisine bağlanır. Taq polimerazın çift iplikli nükleaz aktivitesi, probun 5' ucu ile yer değiştirir ve sonra Taq polimeraz probu degrades eder. Bu işlem, 'reporter' ve 'quencher'ın serbest kalmasını sağlar ve probtan uzaklaşan 'reporter' floresan ışımaya yayılır (Sigma, qPCR technical guide). Özellikle döngü sayısının artışı ile beraber floresan ışımaya seviyesindeki artış, doğrudan üretilen PZR amplicon miktarı ile orantılıdır. TaqMan® sisteminin ana avantajı, sadece istenilen PZR ampliconu oluştuğu zaman floresan ışımaya artar (Smith, 2013). Probu, primerler uzamadan önce kalıbı hibridizlediğinden emin olmak için reaksiyon şartları kontrol edilmelidir. Genellikle prob hibridize tasarımı yapılırken, primerlerin Tm değerinden 8-10°C üzerinde tasarlanır ve polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesinden maksimum seviyede yararlanmak için uzama adımında daha düşük bir sıcaklıkta çalıştırılmalıdır (Sigma, qPCR technical guide).



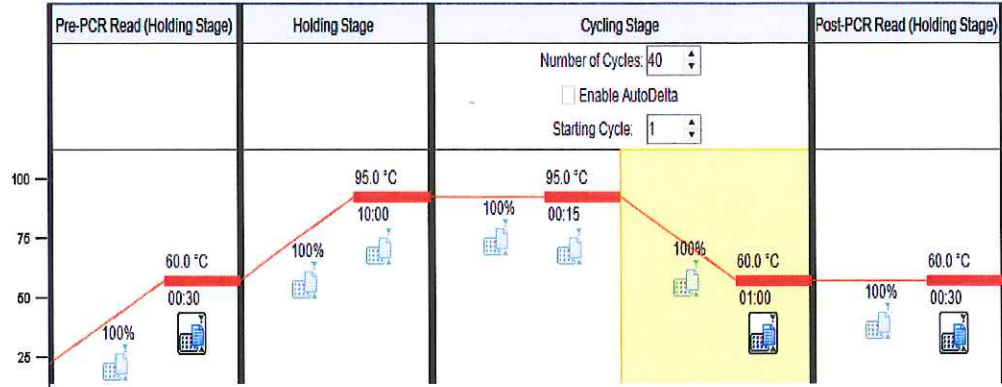
**Şekil 3.2.** TaqMan® Hidroliz Proplarının Temel Çalışma Prensibi (Arya ve ark., 2005)

### 3.3.3.DNA'nın Kantitatif Tayini

Çalışmada kullanılan DNA örneklerin miktar tayini için, Qubit® dsDNA BR Assay Kit 500 assays 2–1000 ng (katolog no: Q32853) kit protokolü uygulanmış olup ölçümler kit ile uyumlu Qubit® 2.0 Fluorometer cihazında hesaplanmıştır.

### 3.3.4.ANXA5 Geni rs1050606 (-302T>G) Polimorfizminin Real-Time PZR İle Kantitasyonu

Bu çalışmada kullanılan ANXA5 geni rs1050606 (-302T>G) polimorfik bölgesi için özel olarak hedef bölgeye özgü olarak tasarlanan TaqMan® SNP Genotyping prob ve primer çiftleri tedarikçi firma tarafından sağlanmıştır. rs1050606 (-302T>G) polimorfik bölgesi için kullanılan qPZR programı Şekil 3.3.'te verilmiştir.



**Şekil 3.3.** ANXA5 Geni rs1050606 (-302 T>G) Polimorfik Bölgesi İçin Kullanılan Real-Time PZR Programı (Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems)

Her bir pleytin kuyucuğuna konulan örnek için uygulanan Real-Time PZR koşulları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** ANXA5 Geni rs1050606 (-302 T>G) Polimorfik Bölgesi İçin Kullanılan Real-Time PZR Bileşenleri

| Bileşenler                                 | µl/ Kuyu  |
|--------------------------------------------|-----------|
| 2XTaqMan® Genotyping Master Mix            | 5.6       |
| 20XTaqMan® SNP Genotyping Assays rs1050606 | 0.4       |
| Genomik DNA                                | 5         |
| <b>Total Hacim</b>                         | <b>11</b> |

Tedarikçi firma olan Applied Biosystems, StepOnePlus™ Real-Time PZR cihazı için önerdiği total hacim her bir kuyu başına 25 µl bileşenleri içermelidir. Ancak çalışmamız için seri dilüsyon yaparak kullanılan bileşenlerin miktarları optimize edilmiştir.

Çalışmada, rs1050606 (-302T>G) polimorfik bölgesi için kullanılan TaqMan® SNP Genotiplendirme prob ve primer çiftleri tedarikçi firma tarafından sağlanmıştır. Allele spesifik prob ve primerlerin sekansı, polimorfik bölgenin rs numarası verilmek suretiyle firma tarafından karşılandı (www.thermofisher.com).

### 3.3.5. ANXA5 Geni rs11575945 (-1C>T) Polimorfizminin Real-Time PZR İle Kantitasyonu

Bu çalışma için, ANXA5 geni rs11575945 (-1C>T) kantitasyonunu belirlemek amacıyla, hedef bölgeye özgü, özel olarak dizayn edilmiş TaqMan® prob ve primer çiftleri kullanılmış olup, Tablo 3.3. ve Tablo 3.4.'te gösterilmiştir.

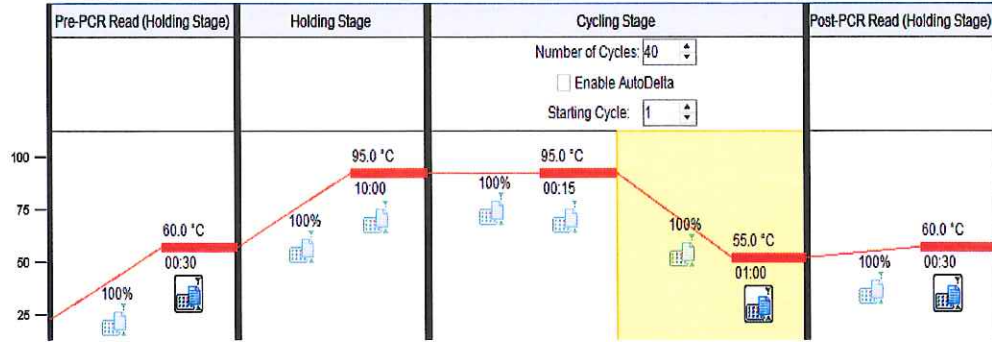
**Tablo 3.3.** ANXA5 Geni rs11575945 (-1 C>T) Polimorfik Bölgesi İçin Dizayn Edilen Prob Çiftleri

|                                                          |
|----------------------------------------------------------|
| <b>rs11575945 TaqMan® Dizayn Problemleri</b>             |
| FAM-5-CCTGAGTAGTCGC <sup>C</sup> ATGGCACAGGTA-3- BHQ-1   |
| VIC- 5- TACCTGTGCCAT <sup>T</sup> GCGACTACTCAGG-3- BHQ-1 |

**Tablo 3.4.** ANXA5 Geni rs11575945 (-1 C>T) Polimorfik Bölgesi İçin Dizayn Edilen Primer Çiftleri

|                                      |
|--------------------------------------|
| <b>rs11575945 Primerler</b>          |
| Forward: 5'- TTGCAGTCCTGCTTCACCT-3'  |
| Reverse: 5'-TCGCAGCATACAAAGTTGTGG-3' |

rs11575945 (-1 C>T) polimorfik bölgesi için kullanılan qPZR programı Şekil 3.4.'te verilmiştir.



**Şekil 3.4.** ANXA5 Geni rs11575945 (-1C>T) Polimorfik Bölgesi İçin Kullanılan Real-Time PZR Programı (Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems)

Her bir platenin kuyucuğuna konulan örnek için uygulanan Real-Time PZR Bileşenleri Tablo 3.5.'de verilmiştir.

**Tablo 3.5.** ANXA5 Geni rs11575945 (-1C>T) Polimorfik Bölgesi İçin Kullanılan Real-Time PZR Bileşenleri

| Bileşenler                                  | µl/ Kuyu |
|---------------------------------------------|----------|
| 2XTaqMan® Genotyping Master Mix             | 5.4      |
| 20XTaqMan® SNP Genotyping Assays rs11575945 | 0.4      |
| Forward: 5' - TTGCAGTCCTGCTTCACCT-3'        | 0.6      |
| Reverse: 5' -TCGCAGCATACAAAGTTGTGG-3'       | 0.6      |
| Genomik DNA                                 | 5        |
| <b>Total Hacim</b>                          | 12       |

Tedarikçi firma olan Applied Biosystems, StepOnePlus™ Real-Time PZR cihazı için önerdiği total hacim her bir kuyu başına 25 µl bileşenleri içermelidir. Ancak çalışmamız için seri dilüsyon yaparak kullanılan bileşenlerin miktarları optimize edilmiştir.

### 3.4.İSTATİSTİKSEL YÖNTEMLER

Verilerin istatistiksel analizi için Epi Info Software 3.2.2 programı kullanıldı. P değeri 0.05'den küçük bulunan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Tespit edilen genotip sıklıkları için, Hardy-Weinberg dengesinden hastalarda sapma olup olmadığı ve kontrollerde ise, uyumlu olup olmadığı Fischer'in Ki-Kare ( $\chi^2$ ) testi ile belirlendi.

## 4.BULGULAR

### 4.1.ARAŞTIRMA GRUBUNA AİT BULGULAR

Bu çalışma için, Tokat ve çevresinden Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniğine başvuran ekzojen obezite tanısı almış, yaş ortalaması  $11,6 \pm 2,79$  (en düşük 6, en yüksek 17) olan 200 çocuk hasta ve yaş ortalaması  $10,95 \pm 3,36$  (en düşük 6, en yüksek 17) olan 150 çocuk kontrol dahil edildi. Çalışmada, obezite grubunda 127 (% 64) kız çocuk ve 73 (% 36) erkek çocuk ile kontrol grubunda, 82(% 55) kız çocuk ve 68(% 45) erkek çocuk birey yer aldı. Çalışmaya katılan hem hasta hem de kontrol gruplarının yaş ve cinsiyetleri Hardy-Weinberg dengesine göre birbiri ile uyumlu olduğu tespit edildi.

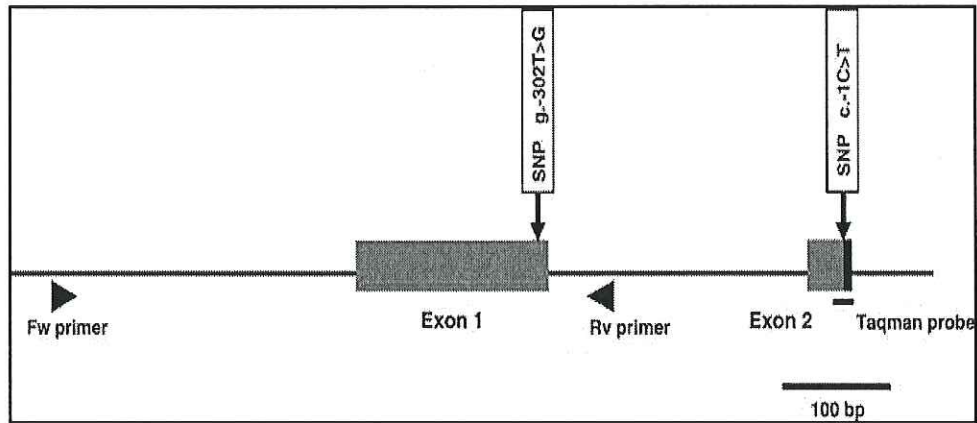
Çalışma gruplarının, cinsiyet, yaş ortalamaları ve VKİ dağılımı Tablo 4.1.'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Hasta ve Kontrol Gruplarına Ait Cinsiyet, Yaş Ortalamaları ve VKİ Dağılımları

|                 | Obezite Grubu<br>(N=200) | Kontrol Grubu<br>(N=150) | P     |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|-------|
| <b>CİNSİYET</b> |                          |                          |       |
| Kız Çocuk       | 127 (% 64)               | 82(% 55)                 | 0.097 |
| Erkek Çocuk     | 73 (% 36)                | 68(% 45)                 |       |
| <b>KARAKTER</b> |                          |                          |       |
| Yaş Ortalaması  | $11,6 \pm 2,79$          | $10,95 \pm 3,36$         | 0.049 |
| VKİ             | $28,15 \pm 4,6$          | $20,08 \pm 1,6$          |       |

#### 4.2.KANTİTATİF REAL TIME PZR VERİLERİ

Bu çalışmada çocukluk çağı obezitesinde önemli bir rol oynayabileceğini düşündüğümüz ANXA5 geninin iki farklı SNP'leri olan rs1050606 (-302T>G) ve rs11575946 (-1C>T) polimorfik bölgelerindeki değişimin obezite ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Real-Time PZR çalışma koşulları ve uygulanan programın tarafımızdan gerekli optimizasyonu yapıldı ve tüm laboratuvar çalışmaları anabilim dalımız Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarları'nda yapılmıştır. Analizi yapılan SNP'lerin gen üzerinde yerleşimleri Şekil 4.1. 'de gösterilmiştir.



**Sekil 4.1.** ANXA5 Geni Promotör Varyantları. rs1050606 (Ekzon 1, -302T>G) ve rs11575945 (Ekzon 2, -1C>T). Ekzonlar gri renkli kutular halinde gösterilmiştir, kodlanan bölge ise, siyah renkli bir kutu halinde ifade edilmiştir (Miyamura ve ark., 2011).

Bu çalışmada her iki ANXA5 geni rs1050606 ve rs11575945 SNP'leri genotiplendirme analizleri için yaş ortalaması  $11,6 \pm 2,79$  olan 200 obez çocuk hasta ve yaş ortalaması  $10,95 \pm 3,36$  olan 150 kontrol grubuna TaqMan® Hidroliz Prob Kantitatif Real-Time PZR tekniği kullanıldı.

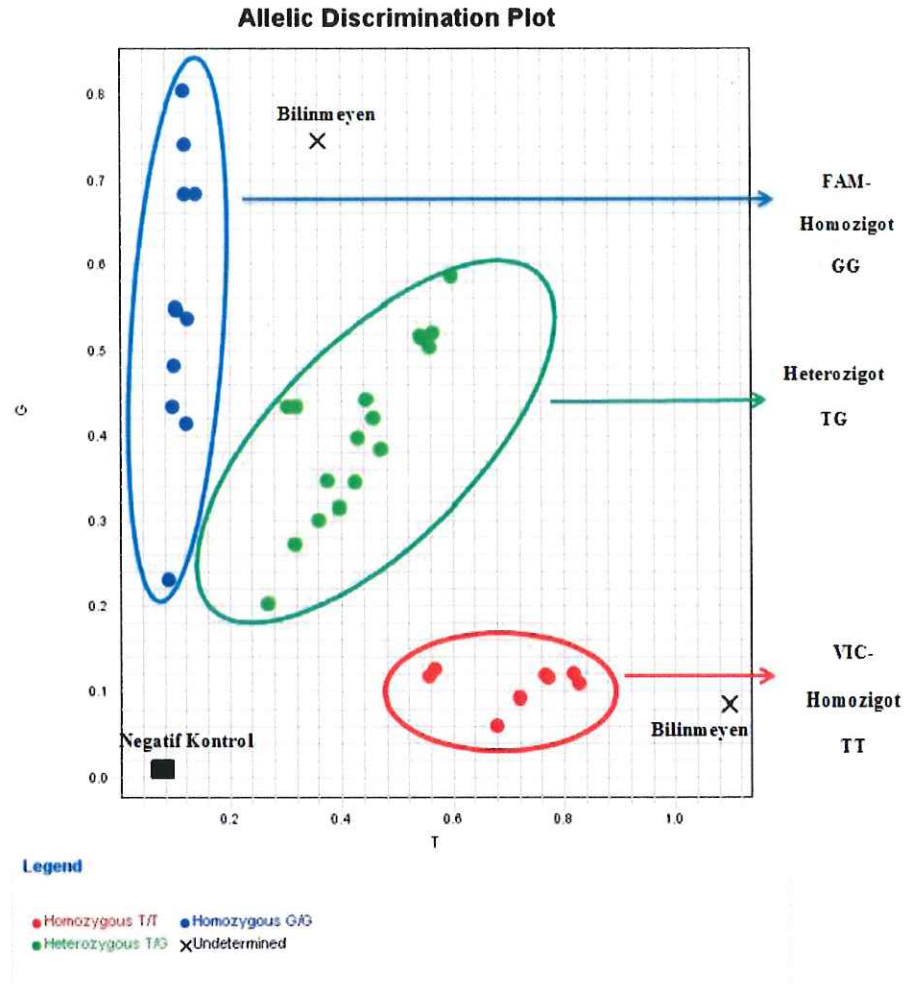
Bu tez için yapılan genotiplendirme çalışmaları için Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PZR Systems cihazı ve software yazılım programı ile TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol (PN 4332856) protokolü uygulandı. (info.appliedbiosystems.com/steponeplus)

#### **4.3.ANXA5 GENİ SNP (-302T>G, rs1050606) REAL-TİME PZR VERİLERİ**

Her biri allel spesifik olan TaqMan®MGB problemlerinin 5'ucunda bir tane 'reporter' haberci boya bulunmaktadır. VIC®boyası, 1. allel spesifik probun 5'ucunda, FAM™ boyası ise, 2. allel spesifik probun 5'ucunda bağlıdır.

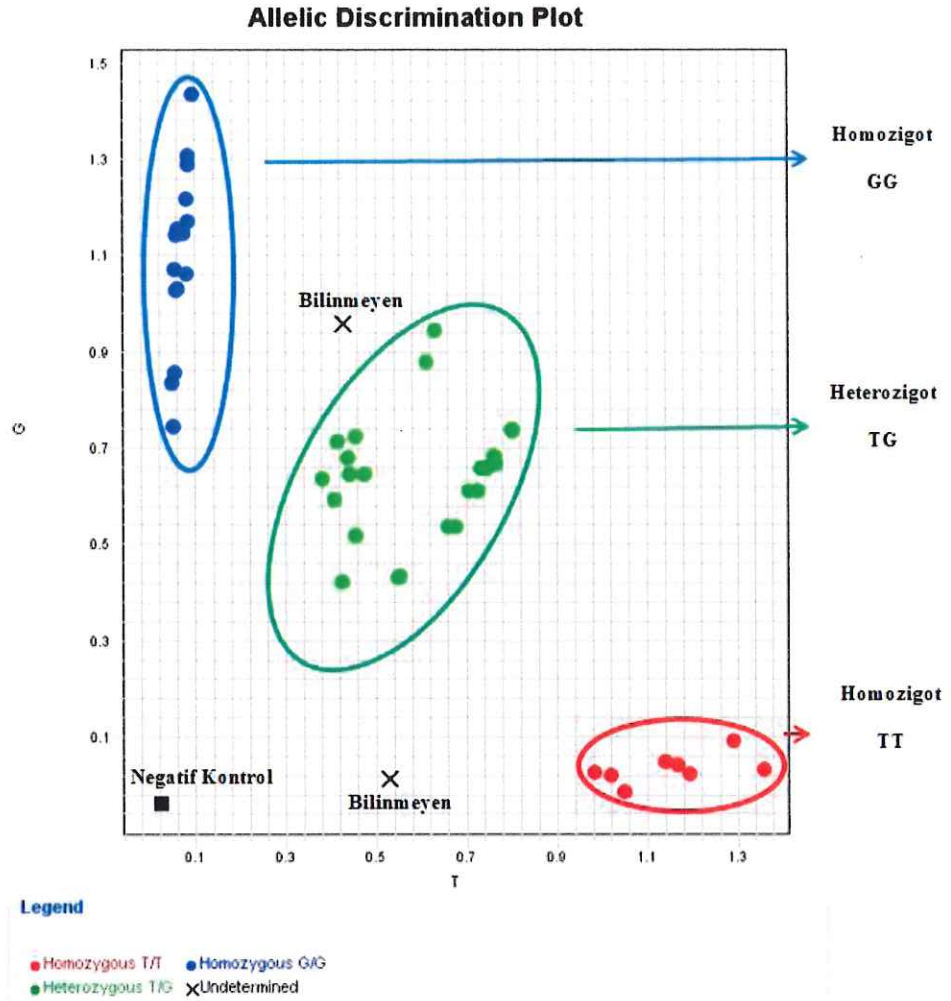
##### **4.3.1. SNP rs1050606 Allelik Ayrım Grafiği**

Çocuk obez hasta ve kontrol gruplarına ait -302 T>G, rs1050606 SNP 'nin allel spesifik olarak genotiplendirme işlemi 'Allelic Discrimination Plot' Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.2.**Hastalara Ait ANXA5 -302T>G TaqMan® Prob qPZR Allelik Diskriminasyon Grafiği.

- (Mavi) FAM™ Etiketli Mutant Prob- Homozigot GG
- (Kırmızı) VIC® Etiketli Atasal Prob- Homozigot TT
- (Yeşil) VIC® ve FAM™ Etiketli Prob- Heterozigot TG
- Negatif Kontrol ; X Bilinmeyen



**Şekil 4.3.**Kontrol Grubuna Ait ANXA5 -302T>G TaqMan® Prob qPZR Allelik Diskriminasyon Grafiği

- (Mavi) FAM™ Etiketli Mutant Prob- Homozigot GG
- (Kırmızı) VIC® Etiketli Atasal Prob- Homozigot TT
- (Yeşil) VIC® ve FAM™ Etiketli Prob- Heterozigot TG
- Negatif Kontrol ; X Bilinmeyen

rs1050606 -302T>G varyantına ait genotiplendirme analiz bulgularına göre, (Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.) kırmızı renkli noktalar homozigot allel TT genotipinin

bulunduğu kümeler olup, hastalarda bu genotipin görülme sıklığı 41(% 20) iken kontrol grubunda TT genotipinin sıklığı 29 (% 19) ; mavi renkli noktalar homozigot allel GG genotipinin bulunduğu kümeler olup, hastalarda bu genotipin görülme sıklığı 58 (% 29) iken kontrol grubunda GG genotipinin sıklığı 48 (% 32) ; yeşil renkli noktalar heterozigot allel TG genotipinin bulunduğu kümeler olup, hastalarda bu genotipin görülme sıklığı 101 (% 51) iken kontrol grubunda TG genotipinin sıklığı 73 (% 49) olarak bulundu. Hastaların ve kontrollerin genotip sıklıkları birbirleri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (p=0,812) (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.2.** ANXA5 rs1050606 (-302T>G) Polimorfik Bölgesinin Hasta ve Kontrol Gruplarındaki Genotip ve Allel Dağılımları

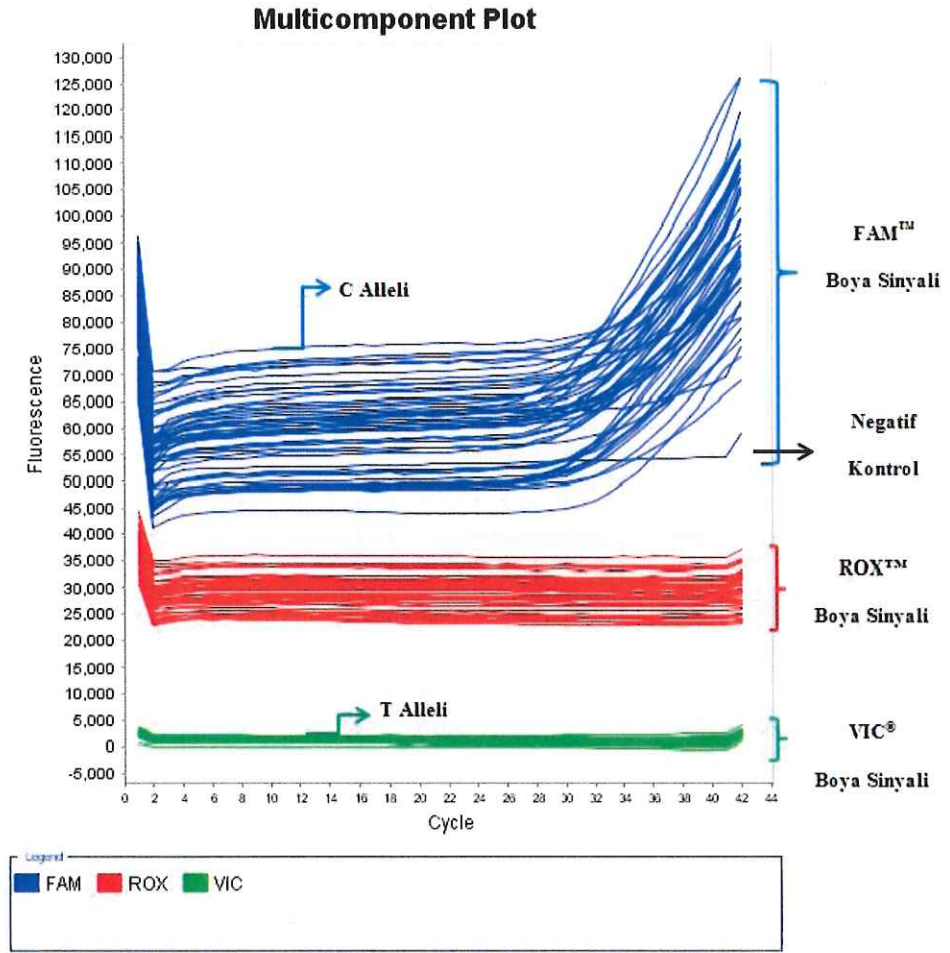
| Sıklığı        | Hasta Grubu<br>N=200 (%) | Kontrol Grubu<br>N=150 (%) | P     | O.R(CI 95%) |
|----------------|--------------------------|----------------------------|-------|-------------|
| <b>Genotip</b> |                          |                            | 0,812 |             |
| TT             | 41 (% 20)                | 29 (% 19)                  |       |             |
| TG             | 101 (% 51)               | 73 (% 49)                  |       |             |
| GG             | 58 (% 29)                | 48 (% 32)                  |       |             |
| <b>Allel</b>   |                          |                            | 0,708 |             |
| T              | 183 (% 46)               | 131 (% 44)                 |       |             |
| G              | 217 (% 54)               | 169 (% 56)                 |       |             |

Tablo 4.2 'daki çalışma gruplarına ait allel frekansları incelendiğinde ise, hasta grubunda T allelinin görülme sıklığı 183 (% 46) iken kontrol grubundaki bireylerde T allelinin görülme sıklığı 131 (% 44) ve hasta grubunda G allelinin görülme sıklığı 217

(% 54) iken kontrol grubundaki bireylerde G allelinin görülme sıklığı 169 (% 56) olarak bulundu. Hastaların ve kontrollerin allel sıklıkları birbirleri ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=0,708$ ).

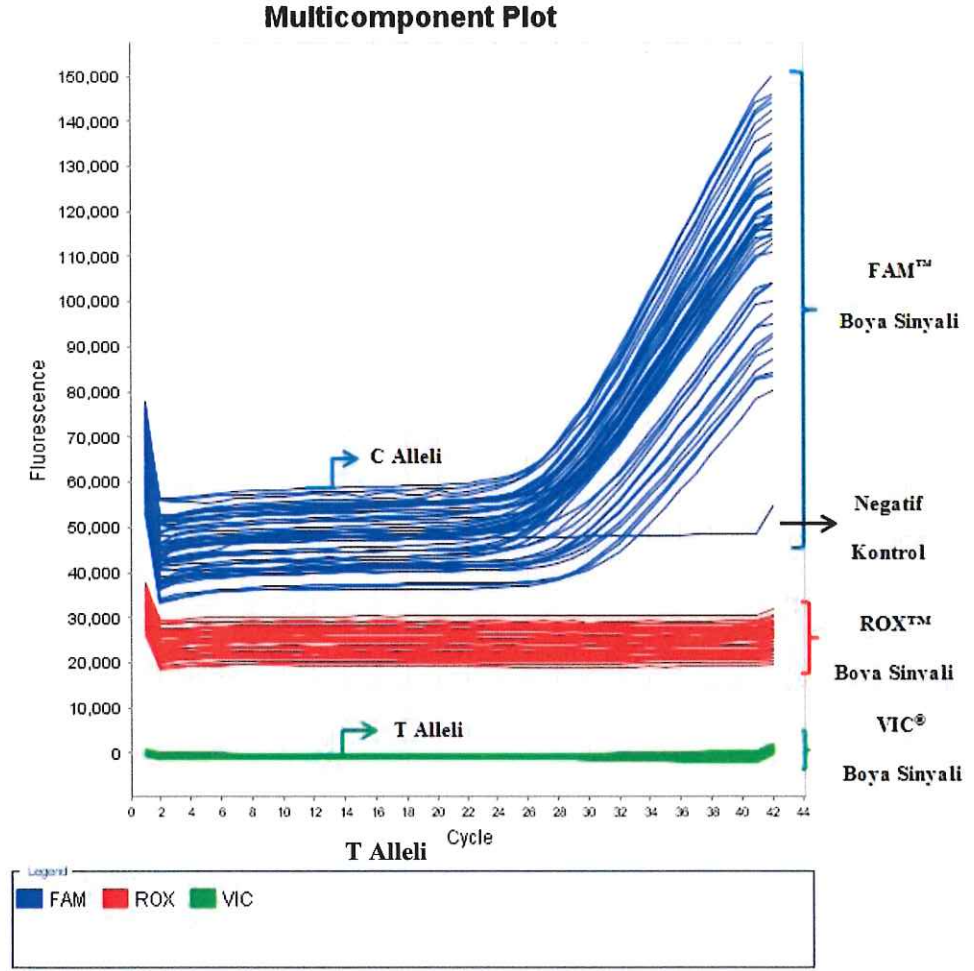
#### **4.4.ANXA5 GENİ SNP (-1C>T, rs11575945) REAL-TİME PZR VERİLERİ**

Çocuk obez hasta ve kontrol grublarına ait -1C>T, rs11575945 SNP 'nin allel spesifik olarak genotiplendirme işlemi 'Multicomponent Plot' Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'te gösterilmiştir.



**Şekil 4.4.** Çocuk Obez Hastalara Ait Multikomponent Grafiği. (Döngü Sayısına Bağlı Olarak Problemlerin Işıma Yoğunlukları)

- (Mavi) FAM™ Boyası
- (Kırmızı) ROX™ Pasif Referans Boyası
- (Yeşil) VIC® Boyası



**Şekil 4.5.** Kontrol Grubuna Ait Multikomponent Grafiği. (Döngü Sayısına Bağlı Olarak Probların Işıma Yoğunlukları)

- (Mavi) FAM<sup>TM</sup> Boyası
- (Kırmızı) ROX<sup>TM</sup> Pasif Referans Boyası
- (Yeşil) VIC<sup>®</sup> Boyası

ANXA5 SNP rs11575945 varyantının hem çocuk hasta hem de kontrol grubundaki (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.) multikomponent eğrisine baktığımızda, her iki grupta da FAM<sup>TM</sup>-boyası etiketli floresan probumuzun (yabanil tip C alleli) PZR süresi boyunca sinyalinin arttığını yani buna bağlı olarak da C allelini taşıyan bireylerde

normal bir şekilde amplifikasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Döngü sayısına bağlı olarak PZR ürünlerinin (amplikon) artışına paralel bir şekilde hasta grubunda 32-34 arası döngü sayısında ve kontrol grubunda ise daha erken 26-28. döngü sayısında liner bir artış (eksponensiyel fazdan lineer faza geçiş) gerçekleşmiş ve FAM™ boyası etiketli C allelini taşıyan prob yoğun bir şekilde ışıma yapmıştır. Ancak bununla birlikte VIC® -boyası etiketli floresan probumuzun (mutant tip T alleli) PZR süresi boyunca vermiş olduğu floresan sinyalinin değişmediğini, buna bağlı olarak da T allelini taşıyan bireylerde normal bir şekilde amplifikasyonun gerçekleşmediğini görmekteyiz. Her iki alleli de taşıyan (heterozigot CT) birey bulunmadığı için cihaz VIC® -boyası etiketli floresan probta herhangi bir floresan ışıma tespit edemedi. Reaksiyonda kullanılan TaqMan® master mix ve problemlerin kesin olarak sorunsuz bir şekilde çalıştığından emin olabilmek için ROX pasif referans boyası kullanıldı. Rox sinyali PZR tamamı boyunca değişmeden sabit bir şekilde kalır ve sistemin kontrolünden sorumludur yani 'check in' sinyali adını da verebiliriz. Negatif kontrolde ise amplifikasyonu kontrol ediyoruz. Belirlediğimiz negatif kontrol pleyt kuyucuğuna sadece TaqMan® master mix, prob ve DNAz, RNAz içermeyen su kullanıyoruz. Negatif kontrol kuyucukların da amplifikasyon gözlemlenmez.

rs11575945 polimorfik bölgesi için yapılan TaqMan® prob qPZR datalarına göre, hem hasta hem de kontrol grubunda çalışılan tüm bireylerin genotip frekanslarının homozigot (yabanıl tip C allel) CC olduğu gözlemlenmiştir. Buradan hareketle bu varyanta ait istatistiksel bulguların çocukluk çağı obezitesinde bir risk faktörü oluşturabileceği düşünülmemektedir.

## 5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Kalıtım, metabolik davranışlar, çevresel, kültürel ve sosyoekonomik faktörler gibi birçok etmenin sonucu gelişen, multifaktöriyel bir hastalık olan fazla kiloluk ve obezite (NHANES, 2010) dünya çapında çok büyük bir halk sağlığı problemi olmaktadır (Balsan ve ark., 2014).

Enerji alımı ve tüketimi arasındaki dengesizlikten kaynaklanan obezite (Körner ve ark., 2008), yüksek kan basıncı, yüksek kolesterol, kalp rahatsızlıkları, diyabet, bazı kanser tipleri, eklem rahatsızlıkları, inme ve nefes alıp vermede yaşanan problemler gibi birçok hastalığın riskini arttırmaktadır. Kilo alımına bağlı olarak bu tip hastalıkların görülme sıklığındaki artışlar da yükselmektedir (NHANES, 2010). Özellikle yetişkin obezitesinin yanında çocukluk çağı obezitesindeki son yıllardaki görülme sıklığındaki ve obezite ilişkili kronik hastalıklardaki artış çarpıcı boyutlara ulaşmıştır (Appelhans ve ark., 2014).

Son yıllarda yapılan çalışmalar obezitenin etiyopatogenezinin belirlenmesinde çevresel faktörler kadar genetik faktörlerin de etkili olduğunu göstermektedir. Henüz tam olarak obeziteye neden olan genetik faktörler bilinmemesine rağmen, 20 yılı aşkın süredir yapılan çalışmalar vücut ağırlığının belirlenmesinde genetik faktörlerin çok önemli roller oynadığını ifade etmektedir. Bunun ilk kanıtını, obezite kalıtımı ile alakalı olan ikiz çalışmaları göstermektedir. Çalışmanın bulgularına göre, monozigotik ikizlerde, % 0,78-% 0,81 oranında vücut ağırlığının kalıtsal olarak benzerlik gösterdiğini saptamışlardır, benzer sonuçlar yapılan farklı çalışmalarda da obezitenin genetik arka planı olduğunu ortaya koymaktadır (Körner ve ark., 2008).

ANXA5, plesental sinsitiyotrofoblast tabakasının yüzeyine yerleşen hem  $Ca^{+2}$  hem de fosfolipit bağlayıcı bir proteindir, intervilöz boşluklarda maternal kanda

antikoagulant fonksiyonu ile hayati bir öneme sahiptir (Miyamura ve ark., 2011). ANXA5, yirmi yılı aşkın bir süre önce keşfedilmiş olup, hala fizyolojik fonksiyonu tam olarak açık değildir. (Laat ve ark., 2006). ANXA5 ilk olarak antikoagulant ve antitrombotik bir protein olarak keşfedilmiştir. ANXA5'in, protrombinaz kompleksi engellediği ve doku faktörü ekspresyon yüzeyini azalttığı bilinmektedir. Aynı zamanda, ANXA5'in anti-inflamator ve anti-aterosklerotik özelliklere sahip olduğu ve interferon gama sinyalini düzenlediği bilinmektedir (Ewing ve ark., 2012). Bunlara ek olarak, Dennis ve ark.'ları tarafından yapılan bir çalışmada, ANXA5'in trigliserit metabolizmasında etkin olabileceğini yayınlamışlardır. Buradan hareketle ANXA5 ve lipit metabolizması arasındaki ilişki, obezite açısından önemli olabilir. Ancak bununla birlikte, ANXA5 geninin obezitedeki genetik rolü tam olarak aydınlatılamamıştır.

Bu tez çalışmasında ANXA5 geninin en yaygın iki varyantları olan rs11575945 (-1C>T) ve rs1050606 (-302T>G) polimorfik bölgelerinin çocukluk çağı obezitesi arasındaki ilişkiyi değerlendirdik. Çalışmanın henüz çok kısıtlı olan obezite- ANXA5 geni polimorfizm bağlantılı çalışmalara katkıda bulunacağını düşünmekteyiz. Yapılan Real-Time PZR datalarına göre, her iki varyantın da çocukluk çağı obezitesi ile anlamlı bir ilişkisi bulunmadığı sağtanmıştır. Hem Türk toplumunda hem de diğer toplumlarda yapılacak olan alternatif çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan literatür taramalarına obezite ile ANXA5 geninin ilişkisini değerlendiren iki tane polimorfizm çalışması (Ewing ve ark., 2012; Seok ve ark., 2013) mevcut olup çocukluk çağı obezitesi ile ANXA5 geninin ilişkisini ortaya koyan hem dünyada hem de Türkiye'de herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu anlamda çalışmamız son derece özgün olup, literatürdeki büyük bir boşluğu dolduracağını düşünmekteyiz.

Damar tıkanıklığına bağlı olarak aktiveleşen olan hücreler, yüzeylerinde bulunan fosfatidil serine (PS) maruz kalmaktadırlar. ANXA5, PS 'ye yüksek afinite ile bağlanmaktadır ve bu nedenle damar sertliği lezyonlarını tedavi etmede kullanılabileceği düşünülmektedir. Son zamanlarda, ANXA5'in damar greftinden sonra vasküler inflamasyon sürecini engellediği görülmektedir. Bu amaçla Ewing ve ark., (2012), fare modelinde müdahale sonrası damar sertliğini hızlandırarak ANXA5'in etkisini incelemişlerdir. Çalışmada ANXA5 genine ait 8 SNP incelenmiştir. ANXA5 geni intronik SNP'leri olan (iSNP) rs4833229 ve rs6830321 varyantlarının cinsiyet çalışmaları sonuçlarına göre kalp krizi damar içi müdahalelerinde önemli bir genetik risk faktörü olduğunu bulmuşlardır. Haplotip analizine göre, her iki varyantta (rs4833229 ve rs6830321) bulunan ACAGTTGTT haplotipini taşıyan bireylerin kalp krizi damar içi müdahaleden sonra restenozun (daralma) daha hızlı olduğunu saptamışlardır. Aynı zamanda ANXA5'in fare modeline doz uygulama çalışmalarında, ANXA5'in vasküler yaralanmaları önlediği ve hızlandırılmış damar sertliği (ateroskleroz) gelişimini azalttığı rapor edilmiştir (Ewing ve ark., 2012).

ANXA5 geninin obezite ile ilişkisini inceleyen diğer polimorfizm çalışması Seok ve ark., (2013) tarafından yapılmıştır. Çalışmada ANXA5 genine ait 5 intronik SNP (rs12510548, rs4240260, rs3756182, rs13136094 ve rs6534313) genotip ve allel frekansları bakımından değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre, 5 SNP'de obezite açısından risk faktörü olarak değerlendirilmiştir. Haplotip analiz sonuçlarına göre ise, GGATG ve CAGCC haplotipleri çok önemli bir şekilde fazla kiloluk ve obezite açısından risk faktörü olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara bağlı olarak ANXA5 geninin Kore toplumunda obezite gelişimine katkıda bulunduğunu söyleyebiliriz (Seok ve ark., 2013).

Biz bu tez çalışmasında diğer iki obezite ile ilişkili ANXA5 geni polimorfizm çalışmalarından farklı olarak, ANXA5 geni iki promotör SNP rs11575945 (-1C>T, kozak sekansı) ve rs1050606 (-302 T>G) varyantlarının çocukluk çağı obezitesindeki olası rolü inceledik.

rs11575945 (-1C>T, kozak sekansı) varyantının hem hasta (200 obez çocuk) hem de kontrol (150 sağlıklı çocuk) gruplarında yapılan allele spesifik diskriminasyon sonuçlarına göre, homozigot mutant GG ve heterozigot TG genotiplerine rastlanmadı. Yani istatistiksel olarak her iki grup için GG ve TG genotiplerinin görülme sıklığı değerlendirilememiştir. Bu varyant çocukluk çağı obezitesi risk faktörü açısından anlamlı bulunmamıştır.

Çalışılan diğer varyant rs1050606 (-302 T>G), hasta grubunda (200 obez çocuk) TT, TG ve GG genotiplerinin sıklığı (Tablo 4.2) sırasıyla, 41 (% 20), 101 (% 51) ve 58 (% 29) bulunmuştur. Allel sıklığı ise T alleli için 183 (% 46) ve G alleli için 217 (% 54) bulunmuştur. Aynı şekilde kontrol (150 sağlıklı çocuk) grubunda TT, TG ve GG genotiplerinin sıklığı sırasıyla 29 (% 19), 73 (% 49) ve 48 (% 32) bulunmuştur. Allel sıklığı ise T alleli için 131 (% 44) ve G alleli için 169 (% 56) bulunmuştur. Genotiplendirme analizlerine göre, hasta grubunda, mutant homozigot GG genotipinin sıklığı yabani tip homozigot TT ve heterozigot TG genotipinin sıklığından daha fazla olmasına rağmen, bu durumun kontrol grubunda da aynı şekilde saptanması nedeniyle istatistiksel olarak hastalıkla bu varyant arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır.

ANXA5 geni rs11575945 (-1C>T, kozak sekansı) ve rs1050606 (-302 T>G) polimorfizimleri ile ilgili farklı hastalıklarda birçok çalışma mevcuttur. Plasenta, ANXA5'in çok yoğun bir şekilde eksprese olduğu organlardan biridir. Carmeille ve ark.'ları (2015), trofoblastlarda ANXA5'in, hücre membranı kapanmasını desteklediğini

göstermişlerdir. Hücre membranı yaralanmasından sonra, dışardan ANXA5 uygulanan hücrelerde, ANXA5 uygulanmayan ve ANXA5 eksik trofoblast hücrelerine göre belirgin bir şekilde hücre membranında kapanma ve iyileşme gözlemlenmiştir. Artan ANXA5 ekspresyonunun hücrelerde,  $Ca^{+2}$  konsantrasyonunu arttırdığını ve buna bağlı olarak PS'ye bağlanmanın artarak, membran tamirinde rol oynadığı bilinmektedir (Carmeille ve ark., 2015). Hayashi ve ark.'ları (2013), ANXA5 genine ait 6 SNP'nin tekrarlayan gebelik kaybı (RPL) ile ilişkisini araştırmışlardır. Çalışmada rs1050606 (-302 T>G) polimorfiziminin RPL açısından bir risk faktörü olduğu bulunmuştur ( $P=0.049$ ). Ayrıca A-C-C-A haplotipini taşıyan RPL'li hastalarda, plasentada ANXA5 mRNA ekspresyonunun % 37-42 oranında azaldığı rapor edilmiştir (Hayashi ve ark., 2013). Hollanda toplumunda yapılan bir çalışmada, derin ven trombozu (DVT) ile ANXA5 geninin genetik varyantları ve genin yukarı bölgesinde bulunan 4 haplotipin (CGATGT-CGATGG-CACCAG-TGCCGG) hastalık açısından bir risk faktörü oluşturmadığı saptanmıştır. Çalışmada değerlendirilen SNP'lerden olan ANXA5 geni -1C>T polimorfizmi risk alleli (T) frekansı açısından hem hasta ( $n=148$ ) hem de kontrol ( $n=267$ ) gruplarında değerlendirilememiştir. Bu bakımdan farklı hastalık grupları olmasına rağmen kontrol gruplarındaki sonuçlar, çocukluk çağı obezitesinde çalışılan kontrol grubu ile uyum göstermektedir. Bizim çalışmamızda da ANXA5 geni -1C>T polimorfizmi genotip ve allel frekansı açısından değerlendirilemedi. Aynı çalışmada ANXA5 geni (-302 T>G) polimorfizmi DVT ilişkili bulunamamıştır (De Jong ve ark., 2015). (-302 T>G) polimorfizmi açısından bizim kontrol grubu ile bu çalışmadaki kontrol grubu sonuçları uyum göstermektedir.

Polimorfizm çalışmalarının farklı ırklar ve etnik gruplar arasında değişkenlik göstermesi nedeniyle elde ettiğimiz bulguların farklı çalışmalarla desteklenmesine gereksinim duyulmaktadır.

## 6.KAYNAKLAR

- Altunkaynak, B. Z., ve Özbek, E., (2006). Obezite: Nedenleri ve Tedavi Seçenekleri. Van Tıp Dergisi, Cilt: 13, Sayı:4, 138-142
- Appelhans, B. M., Fitzpatrick, S. L., Li, H., Cail, V., Waring, M. E., Schneider, K. L., Whited, M. C., Bush, A. M., Ve Pagoto, S. L., (2014). BMC Public Health 14:1160
- Applied Biosystems, (2008; 2010). StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems Genotyping Experiments. Getting Started Guide
- Arya, M., Shergill, I.S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya N., ve Patel, H. R.H., (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev. Mol. Diagn. 5(2)
- Ateş, Ö., Karakuş, N., (2015). Obezite Genetiği. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Obezite İle İlişkili Hastalıklar Ve Tedavileri, Sayfa 65-71
- Babaoğlu, K., ve Hatun, Ş., (2002). Çocukluk Çağında Obezite. Sted , Cilt 11, Sayı 1
- Balsan, G. A., Da Costa Vieira, J. L., De Oliveira, A. M., Ve Portal, V. L., (2014). Relationship between adiponectin, obesity and insulin resistance. rev assoC Med bras; 61(1):72-80
- Baltacı, G., (2008). Obezite Ve Egzersiz. Hacettepe Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Fakültesi Fizik Tedavi Ve Rehabilitasyon Bölümü. Klasmat Matbaacılık, 978-975-590-246-3
- Carmeille, R., Degrelle, S. A., Plawinski, L., Bouvet, F., Gounou, C., Evain- Brion, D., Brisson, A. R., Bouter A., (2015). Annexin –A5 Promotes Membrane Resealing In Human Trophoblasts. Bioclinica Et Biophysica Acta 1853; 2033-2044

- Chan, R. S.M., ve Woo, J., (2010). Prevention of Overweight and Obesity: How Effective is the Current Public Health Approach. *Int. J. Environ. Res. Public Health* , 7, 765-783; doi:10.3390/ijerph7030765
- Chung, W. K., ve Leibel, R.L., (2005). Molecular Physiology Of Syndromic Obesity In Humans. *Trends In Endocrinology And Metabolism* Vol.16 No.6
- Chung, W.K., (2012). An Overview of Monogenic and Syndromic Obesity in Humans. *Pediatr Blood Cancer*; 58(1): 122–128. doi:10.1002/pbc.23372
- Claussnitzer, M., Dankel, S.N., Kim, K. H., Quon, G., Meuleman, W., Haugen, C., Glunk, V., Sousa, I. S., Beaudry, J. L., Puviindran, V., Abdennur, N.A., Liu, J., ve ark., (2015). FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N Engl J Med* ,373:895-907. DOI: 10.1056/NEJMoa1502214
- Clement, K., ve Ferre, P., (2003). Genetics and the Pathophysiology of Obesity. *Pediatric Research* Vol. 53, No. 5, 0031-3998/03/5305-0721
- Cole, T.J., Bellizzi, M. C., Flegal, K. M., ve Dietz ,W. H., (2000). Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* Volume 320
- Çıtlı, R., Önder, Y., Eğri, M., (2015). Yetişkinlerde Obezite Epidemiyolojisi. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Obezite İle İlişkili Hastalıklar Ve Tedavileri*, Sayfa 11-29
- De Jong, P. G., Hiddink, L., Meijers, J.C. M., Kiemeny, L. A., Van Heerde, W. L., Middeldorp, S., (2015). No association between Annexin A5 genetic variants and deep venous thrombosis. *British Journal of Haematology*, 169, 286–304
- De Onis, M., (2015). Preventing Childhood Overweight And Obesity. *J Pediatr (Rio J)* ; 91 (2): 105-107

- De Onis, M., Blössner, M., Borghi, E., (2010) Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutri.*; 92:1257–64
- Erbaş, O., Çağıltay, E., Çavuşoğlu, T., (2015). Obezite ve İnflamasyon. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Obezite İle İlişkili Hastalıklar Ve Tedavileri, Sayfa 52-60
- Ergül, Ş., ve Kalkım, A., (2011). Önemli Bir Kronik Hastalık: Çocukluk ve Ergenlik Döneminde Obezite. *TAF Prev Med Bull*; 10(2): 223-230
- Ewing, M.M., Karper, J. C., Sampietro, M. L., de Vries, M. R., Pettersson, K., Jukema, J. W., Quax, P. H. A., (2012). Annexin A5 Prevents Post- Interventional Accelerated Atherosclerosis Development In A Dose- Dependent Fashion In Mice. *Atherosclerosis* 221; 333-340
- Fernandez, M. P., ve Morgan, R. O., (2003). Structure, Function And Evolution Of The Annexin Gene Superfamily
- Gerke, V., ve Moss, St. E., (2002). Annexins: From Structure to Function. *Physiol Rev* 82: 331–371
- Gibson, U. E.M., Heid, C. A., ve Williams, P. M., (2015). A Novel Method for Real Time Quantitative RT-PCR. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* ISSN 1054-9803/96
- Girard, D., ve Petrovsky, N., (2011). Alström Syndrome: Insights Into The Pathogenesis Of Metabolic Disorders. *Nature Reviews Endocrinology* 7, 77- doi:10.1038/nrendo.2010.210
- Günel, T., (2007). Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 27:763-767

- Hayashi, H., Sasaki, H., Suzuki, S., Nishiyama, T., Kitaori, T., Mizutani, E., Suzumori, N., Sugiura- Ogasawara, M., (2013). Genotyping Analyses For Polymorphisms ANXA5 Gene In Patient With Recurrent Pregnancy Loss. *Amerikan Society For Reproductive Medicine* Vol 100 No 4
- Hernandez-Valeroa, M. A., Rothera, J., Gorlov, I., Frazier, M., ve Gorlova, O. Y., (2013). Interplay between polymorphisms and methylation in the H19/ IGF2 gene region may contribute to obesity in Mexican- American children. *J Dev Orig Health Dis.*; 4(6): 499–506. doi:10.1017/S204017441300041X
- Hiddink, L., Visser, M. C. H., Heerde, W., (2012). Polymorphisms In The Annexin A5 Gene Influence Circulating Annexin A5 Levels In Healthy Control. *Thrombosis Resarch* 129; 815-817
- Hotta, K., Nakamura, M., Nakamura, T., Matsuo, T., Nakata, Y., Kamohara, S., Miyatake, N., Kotani, K., Komatsu, R., Itoh, N., Mineo, I., Wada, J., Masuzaki, H., Yoneda, M., Nakajima, A., ve ark., (2009). Association between obesity and polymorphisms in SEC16B, TMEM18, GNPDA2, BDNF, FAIM2 and MC4R in a Japanese population. *Journal of Human Genetics* 54, 727–731
- Huber, R., Römisch, J., ve Paques, E.P., (1990). The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant calcium, membrane binding protein. *EMBO J* 9: 3867–3874, 1990.
- Kaila, B., Raman, M., (2008) Obesity: A review of pathogenesis and management strategies. *Can J Gastroenterol*;22(1):6168.
- Kenis, H., Doggen, C. J. M., Vost, H. L., Reutelingsperger, C. P. M., Ve Van Herde, W. L., (2003). The C-1t Mutation In The Annexin A5 Kozak Sequence Slightly

Increases The Risk Of Myocardial Infarction In Men. *J Thromb Haemost* ,2688-9

Knüppel, S., Rohde, K., Meidtner, K., Drogan, D., Holzhütter, H.G., Boeing, H., Fisher, E., (2013). Evaluation of 41 Candidate Gene Variants for Obesity in the EPIC-Potsdam Cohort by Multi-Locus Stepwise Regression. *Plos One* 8(7): e68941. doi:10.1371

Körner, A., Kiessa, W., Stumvoll, M., ve Kovacs, P., (2008). Polygenic Contribution to Obesity: Genome-Wide Strategies Reveal New Targets. Kordonits M (ed): Obesity and Metabolism. *Front Horm Res. Basel, Karger*, vol 36, pp 12–36

Kupca, S., Sjakste, T., Paramonova, N., Sugoka, O., Rinkuza, I., Trapina, I., Daugule, I., Sipols, A.J., ve Rumba-Rozenfelde, I., (2013). Association of Obesity with Proteasomal Gene Polymorphisms in Children. *Journal of Obesity*, ArticleID638154, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/638154>

Laat, B. de., Derksen, R. H. W. M., Mackie, I. J., Roest, M., Schoormans, S., Woodhams, B. J., Groot, P. G de., Heerde, W. L., (2006). Annexin A5 polymorphism (21CRT) and the presence of anti-annexin A5 antibodies in the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* 65:1468–1472. doi: 10.1136/ard.2005.045237

Lobstein, T., Baur L., ve Uauy, R., (2004). Obesity in children and young people: a crisis in public health. IASO International Obesity TaskForce, 231

Marseglia, L., Manti, S., D'Angelo, G., Nicotera, A., Parisi, E., Di Rosa, G., Gitto, E., ve Arrigo, T., (2015). Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 378-400; doi:10.3390/ijms16010378

- Marszalek, R., Ziemianski, P., Łagiewska, B., Pacholczyk, M., Domienik-Karłowicz, J., Trzebicki J., Wierzbicki, Z., Jankowski, K., Kosieradzki, M., ve ark., (2015). The First Polish Liver Transplantation after Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery for Morbid Obesity: A Case Report and Literature Review. *Ann Transplant*, 20: 112-115 DOI: 10.12659/AOT.893797
- Mason, K., Page, L., ve Gumus Balikcioglu, P., (2015). Screening for Hormonal, Monogenic, and Syndromic Disorders in Obese Infants and Children. *Pediatr Ann*. 43(9): e218–e224. doi:10.3928/00904481-20140825-08
- Metinoğlu, İ., Pekol, S., ve Metinoğlu, Y., (2012). Kastamonu’da 10-12 Yaş Grubu Öğrencilerde Obezite Prevalansı ve Etkileyen Faktörler. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi Cilt: 3 , Sayı: 2*
- Michalsky, M. P., Inge, T. H., Simmons, M., Jenkins, T. M., Buncher, R., Helmrath, M., ve ark., (2015). Cardiovascular Risk Factors in Severely Obese Adolescents: The Teen Longitudinal Assessment of Bariatric Surgery (Teen-LABS) Study. *JAMA Pediatr*, 169(5): 438–444. doi:10.1001
- Miyamura, H., Nishizawa, H., Ota, S., Suzuki, M., Inagaki, A., Egusa, H., Nishiyama, S., Kato, T., Pryor-Koishi, K., Nakanishi, I., Fujita, T., Imayoshi, Y., Markoff, A., Yanagihara, I., Udagawa, Y., ve Kurahashi, H., (2011). Polymorphisms in the annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss. *Molecular Human Reproduction*, Vol.17, No.7 pp. 447–452
- Mutch, D. M., ve Clement, K., (2006). Unraveling the Genetics of Human Obesity. *PLoS Genet* 2(12): e188. doi:10.1371/journal.pgen.0020188
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castano, M. J., Ve Solera, J., (2015). Real-Time Pcr Detection Chemistry. *Clinica Chimica Acta* 439; 231-250

- NHANES., (2010). Healthy weight, overweight, and obesity among U.S. adults.
- Ogden, C. L., Flegal, K. M., (2010). National Health Statistics Reports, Changes In Terminology For Childhood Overweight And Obesity, Number 25. U.S. Department Of Health And Human Services Centers for Disease Control and Prevention National Center for Health Statistics
- Ota, S., Miyamura, H., Nishizawa, H., Inagaki, H., Inagaki, A., Inuzuka, H., Suzuki, M., Miyazaki, J., Sekiya, T., Udagawa, T., Kurahashi, H., (2013). Contribution Of Fetal ANXA5 Promoter Polymorphisms To The Onset Of Pre-Eclampsia. *Placenta* 34; 1202-1210
- Poveda, A., Ibanez, M. E., ve Rebato, E., (2014). Common Variants in BDNF, FAIM2, FTO, MC4R, NEGR1, and SH2B1 Show Association With Obesity-Related Variables in Spanish Roma Population. *American Journal Of Human Biology* 00:00–00
- Pulgaron, E. R., ve Delamater, A. M., (2014). Obesity and Type 2 Diabetes in Children: Epidemiology and Treatment. *Curr Diab Rep.* 14(8): 508. doi:10.1007/s11892-014-0508-y
- Pysz, M., Leszczynska, T., Cieslik, E., Kopec, A., Wielgos, B., Piatkowska, E., (2014). Relationship Between The Intake Of Energy And Basic Nutrients And The Bmi Values In Group Of Children Aged 10-12. *Rocz Panstw Zakl Hig* ;65(4):345-352
- Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y.C., Weisnagel, S.J., Argyropoulos, G., ve ark., (2006). The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14: 529–644

- Rathnayake K. M., Roopasingam T., Ve Wickramasinghe V. P., (2014). Nutritional And Behavioral Determinant And Adolescent Obesity; A Case Control Study In Sri Lanka. BMC Public Health 14;1291
- Raymaekers, M., Smets, R., Maes, B. ve Cartuyvels, R., 2009, Checklist for Optimization and Validation of Real-Time PCR Assays, J. Clin. Lab. Anal., 23:145-151p
- Rex, K. F., Larsen, N. H., Rex, H., Niclasen B., ve Pedersen, L. M., (2014). A national study on weight classes among children in Greenland at school entry. Int J Circumpolar Health, 73;25537
- Semerci, C. N., (2004). Obezite Ve Genetik. Gülhane Tıp Dergisi 46 (4) : 353 – 359
- Seok, H., Park, H. J., Lee, B.W., Kim, J.W., Jung, M., Lee, S.R., Park, K.H., Park, Y.G., Baik, H.H., ve Chung, J.H., (2013). Association Of Annexin A5 Polymorphisms With Obesity. Biomedical Reports 1: 654-658
- Smith, K.L., (2013). Development Of A New Allelic Discrimination Real-Time Pcr Assay For The Diagnosis Of Equine Herpesvirus-1 And Characterization Of The Virulence Determinants Of The Virus. University of Kentucky UKnowledge.
- Smitka, K., ve Maresova, D., (2015). Adipose Tissue as an Endocrine Organ: An Update on Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Microenvironment. Prague Medical Report / Vol. 116 , No. 2, p. 87–111
- Van Goor, M.L.P.J., Van Heerde ,W.L., Schoormans, S., Dippel, D.W.J., Leebeek, F.W.G., (2005). The Annexin A5-1C/T polymorphism in ischemic stroke: a case-control study. J Thromb Haemost; 3: 173–5
- Vieira-Potter, V.J., (2014). Inflammation and macrophage modulation in adipose tissues. Cellular Microbiology, 16(10), 1484–1492

Vural, C., (2009). Farklı Periodontal Hastalıklara Sahip Bireylerden Alınan Mikrobiyal Dental Plak Örneklerinden Elde Edilen Patojen Mikroorganizmaların Real-Time Pcr İle Kalitatif Ve Kantitatif Analizi. Ege Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi

Wijnhoven, T.M.A., van Raaij J.M.A., Sjöberg, A., Eldin, N., Yngve, A., Kunesova, M., Starc, G., Rito, A. I., ve ark., (2014). WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative: School Nutrition Environment and Body Mass Index in Primary Schools. Int. J. Environ. Res. Public Health 11, 11261-11285; doi:10.3390/ijerph111111261

[www.wordobesity.Org](http://www.wordobesity.Org)

Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems

Atlas Biyoteknoloji Laboratuvar Klavuzu

[http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC\\_ANXA5.html](http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/GC_ANXA5.html)

<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/ANXA5>

Sigma life science, qpcr technical guide; sigma-aldrich.com

<http://beslenme.gov.tr/index.php?lang=tr&page=40>

<http://www.cdc.gov/nchs/nhanes.htm>

<http://www.hsph.harvard.edu/>

<https://www.thermofisher.com/order/genomelibrary/browse/genotyping/keyword/anxa5?ICID=uc-snp-anxa5>

## 7.ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Emel ENSARİ

**Doğum Tarihi:** 17.03.1986

**Öğrenim Durumu:** Yüksek Lisans Devam Ediyor

**Medeni Durumu:** Evli

**e-mail:** emel-ozsoy@hotmail.com

| Derece                             | Bölüm/Program     | Üniversite | Yıl               |
|------------------------------------|-------------------|------------|-------------------|
| Lisans                             | BİYOLOJİ          | GOP        | 2009              |
| Y. Lisans                          | TIBBİ BİYOLOJİ AD | GOP        | 2013-Devam Ediyor |
| Doktora/S.Yeterlik/ Tıpta Uzmanlık |                   |            |                   |

**Yüksek Lisans Tez Başlığı :** ‘Çocukluk Çağı Obezitesinde Annexin A5 Gen

**Polimorfizmlerinin Rolü’**

**Danışman:** Doç Dr H. Ömer ATEŞ

**Görevler:**

| Görev Unvanı | Görev Yeri                                                 | Yıl       |
|--------------|------------------------------------------------------------|-----------|
| Arş. Gör.    | Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü             | 2011-2013 |
| Arş. Gör.    | Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD | 2013-     |

**Projelerde Yaptığı Görevler :**

‘21. Uluslararası Biyoloji Kongresi’ Düzenleme Kurulu Üyesi

‘Obezite Tanılı Çocuklarda Leptin ve Ghrelin Polimorfizmlerinin Belirlenmesi’

(GOÜ-bilimsel araştırma projeleri) başlıklı projede yardımcı araştırmacı

‘Çocukluk Çağı Obezitesinde Annexin A5 Gen Polimorfizmlerinin Rolü’

(GOÜ-bilimsel araştırma projeleri) başlıklı projede yardımcı araştırmacı

**İdari Görevler :**

Öğrenci Yemekhanesi Komisyon Başkanı

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Labotuvvarları Sorumlusu

**Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler :** Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

**Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

‘Obezite Tanılı Çocuklarda Adinopektin +45 T/G Gen Polimorfizmlerinin Belirlenmesi’

‘Alopesi Areata’da CTLA-4 Geni 49 A/G ve CT60 G/A Polimorfizmlerinin Analizi’

‘Association of IL10 -1082 G/A Gene Polymorphism In Alopecia Areata’

**Katıldığı Kongre, Çalıştay, Sempozyumlar:**

‘21. Ulusual Biyoloji Kongresi’ ,

‘ XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi’