

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TIP 2 DİABETLİ HASTALARDA APOLİPOPROTEİN B-100 R3500Q
MUTASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Adem GÜVENÇ

TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

DOKTORA TEZİ

ERZURUM 2008

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
KISALTMALAR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Lipoproteinler Hakkında Genel Bilgiler	4
2.2. Apolipoprotein A1, B ve (a) Hakkında Genel Bilgiler.....	8
2.2.1. Apolipoprotein A1(Apo A1).....	8
2.2.2. Apolipoprotein B (Apo B).....	9
2.2.3. Apolipoprotein (Lp(a)).....	10
2.2.4. Lipoprotein Metabolizması.....	10
2.3. Diabetes Mellitus.....	15
2.3.1. IDDM: Tip I Diyabetes Mellitus.....	16
2.3.2. NIDDM: Tip II Diyabetes Mellitus.....	17
2.3.3. Sorbitol Yolu.....	19
2.3.4. Non-enzimatik Glikozilasyon.....	21
2.3.5. Diyabetes Mellitusun Komplikasyonları.....	22
2.3.5.1. Akut Metabolik Komplikasyonlar.....	22
2.3.5.2. Kronik Dejeneratif Komplikasyonlar.....	23
2.4. Diabetes Mellitus Ve Lipid Metabolizması.....	26
3.MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Kullanılan Materyal.....	29
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasallar	29
3.2.1.Cihazlar	29
3.2.2.Kimyasal Maddeler.....	30

3.3. DNA İzolasyon Yöntemi.....	30
3.3.1. Otomatik DNA İzolasyonu	30
3.3.2. DNA İzolasyon Kiti İçeriği.....	31
3.3.3. Gerekli Diğer Malzemeler.....	31
3.3.4. DNA İzolasyon Reaktiflerin Hazırlanması.....	31
3.3.5. QuatroProbe Kullanımı.....	32
3.3.6. Numunelerin Çalışılması.....	32
3.3.7. DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi.....	32
3.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	32
3.5. Apolipoprotein B Geninde Arg3500Gln mutasyonunun Belirlenmesi İçin Ters Hibridizasyon Kiti.....	34
3.5.1. Kit İçinde Bulunan Materyaller.....	34
3.5.2. Kit Çözeltilerinin Hazırlanması.....	34
3.5.3. Test Prosedürü.....	35
3.5.4. Değerlendirme	36
3.5.5. Sonuçların Yorumu.....	36
3.6. İstatistik Analiz.....	38
4. BULGULAR.....	39
5. TARTIŞMA.....	47
6. SONUÇ.....	52
7. KAYNAKLAR.....	53

T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

TIP 2 DİABETLİ HASTALARDA APOLİPOPROTEİN B-100 R3500Q
MUTASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Adem GÜVENÇ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih :14.07.2008
Tezin Sözlü Savunma Tarihi :08.10.2008
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ebubekir BAKAN
Jüri Üyesi : Prof. Dr.Nuri BAKAN
Jüri Üyesi : Prof. Dr.Ömer ÇOLAK
Jüri Üyesi :Doç.Dr.Zühal UMUDUM
Jüri Üyesi :Yrd.Doç.Dr.Abdulkadir YILDIRIM

Enstitü Müdürü : Prof. Dr. İsmail CEYLAN

Ekim 2008
ERZURUM

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım süresince değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bana her konuda yol gösterip, yardımcı olan Hocam Prof. Dr. Ebubekir BAKAN'a en içten duygularıyla teşekkür ediyorum.

Doktora çalışmam sırasında benden yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a, Dr. Vefa YANMAZ'a, Dr. Hamdullah TURHAN'a, Dr. Çağlar BULUT'a, Arş. Gör. Akar KARAKOÇ'a ve Arş. Gör. H.Hakan ALP'e çok teşekkür ediyorum.

Doktora eğitimim boyunca kendilerinden her konuda yardım aldığım Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalının değerli hocalarından Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN'e, Prof. Dr. Nuri BAKAN'a, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, Prof. Dr. Leyla YILDIZ'a, Doç. Dr. Zuhale UMUDUM'a, Doç. Dr. Hülya AKSOY'a, Doç. Dr. M. Sait KELEŞ'e ve çok değerli elemanlarına teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca benden desteklerini hiç esirgemeyen değerli eşime ve aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Adem GÜVENÇ

KISALTMALAR

TG: Triaçilgliserol

EK: Ester Kolesterol

K: Kolesterol

FL: Fosfolipid

HMG-CoA redüktaz : Hidroksi metil glutaril-CoA redüktaz

DM: Diabetes Mellitus

IDDM: Tip I :İnsüline bağımlı olan (insülin dependent) Diabetes Mellitus

NIDDM: Tip II: İnsüline bağımlı olmayan (non insülin dependent) Diabetes Mellitus

FDB: Ailevi Defektif ApoB-100

PCR: Polimerize zincir reaksiyonu

VLDL : Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler

IDL: Orta Yoğunluklu Lipoproteinler

LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler

HDL: Yüksek Yoğunluklu lipoproteinler

ŞM: Şilomikron

Apo: Apolipoprotein

CETP: Kolesterol Ester Transport Proteini

LCAT: Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz

HbA_{1C}: Hemoglobin A_{1C}

PSSP: Periferik Simetrik Sensorial Polinöropati

KAH: Koroner Arter Hastalıkları

A:Adenin

G:Guanin

FH:Ailevi Hiperlipidemi

ÖZET

Amerika'da prevalansı artan kronik hastalıklar içinde en önemlisi NIDDM olarak belirlenmiş ve NIDDM'daki esas ölüm sebebi ise koroner arter hastalıkları olarak bulunmuştur. Bu durumun en önemli faktörlerinden birisi diabette lipoproteinlerdeki artmadır. Lipoproteinlerdeki bu anormallikler düzeltildiği takdirde, NIDDM'da koroner arter hastalıklarının gelişimi önlenir.

Apo B-100, LDL'nin bir iç bileşeni ve LDL reseptörü için ligant olarak görev yapar. Bundan dolayı Apo B genindeki mutasyonlar fonksiyonel faaliyetlerini önemli ölçüde değiştirirler ve LDL reseptörüne bağlanmayı azaltarak LDL partiküllerinin klirensini geciktirir. Bu ise genellikle çok ciddi veya orta düzeyde hiperkolesterolemiye ve sonuçta erken ateroskleroza neden olur.

Apo B100 kromozom 2'nin kısa kolundaki bir gen tarafından kodlanır ve bu genin bütün sıralaması uzun bir süredir bilinmektedir. R3500Q ilk bilinen mutasyonlardan biridir ve FDB'ye sebep olduğu bulunmuştur. 10708 pozisyonundaki A yerine G nükleotidinin geçişine R3500Q mutasyonu denir ve sonuçta 3500 pozisyonundaki argininin glutamin aminoasiti ile yer değiştirmesine yol açar.

Mutasyonun avrupada dağılımı batıdan kuzeye ve güneye gittikçe azalır. Finlandiya, Güney İtalya ve İspanyada çok nadirdir. Türkiye'nin kıyısına gelindiğinde ortadan kaybolur. Bulgaristan'da R3500Q mutasyonunun hiperkolesterolemi vakalarının % 0.99-%8.17 inde görüldüğü belirlenmiştir. Diğer yandan Rusya'da yapılan bir araştırmada FH(Ailesel Hiperlipidemi) teşhisi yapılan hiçbir hastada bu mutasyona rastlanmadı.

Kaynak taramalarında Türk toplumunda Tip 2 diyabetiklerde apo B R3500Q mutasyonu ve serum lipit profili ile ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma ile Erzurum'daki Tip 2 diyabetiklerde apo B R3500Q mutasyonunun lipit ve apolipoprotein düzeylerine etkisi ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Herhangi bir komplikasyonu olan ve olmayan Tip 2 diyabet grupları ele alınıp karşılaştırıldığında R3500Q mutasyonu görülme sıklıkları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Çalışmamız Erzurum Bölgesinde bu mutasyonla ilgili değerli bilgiler sunmaktadır ve R3500Q mutasyonunun Tip 2 Diabet hastalarındaki rolünü değerlendirmek amacıyla gelecekteki çalışmalara basamak teşkil edecektir.

Anahtar Kelimeler: Apo B, R3500Q, Diabetes, Erzurum

ABSTRACT
THE STUDY OF APO B-100 R3500Q MUTATION IN TYPE II
DIABETICS

Of the chronic diseases, the prevalence of which increased in the USA, the NIDDM has been regarded as the most important one, and the main cause of death in NIDDM is recorded as the coroner arterial disease. One of the major factors in such circumstances is the increase in lipoproteins in diabetes. Provided that these abnormalities are fixed in lipoproteins, the development of coroner arterial disease can be prevented.

Apo B-100 is an interior combination of LDL and functions as a ligand for LDL receptor. Therefore, the mutations in the Apo B gene modify significantly their functional activities and delay the circulation of LDL particles by reducing the binding the LDL receptor, resulting in, generally, serious or mild hypercholesterolemia and in early risk of atherosclerosis.

Apo B 100 is coded by a gene in the short arm of chromosome 2, and the entire order of this gene has been known for quite a while. R 3500Q is one of the mutations known for the first time and has been the cause of FDB. A nucleotide replaced by G in position 10708 is called R3500Q mutation, resulting in arginine replacement by glutamine amino acid in position 3500.

However, and interestingly, in Europe, the mutation's frequency decreases as one moves from the west to the north and south, becoming extremely rare in Finland, South Italy and Spain, and disappears on the verge of Turkey. It was found that the R3500Q mutation accounts for 0.99–8.17% of the cases with hypercholesterolemia in Bulgaria. On the other hand, in a study conducted in Russia, the mutation was not detected in any of the patients diagnosed with FH.

In index searches, no study aiming to find the relation between the serum lipid profile and the apo B R3500Q mutation in type II diabetics in Turkish population has been encountered. The relation of the apo B R3500Q to lipid and apolipoprotein levels in type II diabetics in Turkish population has been detected for the first time with this study. When the type II diabetic groups having any complications or no complications are compared, a significant diversity in the possibility of detecting R3500Q was not found. Our study presents valuable information about this mutation in Erzurum region

and it will be a step for further studies so as to assess the role of R3500Q mutations in NIDDM patients.

Key words: Apo B, R3500Q, Diabetes, Erzurum

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM) insülin salgılanmasında ve/veya etkisindeki yetmezlikten kaynaklanan ve hiperglisemi, hiperlipidemi ve hiperaminoasidemi ile karakterize sistemik bir hastalıktır.

İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus ateroskleroz komplikasyonları, serebrovasküler olaylar ve koroner kalp hastalıklarına en fazla sebep olan diabet tipidir. Diabetes mellitus'un özellikle NIDDM tipinin başlıca komplikasyonlarından olan makroanjyopatinin dislipidemiler ve hemorolojik sorunlarla çok yakın ilişkisi bulunmaktadır.¹

Diabetin komplikasyonları arasında makrovasküler olanlar hem sıklık yönünden hemde sebep oldukları olaylar ile mortalite oranını arttırmaları nedeniyle önemlidirler. Diabette lipoprotein metabolizmasında oluşan özel değişimler makrovasküler komplikasyonların sıklığını artırır. Özellikle tip 2 diabette serum lipidleri ve lipoproteinleri, tip 1 diabete göre daha sıklıkla normalden sapmalar gösterir ve serum lipidlerindeki değişiklikler ateroskleroz gelişiminde önde gelen risk faktörlerindedir.²

Koroner kalp hastalığı, mortalite ve morbidite oranları diabetiklerde nondiabetiklere oranla 2-3 kat daha fazladır ve özellikle NIDDM'li kişiler, koroner kalp hastalığı açısından yüksek risk altındadırlar.³

NIDDM'li kişilerin %19'unda hipertrigliseridemi görülmektedir.¹ NIDDM'li kişilerde plazma total-TG ve VLDL-TG düzeyleri genelde yükselir ve hipergliseminin kontrolü ile tamamen normale dönmez. Hepatik VLDL trigliserid üretimi ve muhtemel VLDL klerans bozukluğu hipertrigliseridemi gelişimine yol açar. Hiperinsülinemi, insülin rezistansı, obezite gibi NIDDM'li hastaların önemli özellikleri belirgin bir biçimde kısmende olsa artmış hepatic VLDL trigliserid üretimine neden olur.⁴

İnsan vücudunda kolesterolü karaciğerden perifere taşıyan başlıca birim LDL'dir. Sirkülasyondaki LDL'lerin %30'u LDL (Apo B-E) reseptörleri ile uzaklaştırılmaktadır. Karaciğere giren LDL'ler lizozomal aktivite ile parçalanır. Kolesterol sentezinin inhibisyonu sonucu karaciğer hücresinden çıkan kolesterol azalır, plazma LDL seviyesinde ve karaciğere giren LDL seviyesinde ve enzimin inhibisyonunda azalma olur. Bunun dışında bu yol LDL reseptörleri ile de kontrol edilmektedir.

Apolipoprotein B, 4536 aminoasit içeren büyük bir proteindir ve LDL reseptörleri için ligand olarak görev görür. Apo B geninde bazı mutasyonlar tespit edilmiştir. Bu mutasyonlardan biri R3500Q mutasyonudur. Bu mutasyon, LDL'nin reseptörüne bağlanma aktivitesini azaltarak hiperlipidemiye neden olmaktadır.

Diabet genellikle plazma lipoproteinlerinde anormal değişikliklerle birlikte görülür. VLDL, trigliserit konsantrasyonlarında artma en çok görülen lipoprotein anormallikleridir. VLDL'nin yapımında ve yıkımında anormallikler gösterilmiştir. Ateroskleroza bağlı morbidite diyabetin ana komplikasyonudur ve diyabetli kişilerin yaklaşık % 80 ninin de ölüm sebebi makrovasküler hastalıklardır. NIDDM da sıklıkla görülen aterosklerozun oluşması için esas risk faktörü hiperlipidemidir. Tüm diabetiklerin %80 ini oluşturan NIDDM hikayesinde kalıtımın önemi, özellikle anneye ait faktörün kalıtımda daha önemli yer tuttuğu artık kabul edilmektedir.⁵

Son yıllarda diyabetin genetik temelleri üzerindeki çalışmalar yoğunluk kazanmış ve araştırmacılar diyabeti moleküler düzeyde inceleyerek, bu hastalıkla ilgili patofizyolojik mekanizmalar ortaya koymaya çalışmaktadırlar. Diabetik hastaların lipid metabolizmalarının bozuk olması, bunlarda apolipoprotein B geni ile ilgili bir mutasyon veya genetik varyasyonların olabileceğini bize düşündürmüştür. Bu amaçla

çalışmamızda NIDDM' lı hastalarda apolipoprotein B geninde görülen R3500Q mutasyonu ve bu mutasyonun serum lipid profili ile ilişkisini inceledik.

Apolipoprotein B-100 VLDL, IDL, LDL gibi lipoproteinlerin yapısal proteini olmasının yanında LDL 'nin LDL reseptörüne bağlanmasında da rol oynamaktadır. LDL'nin kandaki kolesterolün % 70 'ini taşıdığı göz önüne alınırsa bu proteindeki kolesterole bağlanmasını etkileyen bir değişikliğin hiperkolesterolemiye yol açacağı şüphesizdir. Bu yüzden apolipoprotein B-100'de mutasyon araştırması yapmak uygundur.

Bu çalışmanın amacı Tip 2 Diyabetli hastalarda periferik kanda LDL lipoproteinlerde apo B-100 geninin polimerize zincir reaksiyonu (PCR) kullanarak kantitatif olarak çoğaltılıp R3500Q mutasyonu görülüp görülmediğini tespit etmek ve bu mutasyonun hastaların klinikopatolojik özellikleriyle ilişkisinin araştırılmasıdır. Literatür taramalarında NIDDM'li hastalarda R3500Q mutasyonu ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bakımdan çalışmamız çok önemlidir ve sonraki çalışmalarda basamak teşkil edecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lipoproteinler Hakkında Genel Bilgiler

Karaciğer ve yağ dokusunda sentezlenen lipidlerle, diyetle alınan lipidler farklı doku ve organlara, gerek kullanılmak gerekse depolanmak için taşınmak zorundadırlar. Yağlar suda çözünür bileşikler olmadığından kan dolaşımında tek başlarına bulunamazlar. Bunun için yağların mobilize edilmesi çok önemlidir. Yağların taşınabilmeleri için çözünür olmaları lazımdır. Bu çözünürlüğü amfipatik lipidler ile karaciğerde ve ince barsakta sentezlenen proteinlerin triaçilgliserol ve kolesterol esterleri gibi apolar lipidleri çevreleyerek suda çözünür moleküller meydana getirmesiyle mümkündür. Yağların taşınmasını sağlayan bu sisteme lipoproteinler denir.^{6,7} Şekil 2.1’de lipoproteinlerin genel yapısı verilmiştir.

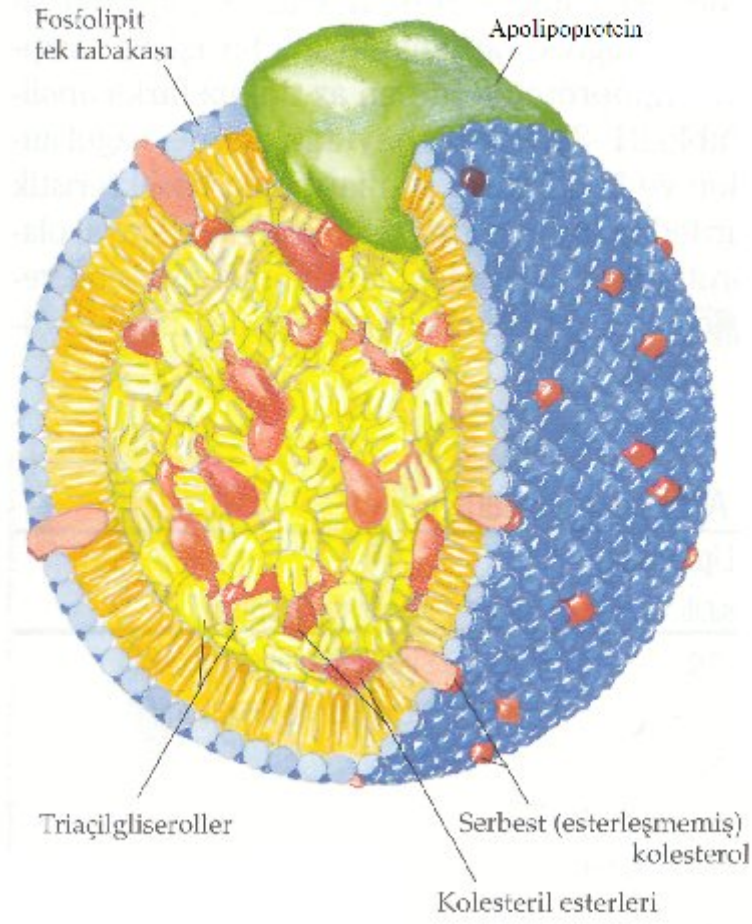
Bu kompleks bir misel yapısı olup üç kısımdan meydana gelmektedir.

1-Apolar Lipidler: Triaçilgliserol ve kolesterol esterleri.

2-Amfipatik Lipidler: Fosfolipid, serbest kolesterol, sfingolipidler.

3-Protein Kısmı.

Bu üç grup bir araya gelerek miseller yaparlar. Bu misel yapısına lipoproteinler denir. Bu sistemin amacı lipidleri taşımaktır.^{8,9}



Şekil 2.1. Plazma lipoproteinlerinin genel yapısı.

Serbest yağ asitleri dışında bütün lipidler plazmada lipoproteinler şeklinde taşınırlar ancak serbest yağ asitleri direkt plazma albümine bağlanarak taşınır. Plazma lipoproteinleri hem ultrasantrifügasyonla hemde elektroforezle çeşitli fraksiyonlara ayrılır. Bunların herbiri gerek lipid bileşimi gerekse protein çeşidi ve miktarı bakımından farklılık göstermektedir.⁹⁻¹¹

Lipoproteinlerin başlıca üç fonksiyonu vardır.^{8,12}

1. Barsaktan emilen diyet yağlarının diğer dokulara taşınması. Bunu şilomikronlar (ŞM) ve kalıntıları yapar.

2.Triaçilgliserolü karaciğerden depo edileceği veya enerji için okside edileceği dokulara transfer eder. Bu fonksiyonu VLDL yerine getirir.

3.Üçüncü fonksiyonu ters taşınım sistemidir. Ekstrahepatik dokudaki fazla kolesterol karaciğere taşınır.^{8,9,13}

Şilomikronlar

Yoğunluğu 0,94 g/dL'den küçük olup büyüklük itibarıyla da 100-1000 nm arasında büyüklükleri ile en büyük lipoproteinlerdir. Başlıca triaçilgliseroller ve daha az oranda da fosfolipit, serbest kolesterol, kolesterol esterlerinden ve proteinden meydana gelir. Proteinler, şilomikronların minör yapı taşı olmasına rağmen major bir foksiyonel role sahiptir. Yemeklerden sonra kan serumunun bulanık bir hal almasının nedeni şilomikronlardır. Elektroforezde tatbik noktasında kalırlar.

Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL)

Yoğunluğu 0,94-1 g/dL arasında olup elektroforezde pre-β lipoproteinlere karşılıktır. VLDL en çok karaciğerde sentezlenir. Esas görevi endojen triaçilgliserolü taşımaktır. Ancak bazı VLDL'ler ince barsakta sentezlenir ve safra orjinli yağ asitleri ile endojen kolesterolün reabsorpsiyonunda rol alır.

Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL)

Plazmada başlıca kolesterol taşıyıcı lipoproteindir. Elektroforezde β-bandında yer aldığı için β-lipoprotein de denir. Karaciğerde endojen sentezlenen kolesterolün dokulara taşınmasını sağlar. VLDL' den kalan sadece apo B100 proteini yapıda bulunur. Trigliserid oranı VLDL'den daha azdır.

Yüksek Yoğunluklu lipoproteinler (HDL)

Yapısında yaklaşık %50 protein, fosfolipid ve %20 kolesterol bulunur. HDL-K, HDL₂ ve HDL₃ olmak üzere üç alt gruba ayrılır. ApoA-I ve A-II, total HDL proteinlerinin %90'nını oluşturur. Apo A-I'in apo A-II'ye oranı 1/3' dür. Yapıda ayrıca apo C ve Apo E lipoproteinleri de yer alır. HDL-K yapısında apo E bulunmasından dolayı LDL reseptörlerine karşı yüksek affiniteye sahiptir. HDL perifer dokulardan karaciğere kolesterolün taşınmasını ve kolesterolün safra asidi şeklinde uzaklaştırılmasını sağlar. HDL'deki kolesterol esterleri apo D olarak adlandırılan kolesterol ester transport proteini (CETP) vasıtasıyla HDL'den VLDL ve LDL'ye transfer edilir.

Normalde plazmada HDL iki formda bulunur: HDL₂-K (d=1.063-1.125 g/ml) ve HDL₃-K (d=1.125-1.210 g/ml). Plazma HDL seviyesindeki düzensiz değişmeden genelde HDL₂ sorumludur. HDL₂ bayanlarda daha yüksektir ve ateroskleroz gelişmesine zıt etki yapar. HDL'nin düşük olması koroner kalp hastalığı riskini artırır. HDL aynı zamanda apo C-II kaynağıdır. Bu bakımdan HDL diğer lipoproteinlere apolipoproteinleri temin etmede de fonksiyon görür.^{14,15}

Tablo 2.1'de plazma lipoproteinlerinin özellikleri Tablo 2.2'de ise bileşimleri gösterilmiştir.

Tablo 2.1. Plazma Lipoproteinlerinin Özellikleri.

Lipoprotein	Dansite aralığı	Flotasyon	Başlıca	Elektroforetik	Başlıca
Şilomikron	< 0.94	> 400	TG	Orjinde	B-48,A-I,A-IV
VLDL	0.94-1.006	20 ile 40	TG	pre- β	B-100,E,CI,II,III
IDL	1.006 - 1.019	12 ile 20	TG ve EK	β	B-100,E
LDL	1.019 - 1.063	0 ile 12	EK	β	B-100
HDL	1.063 - 1.21	-----	Fl ve K	α_1	A-I, A-II
Lp(a)	1.050 - 1.082	-----	EK	pre- β	(a), B-100

Sf.: 1.063 dansitedeki Flotasyon,TG: Triaçilgliserol, EK: Ester Kolesterol, K:Kolesterol, FL:Fosfolipid

Tablo 2.2. Lipoproteinlerin Bileşimi (Toplam ağırlığının yüzdesi)

Lipoprotein	Fosfolipid	Kolesterol	Ester	TG	Çapı (nm)	Mol. Ağ
Şilomikron	3	2	3	90	80 - 500	5 - 1000
VLDL	14	4	16	60	30 - 80	70 - 80
IDL	22	8	20	20	25 - 35	5 - 10
LDL	22	8	7	7	18 - 28	2 - 3
HDL ₂	32	5	20	6	5 - 12	0.36
HDL ₃	26	2	15	3	5 - 12	0.174
HDL _c	43	37	1	20	-----	-----
Lp(a)	20	8	45	6	18 - 20	-----

TG: Triaçilgliserol

2.2. Apolipoprotein A1, B ve (a) Hakkında Genel Bilgiler

2.2.1. Apolipoprotein A1 (Apo A1)

Apo A1 yüksek dansiteli lipoproteininin (HDL) esas protein bileşenidir. HDL fraksiyonu %50 lipid, %50 proteinden ibarettir. HDL'ye ait protein bölümünün %70

kadarını da Apo A1 oluşturmaktadır. Plazma konsantrasyonu 100-120 mg/dL olan Apo A1 şilomikronların yapısındaki proteinlerin %7.4' ünü oluşturmaktadır.

Apo A1'in dokulardan karaciğere kolesterol taşınmasında aktif rol oynadığı kabul edilmektedir. Apo A1'in dokulardan karaciğere kolesterol akışını sağlamasındaki fonksiyonun, lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) enzimini aktive etmesi olduğu belirtilmiştir. LCAT, plazmadaki kolesterolün yaklaşık %70'inin esterleştirilmesinden sorumludur. Bu fonksiyonu ise doğrudan Apo A1'e bağlıdır. Yani LCAT kofaktör olarak Apo A1'e ihtiyaç duymaktadır. Herhangi bir sebeple meydana gelebilecek Apo A1 eksikliği veya fazlalığı LCAT aktivitesini de doğrudan etkiler.¹⁶⁻¹⁹

Apo A1 sentezi memelilerde karaciğer ve ince barsak hücreleri tarafından gerçekleştirilmektedir. Apo A1'in karaciğer, böbrek ve çeşitli dokularda yıkıma uğradığı düşünülmektedir.¹⁹

2.2.2. Apolipoprotein B (Apo B)

Apo B, düşük dansiteli lipoproteinlerin hepsinde (Şilomikron, VLDL, IDL, LDL) bulunur. Bir glikoprotein yapısında olan Apo B'nin toplam dört tipi ve çeşitli antijenik determinantları vardır.

Fonksiyonları anlaşılmış ve fizyolojik tanımlanması yapılmış iki tipi Apo B-48 ve Apo B-100 dür.

Apo B-48, Şilomikronlara ait proteinlerin %20'sinden fazlasını meydana getirmektedir. Şilomikron salınımı için gerekli olan Apo B-48, şilomikronların kalıntı (remnant) reseptörlerince tanınmasını sağlamakta ve şilomikron metabolizmasında görev almaktadır. Apo B-48 eksikliğinde plazma şilomikron seviyesinin arttığı rapor edilmiştir.¹⁹⁻²¹

Apo B-100, karaciğer tipi olarak da adlandırılmakta ve VLDL, IDL, LDL'de temel apolipoprotein olarak bulunmaktadır. Apo B-100 artışı, plazmada düşük dansiteli lipoproteinlerin artışı göstermektedir¹⁹

Granüllü endoplazmik retikulumun ribozomları tarafından sentezlendiği ve golgi aygıtında molekül ağırlığının arttığı kabul edilen Apo B-100 lipidlerle birleşmesi sağlandıktan sonra hücreden VLDL olarak salınmaktadır.²⁰

Antijenik özelliğine sahip olan lipoprotein (a)'nın plazminojeni inaktif hale getirdiği, bunun da ateroskleroz gelişimi ile ilgili olduğu kaydedilmiştir.²²⁻²⁴

2.2.3. Apolipoprotein (a) (Lp (a))

Yapısında Apo B₁₀₀ bulunduran bir lipoproteindir ve plazminojene yapısal benzerlik gösterir. Lipoprotein metabolizmasındaki rolü belli değildir.

2.2.4. Lipoprotein Metabolizması

Çeşitli lipoprotein sınıfları özel apolipoproteinler tarafından düzenlenmekte ve kontrol edilmektedir. Ana apolipoproteinler apo E, apo B, apo A-I, apo A-II, apo A-IV, Apo C-I, apo C-II, apo C-III ve apo (a) dır. Lipoprotein metabolizması enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar ve çeşitli gruplar arasında apoprotein ve lipid transferini ihtiva eden dinamik bir olaydır. Bu reaksiyonlar sonucu hücrelerden veya hücrelere, reseptör aracılı kolesterol akışı meydana gelmektedir.²⁵

Metabolik olarak kolesterol ve esterleri, TG, fosfolipidler ve yağ asitleri olmak üzere dört ana grup içinde değerlendirilen lipidler, fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için kan plazması içinde taşınmaları gerekmektedir. Lipidler sulu ortamlarda taşınabilmeleri için özel birtakım proteinlerle birleştirilerek lipoprotein adı verilen partiküller meydana getirirler.

Bir lipoprotein partikülündeki iç kısım; suda çözünmeyen lipidleri (TG, ester kolesterol) ihtiva ederken, dış kısmı; hem suda hem de yağda çözünebilen lipidler (fosfolipid ve serbest kolesterol) ve proteinlerden meydana gelir.^{10,11}

İnsan plazma lipoproteinleri ultrasantrifüjle beş ana ve birkaç alt sınıfa ayrılırlar. Şilomikronlar barsakta sentezlenir, diyetle alınan TG ve kolesterolü vücudun çeşitli dokularına taşırlar. Bu partiküldeki TG'ler endotel yüzeylerine bağlı olan lipoprotein lipazın etkisi ile hidrolize olurlar. Hidroliz sonucu açığa çıkan yağ asitleri enerji kaynağı olarak yada yağ hücrelerince alınarak TG halinde depo edilirler. ŞM'lar üzerinde lipoprotein lipazın etkisinden sonra arta kalan partiküllere ŞM kalıntıları adı verilir. Bunlar kolesterolce zengin olup ve hızlı bir şekilde karaciğer tarafından alınarak plazmadan temizlenir.^{11,26}

İnce barsak mukoza hücreleri lipid sindirim ürünlerini absorbe eder. Hücrede TG düz endoplazmik retikulumda yağ asitleri ve monoaçilgliserolden sentezlenirken, kolesterol ve fosfolipidler TG eklenerek miseller meydana getirirler. Şilomikron düzeyinin muhtevası (apoproteinler, fosfolipidler ve kolesterol) sentez için sınırlayıcıdır. Meydana gelen ŞM'un büyüklüğü enterositte bulunan TG miktarına bağlıdır. Şilomikronlar sistemik dolaşıma ulaşırlar. ŞM'lar makromolekül olduğundan genel dolaşıma verilemezler, sistemik dolaşımla dokulara gönderilirler ve daha sonra ihtiva ettiği TG, serbest yağ asitleriyle gliserole ayrılır ve metabolize olurlar.²⁶

VLDL karaciğerde sentezlenir ve endojen olarak meydana gelen TG ve kolesterolü çeşitli dokulara götürür. Plazmada VLDL' deki TG' ler, lipoprotein lipaz ve hepatik lipoprotein lipazın etkisi ile serbest yağ asitlerine hidrolize olur. Sonuçta kolesterolden zengin IDL ve LDL meydana gelir. Diğer lipidlerle beraber düz endoplazmik retikulumda apo B-100, apo E, apo C-I, apo C-II, apo C-III sentezlenir.

Apo B-100'ün granüllü endoplazmik retikulumda bir kısmı glikozillenir ve bu, iki endoplazmik retikulumun birleşme yerinde lipidlere katılır. Lipid-apo B-100 kompleksine diğer proteinler golgide eklenir. Ayrıca glikozilasyon olur ve fosfolipidler eklenir. Salgı vezikülüne partiküllerin girmesinden sonra plazmaya geçer.²⁷⁻²⁹

HDL, karaciğer ve barsakta sentezlenir. HDL periferik dokulardan kolesterolü olarak direkt veya indirekt yolla (esterleşmiş kolesterolü bir transfer protein aracılığıyla LDL'ye aktararak) karaciğere taşır. İnsanlarda HDL ile aterosklerotik damar hastalığı arasında negatif bir korelasyonun gösterilmesi dikkatleri bu lipoprotein ve onun kolesterol metabolizmasındaki rolüne çevirmiştir. Plazma lipoproteinlerdeki kolesterol esterlerinin çoğunluğu LCAT enzimi ile meydana getirilmektedir.³⁰

Enterositlerde sentezlenen ŞM'lar lenf yolu ile dolaşıma geçtikten sonra HDL'den apo C ve apo E'yi alarak olgun ŞM'lara dönüşür. Apo C-II tarafından ekstrahepatik doku kapillerinde bulunan LPL'nin aktive edilmesi sonucu olgun ŞM'ların içindeki TAG'lerin büyük bir kısmı parçalanır ve yağ asitlerini dokuya verirler. Lipidlerin büyük bir kısmını kaybeden şilomikron kalıntısı, yapılarındaki apo A ve apo C'leri HDL'ye aktarır. Geri kalan şilomikronun da parçalanması gerekmektedir. Bunlar apo E aracılığıyla karaciğere alınırlar. Bu nedenle on iki saatlik açlığın sonunda plazmada hiç ŞM görülmez. Bunlar sentezlendikten yaklaşık bir saat sonra plazmadan temizlenir. ŞM'larda TAG'lerin yaklaşık % 80'i adipoz doku, kalp ve kas tarafından tutulurken % 20'si de karaciğer tarafından alınır.^{6,12}

Karaciğerde sentezlenen lipidlerle buraya taşınan lipidlerin fazlası VLDL şeklinde karaciğerden salınır. HDL yeni sentezlenen VLDL'ye apo C ve apo E'yi verir. VLDL, ekstrahepatik dokulardaki LPL ile parçalanır ve lipid muhtevasının büyük bir kısmını dokulara verir. Apo C ise HDL'ye geri döner ve geri kalan partiküle IDL

asitlerine parçalanırken serbest kolesterol açığa çıkar. Bu üç olay şu şekilde düzenlenmektedir.^{12,31}

1- HMG-CoA redüktaz (Hidroksi metil glutaril-CoA redüktaz) aktivitesini azaltarak yeni kolesterol sentezini inhibe ederek,

2- ACAT aktivitesi artırılmasıyla serbest kolesterol ester kolesterole çevrilerek,

3- LDL reseptör sentezini azaltarak hücreye LDL alınması kısıtlanarak.

Serbest kolesterol aşırı miktarda meydana gelmişse LDL reseptör teşekkülünü baskılar ve LDL'ler karaciğer hücreleri tarafından alınmaz ve kalp damarları cidarında birikir. Kalp damar hastalıklarından sorumlu tutulur. LDL dokular arası sıvıya girebilecek kadar küçük bir moleküldür.²⁵

HDL, lipoprotein metabolizmasında önemli rol oynar. HDL, HDL₂ ve HDL₃ olmak üzere üç farklı yoğunlukta bulunur. HDL, karaciğer ve barsaklarda sentezlenir. Barsakta sentezlenen lipoprotein sadece apoprotein A'yı ihtiva eder, dolayısıyla C'si yoktur. Apo C karaciğerde sentezlenir, plazmaya girildiği zaman barsak HDL'sine aktarılır. HDL'nin ana fonksiyonu ŞM ve VLDL metabolizması için gerekli olan C ve E apoproteinlerinin aktarılmasıdır. Yeni sentezlenen HDL, ekstrahepatik dokulardan aldığı kolesterolü LCAT etkisi ile ester kolesterole çevirip diskoidal yapının merkezine gitmesi neticesi HDL₃ meydana gelir. HDL dokulardaki fazla kolesterolü karaciğere taşımak suretiyle temizleme görevi görür.^{32,33} HDL partikülleri en çok kolesterol esterlerini taşır ve onları katabolize edilmeleri için karaciğere getirir.

Plazma lipoproteinlerindeki artışın en önemli akibeti koroner kalp hastalığı ve inmeye de neden olan aterosklerozdur. LDL, IDL ve VLDL'deki artma kolesterol muhtevası bakımından riskli olup ateroskleroza yol açar. Yüksek LDL kolesterol

konsantrasyonu ile koroner kalp hastalığı arasında çok kuvvetli korelasyon bulunmuştur.³⁴

2.3. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) insülin salgılanması veya etkisindeki tam ya da kısmi yetersizlik sonucu ortaya çıkan ve kendini başlıca kronik hiperglisemi ile belli eden heterojen bir hastalıktır.³⁵

DM insülin kullanılmasından bu yana yaklaşık 80 yıl geçmesine rağmen çağımızın en önemli hastalıklarından biri olmaya devam etmektedir.³⁶⁻³⁸ DM dünyada ölüme sebep olan hastalıklar arasında üçüncü sırada yer almaktadır.³⁹ DM sebepli sakatlık ve ölümlerin kaynağında diyabetin akut, kronik komplikasyonları yer almaktadır.^{36,40}

DM ve diğer glukoz intoleranslarının sınıflaması:^{35,41}

1-İnsüline bağımlı olan (insülin dependent) DM (IDDM: Tip 1)

2-İnsüline bağımlı olmayan (non insülin dependent) DM (NIDDM: Tip 2)

3-Diğer spesifik tipler; belirli durumlar ve sendromlarla ilişkili DM:

a) β hücre fonksiyonundaki genetik defektler

b) İnsülin etkisindeki genetik defektler; insülin reseptör bozukluğu ve bazı genetik sendromlar.

c) Pankreas hastalıkları (ekzokrin)

d) Endokrinopatiler

e) İlaç veya kimyasal maddelere bağlı etkileşim

f) Glukoz tolerans bozukluğu

g) Enfeksiyonlar

h) Gestasyonal DM.

Diyabetiklerin %10- 20' sini IDDM, %80-90'ı NIDDM oluşturmaktadır.⁴²

2.3.1. İnsüline Bağımlı Olan (İnsülin Dpendent) Diabetes Mellitus (IDDM)

Tip 1 Diabetes Mellitus

Pankreasın beta hücrelerinin ağır bir otoimmün atak nedeniyle harabiyeti sonucu insülin salgılanamaması hastalığıdır.⁴³⁻⁴⁶ Tip 1 diyabet, insülin salgılanmasının çok az olması veya hiç olmaması ile karakterizedir.³⁵ Bu hastalıkta semptomların ortaya çıkışı ani olmakla birlikte hasarın oluşumu için belli bir süreç vardır.

Bu süreci dönemlendirecek olursak,³⁵

1.dönem: Genetik olarak yatkınlık söz konusudur. Adacık antikoru pozitif hastalarda daha sık görülür.

2.dönem: Genetik olarak diabete yatkın olan kişilerde bazı çevresel faktörler (kabakulak, kızamıkcık gibi) başlatıcı rol oynarlar.

3.dönem: Beta adacık hücrelerinin yüzey antijenik yapısı değişir. Adacık hücreleri aktif T- lenfositler tarafından yabancı hücre olarak tanımlanırlar.

4.dönem: Pankreasda 'insülitis' denilen inflamatuvar cevap oluşur ve adacık hücreleri aktif T- lenfositler tarafından inhibe edilirler.

5.dönem: İmmün cevabın ortaya çıkmasıdır. Sitotoksik antikoru gelişmekte ve beta hücreleri yıkılmaktadır. Bu dönemde adacık hücre antikoru ortaya çıkar, insülin cevabı bozulmuştur, glukoz tolerans bozukluğu görülebilir.

6.dönem: Beta hücrelerinin %90 dan fazlası yıkılmış ve diyabet aşık olarak ortaya çıkmıştır.

Tip 1 diyabet, genç tipi diyabeti olarak adlandırılır. Hastalık çoğunlukla 20 yaşın altında, hatta çocuklukta başlar. Hastalığın başlangıcında hasta sıklıkla iyi beslenmiştir. Hasta zayıftır ve tedavi ile kilo alamaz. Çünkü adipoz dokudan yağ asidi salımı artmıştır. Sıklıkla ketozis görülür. Tedavide mutlak insüline gerek vardır ve her zaman zorunludur. Oral hipoglisemik ilaçlar yanıt vermez.^{42,43,45,46} Ortalama kan glukoz düzeyi, tipik olarak 225-275 mg/dl arasındadır. HbA_{1C} total hemoglobinin % 8-9 unu oluşturmaktadır. Normalde kan glukoz düzeyi 110 mg/dl ve HbA_{1C} ise % 6 veya daha düşüktür.⁴²

2.3.2. İnsüline Bağımlı Olmayan (Non İnsülin Dependent) Diabetes Mellitus (NIDDM) Tip 2 Diabetes Mellitus

Genetik faktörler daha ön planda³⁵ ve çok güçlüdür.⁴² Ancak defekt tek bir gen lokusunda değildir. Obezite, diyet, fiziksel aktivite, intrauterin ortam, stres gibi çevresel faktörler hastalığın ortaya çıkmasında rol oynarlar.³⁵

Patofizyolojide periferde insülin direnci,^{35,42} beta hücresi fonksiyon bozukluğu,⁴² insülin sekresyonunda azalma³⁵, karaciğerde glukoneogenezde artış³⁵ sorumludur. İnsülin direncine sahip birçok insanda hastalık gelişmemesi beta hücre disfonksiyonunun diyabetin gelişiminde kritik bir role sahip olduğunu düşündürmektedir.^{43,45-47}

Tip 2 diyabet erişkin diabeti olarak da adlandırılır. Sıklıkla 35 yaşından sonra³⁵ genellikle 40 yaş üzeri ortaya çıkar. Hastaların % 80'i ideal kilolarının %15 üzerindedirler.⁴³⁻⁴⁶ Tip 2 diyabetiklerin % 80'ninin obez olması anlamlıdır.⁴² Plazma insülin düzeyleri normal, normalin altında veya üzerinde olabilir. İnsülin tedavisi genellikle gerekmez. Akut hiperosmolar koma görülebilir.⁴³⁻⁴⁶ Ketozis nadirdir, şiddetli stres ve enfeksiyonlar esnasında ketozis gelişebilir.^{42,44,47,48}

İnsülin direnci, dokuların insüline normal yanıt vermemesi durumudur. Tip 2 diyabetiklerde sıklıkla insülin direnci bulunur. Bunun sonucunda hem endojen hem de ekzojen insüline yanıt verme olasılığı azalır. İnsülin direnci karaciğerde kontrolsüz glukoz yapımına, kas ve yağ dokusunda ise glukoz alımının azalmasına yol açar.⁴²

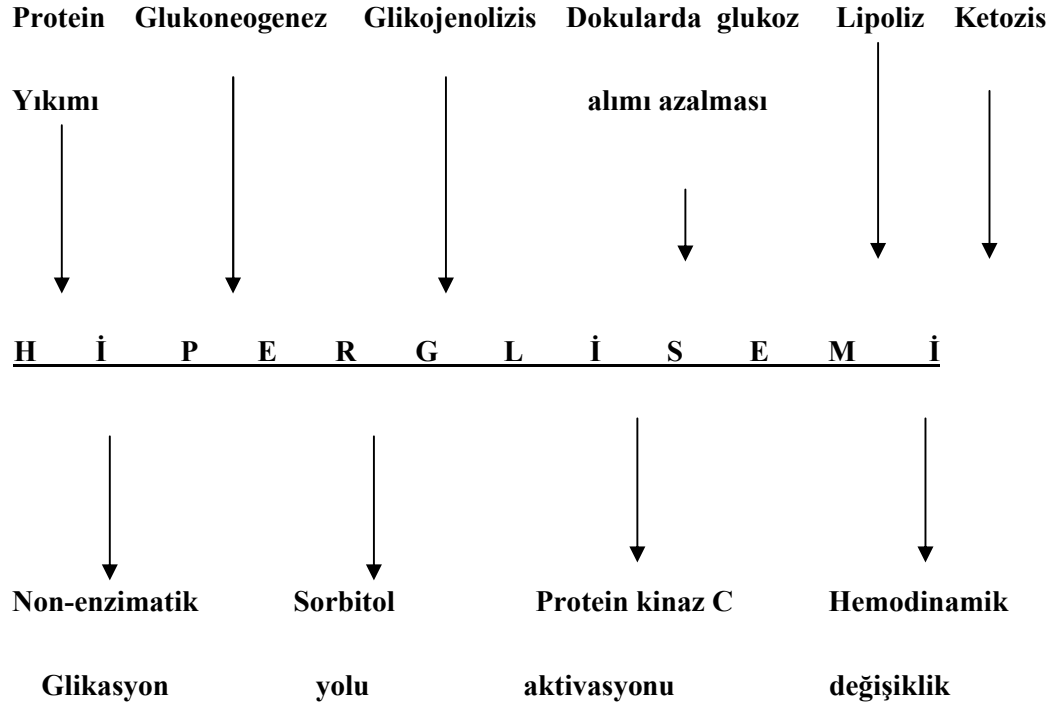
Diyabetin karakteristik semptomları:^{35,49,50}

1. Polifaji; çok yemek yeme
2. Polipepsi; aşırı susama
3. Polidipsi; aşırı su içme
4. Poliüri; sık idrar yapma

Hiperglisemiye bağlı poliüri, pollaküri, polidipsi, bulanık görme, parestezi, ortostatik hipotansiyon görülebilir. Çocuklarda enürezis nokturnaya rastlanır. Katabolik duruma bağlı kilo kaybı olabilir. Hipergliseminin hasar, yetmezlik, fonksiyon bozukluğu gibi yüklerini çeken başlıca dokular ve organlar; böbrekler, sinirler, beyin, retina, lens, kan damarları ve kalp hücreleridir.^{36,45,46,51} Enerji metabolizmasını en çok etkileyen iki hormon insülin ve glukagondur. Bu hormonların dolaşımdaki düzeylerinde olan değişim, enerji depolanmasına veya depo enerjinin açığa çıkmasına neden olur. İnsülin ve glukagonun göreceli miktarları hepatik glukoz yıkımının hızıyla düzenlenmektedir. Glukoz insülin salgılanmasının en önemli uyarandır.⁴²

İnsülinin en belirgin olarak etkisi üç dokuda gözlenir: Karaciğer, kas ve yağ dokusu. Karaciğerde glukoneogenez ve glikojen yıkımını inhibe ederek glukoz üretimini azaltır. Kas glikojen sentezini artırır. Kas ve yağ dokusunda hücre membranlarındaki glukoz taşıyıcılarını artırarak glukoz alımını artırır.⁴²

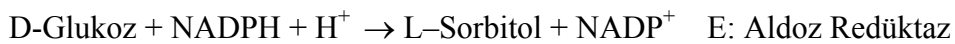
DM’de artan kan glukozunu hiperglisemi havuzu olarak düşünecek olursak, bu havuzun beslenme noktaları ve boşalma noktaları aşağıdaki gibi şematize edilebilir (Şekil 2.3),^{42,43,45,46,52-55}



Şekil. 2.3. Hiperglisemi havuzu

2.3.3. Sorbitol Yolu

İnsüline ihtiyaç duymayan bazı organ ve dokularda hücre içi glukoz konsantrasyonu kan glukoz konsantrasyonu düzeyine ulaşır. Glukoz miktarı fizyolojik seviyenin üstüne çıkınca Aldoz Redüktaz enzimi aktif hale geçer.^{36,56}



Aldoz redüktaz; lens, retina, eritrosit, böbrek, plesenta, periferik sinirlerin Schwann hücreleri gibi pekçok dokuda bulunur.⁴² Sorbitol dehidrogenaz; karaciğer, yumurtalık, sperm, vesica seminalis hücrelerinde bulunur.⁴² Sorbitol Dehidrogenazın yok olduğu veya az olduğu retina, böbrek ve sinir hücrelerinde artmış glukoz konsantrasyonlarında ve yeterli NADPH varlığında Aldoz Redüktaz fazla miktarda sorbitol sentezler. Bu sorbitol hücre içerisinde birikir. Sorbitol su çekerek hücre şişmesine neden olur. Diyabetiklerde görülen bazı patolojik değişiklikler; katarakt oluşumu, periferik nefropati, nöropati, retinopatiye yol açan damarsal sorunlardan bu fenomenin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür.⁴² Glukoz için geçirgen olan hücre membranı polioller için (sorbitol, fruktoz) geçirgen değildir. Ve böylece hücrede birikirler.^{52,57-60} Organizma şekerleri hücrede tutabilmek için ya onu fosforiller ya da onu poliollere çevirir.⁴² Bu normal fonksiyon hiperglisemi durumunda organizmaya zarar vermeye başlamaktadır. Katarakt, retinopati, nöropati ve aort hastalıklarının patogenezinin polioller sorumlu tutulmaktadır.^{52,54,57-59,61} Hücre içi sorbitol birikimi bir seri şişme ve geri inme olaylarına yol açarak osmotik dengeyi bozmakta ve neticede endotel hücre harabiyeti görülmektedir.^{57,58,60} Yüksek glukoz konsantrasyonları hücrelerin aşırı büyümesine neden olduğu gibi ^{58,59} organizmada mineral dengede bozukluğa yol açabileceği bildirilmiştir.⁶² Hiperglisemi insülin ile ortadan kaldırılsa bile polioller diğer metabolik yollarla ortadan kaldırılıncaya kadar hücrede kalırlar.

Hücre içi yüksek sorbitol ve fruktoz;

1. Osmotik basıncın yükselmesine,
2. Su retansiyonuna,
3. Sodyumun hücre içine girmesine,
4. Potasyumun kaybına,

5. Lensde katarakt oluşmasına,
6. Periferik sinirlerde periferik nöropati,
7. Eritrositlerde sorbitol 2,3 difosfo gliserata dönüştürülerek kanın oksijen taşıma yeteneğinin azalmasına yol açarlar.³⁶

2.3.4. Non-enzimatik Glikozilasyon

Proteinler uzun süre yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz kaldığında glukoz proteine bağlanarak proteinin yapı ve fonksiyonlarını değiştirir. Bu olaya glikozilasyon denir. Normal şartlarda bu olay enzimatik yollarla yapılır. Non enzimatik glikozilasyon regüle olmayan tepkimedir.^{45,52,54}

Glukoz proteinin lizin ve valin rezidüsüne bağlanır. Glukozun fonksiyonel karbonil grubu ile amino asidin amino grubu Schiff bazı (aldamin) oluşturur. Bu kararsız ürün daha sonra Amadori dönüşümü ile daha kararlı bir ürüne, ketonamine dönüşür.^{46,55,63}

Hemoglobinin non-enzimatik glikozilasyonu karakteristiktir. HbA_{1C} glukoz konsantrasyonunun ve diyabetin kontrolünün değerlendirilmesinde iyi bir parametredir.^{44,54} Diabetiklerde insüline bağımlı dokularda glukoz hücreye kolay giremediği için bu hücrelerde glikozilasyon fazla olmaz. Organizmadaki her protein glikozile olabilir. Protein glikozilasyonunun düzeyi hiperglisemiye maruz kalma süresine bağlıdır. Eritrositlerin hücre membranları, albumin, düşük dansiteli lipoprotein, yüksek dansiteli lipoprotein, plazma yarılanma ömürleri uzun olan proteinler aşırı derecede glikozile olurlar. Lens, glomerul bazal membranı, aort, koroner arterler, femoral sinir proteinleri de sıklıkla glikozile olan dokulardandırlar.⁴² Eritrosit membranının glikozilasyonu eritrosit yaşam süresinin % 15 kısalmasından sorumludur. Normal eritrosit fleksibilitesinin kaybı eritrositlerin rahat hareketine mani olur. Bu da

retinal ve renal iskemiye neden olur.^{54,64} Miyelin proteininin glikozilasyonu sinir iletiminde değişiklik yapar.^{54,64} İnsülin reseptörlerinin glikozilasyonu insüline hassasiyetini azaltmaktadır.^{54,64}

Hemoglobin lizinlerinin ϵ -amino grupları glikozile olur. Fakat esas β zincirindeki terminal valinin glikozilasyonu hemoglobinin yüzey elektrik yükünü değiştirir ve onu HbA_{1C} ye dönüştürür. Hemoglobinin glikozilasyonu 2,3 difosfogliseratın beta zincirindeki pozitif yüklü rezidülerle olan reaksiyonun inhibisyonuna, bu da hemoglobinin oksijen afinitesinde artmaya neden olur.⁵⁴ Glikozile albumin normal albumine göre dokulara kolay girerek doku fonksiyon bozukluklarına neden olur.⁵⁴ Glikozile fibrinin diyabetiklerin dokularında fibrin birikiminden sorumlu olduğu düşünölmektedir. Faktör VIII in fazla glikozilasyonu trombosit agregasyonunun artmasına neden olmaktadır.⁵⁴ Non-enzimatik glikozilasyonun bazal membran kalınlaşmasına yol açtığı bildirilmiştir.⁵²

2.3.5. Diabetes Mellitus Komplikasyonları

DM komplikasyonlarının başlıca nedeni hiperglisemidir.^{43-46,54} Bu komplikasyonları sıralayacak olursak;^{35,42,45,46,51}

2.3.5.1. Akut Metabolik Komplikasyonlar

a) Diyabetik Ketoasidoz Koması

Karaciğerdeki mevcut asetil CoA miktarı karaciğerin oksidatif kapasitesini aştığı zaman keton cisimleri meydana gelirler. Alternatif yakıt molekülü olan keton cisimleri (asetoasetat, 3-hidroksi bütirat, aseton) oluşum hızları kullanım hızlarından fazla olursa ketonemi ve ketonüri görülür. Ciddi ketozisli şeker hastalarında idrarla atılımı 5gr/gün'ü bulur. Kanda ise 90 mg/dl ye ulaşır (normalde 3 mg/dl). Bir keton cisminin karboksil grubunun pKa değeri 4 civarındadır. Bu yüzden her bir keton cismi kanda bulunduğu

sırada bir proton (H^+) kaybeder. Böylece vücut pH sını düşürür. Ayrıca glukoz ve keton cisimlerinin idrarla atılımı vücudun su kaybetmesine yol açar. Sonuç olarak hacmi azalmış ve de proton konsantrasyonu artmış plazmada hayati öneme sahip asidoz (ketoasidoz) ortaya çıkar.

b) Hiperosmolar Nonketotik Koma

Tip 2 DM'lu hastalarda görülür. Hastalarda şiddetli dehidratasyon değişik nörolojik belirtiler vardır. Kan şekeri 600 mg/dl'nin üzerindedir. Plazma osmolaritesi artar. Serum ve idrarda keton normal veya hafif yüksektir. Tedaviye rağmen mortalite oranı yüksektir.

c) Laktik Asidoz

Plazma laktat düzeyi yüksektir.

d) Hipoglisemi ve Koması

Plazma glukozun 45 mg/dl'nin altında olması halidir. Hipoglisemi bir hastalık değil biyokimyasal anormalliktir.

2.3.5.2. Kronik Dejeneratif Komplikasyonlar

a) Diabetik Nefropati

Nefropatinin en erken klinik belirtisi mikroalbüminürüdür. İleri düzeyde proteinüri ortaya çıkar. Gliseminin kontrolü nefropatinin ilerleyiş hızını yavaşlatacaktır.³⁵ Hiperglisemi nefropati, retinopati, diyabetik anjiyopatinin gelişiminin belirlenmesi için en önemli bir belirteç olduğu gösterilmiştir.⁶⁵ Tip 1 diyabetiklerde nefropatili olgularda yüksek plazma homosistein değerleri görülmektedir.^{65,66} Nefropatik Tip 1 diyabetiklerde hiperhomosisteinemi görülür ve hastalığın ilerlemesine, ölüm riskinin artmasına katkıda bulunduğu belirtilmiştir.⁶⁷

b) Diyabetik Nöropati

Klinik olarak üç tipe ayrılırlar: Motor nöropati, periferik simetrik sensorial polinöropati (PSSP), otonom nöropati. Motor nöropati ani ortaya çıkar. Özellikle 3,4,6. kafa sinirlerini tutar ve kendiliğinden günler, haftalar içinde geçer. PSSP’de alt ekstremelerde uyuşma, yanma, ağrı, simetrik duyu kaybı görülür. Otonom nöropati değişik sistemleri tutarak gastroparezi, kronik diyare, sfinkter kusurları, istirahat taşikardisine neden olabilir.³⁵

c) Diyabetik Retinopati

Yetişkinlerde en önemli körlük nedenidir. Sıkı kan şekeri regülasyonu retinopati riskini azaltmaktadır.³⁵ Diyabette ve diyabetin önemli komplikasyonlarından olan retinopatik olgularda lökosit membranı yağ asidi bileşiminin önemli ölçüde değiştiğini gösteren bulgular bildirilmiş; diyabette görülen lökosit fonksiyon bozukluklarının lökosit membran yağ asidi bileşimi ile ilgili olabileceği, yine bu değişikliğin bir sonucu olarak membran fosfolipidlerinden salınan lökotrien ve prostaglandin gibi lipid mediatörleri üretiminin değişebileceği ve bunun da diyabetiklerde retinopatinin gelişmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir.⁴⁴ Diyabetik retinopati hastaların plazma homosistein konsantrasyonu yüksektir.^{65,66}

d) Aterosklerozis

Periferik arterlerin tıkaçıcı hastalığıdır. Aterosklerozis başlığı altında değişik klinik ve patolojik formlar vardır. Birincisi ve en sık rastlanılan aterosklerotik hastalıktır (aterosklerozis obliterans). İkincisi, sıklıkla medial sklerozis denilen, daha çok yaşlılarda görülen damar mediasında sklerotik değişiklikler üzerinde gelişen kalsifikasyonlarla karakterizedir.³⁵ DM ateroskleroz için bir risk faktörüdür ve diyabetiklerde ateroskleroz oluşumu normal popülasyona göre 2-3 kat daha fazladır.⁶⁸

Koroner kalp hastalığına neden olan aterosklerozisin etkenleri arasında homosistein yer almaktadır.⁶⁹ Poliansature yağ asitlerinin lipid peroksidasyonunu artırarak aterosklerozu artırdığı düşünülmektedir.⁷⁰ Günümüzde aterosklerozun erken çocukluk döneminde başladığı kabul edilmektedir. Tipik olarak bulgular 60'lı yaşlarda ortaya çıkar. İlk bulgu ani ölüm olabildiği gibi miyokard infarktüsü, istikrarsız anjina veya stabil anjina da olabilir.⁷¹ Aterosklerozisin etkenleri arasında ilk sıralarda hipertansiyon, hiperkolesterolemi, DM ve homosistein sayılmaktadır.⁷²

e) Enfeksiyonlar

f) Hipertansiyon

Diyabetiklerde homosistein düzeyleri hipertansiyon varlığında değişmediği bildirilmiştir.⁷³

g) Kardiyovasküler bozukluk

Toplumumuzda koroner kalp hastalıkları sonucu miyokard infarktüsün başlıca ölüm nedenlerinden biri olduğu ve bu durumun daha da artacağı tahmin edilmektedir.⁷⁴ Na⁺, K⁺ ATPazın aktivitesinin inhibisyonu sonucu miyokardiyal kasılma gücünün arttığı bilinmektedir.⁷⁵ Miyokardiyal fonksiyon ve ölümcül ventriküler aritmilerin artmış oksidatif hasara bağlı membran değişikliklerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.^{76,77} Miyokardiyal kasılma gücünün zayıflamasında ise önemli bir etken -SH bağlı moleküllerin oksidasyonu olduğu belirtilmiştir.^{78,79} Artan oranda reaktif oksijen türlerinin membran lipidleri ya da proteinleriyle etkileşerek miyokardiyal kasılmada yetersizliğe yol açabileceği belirtilmiştir.⁸⁰ Koroner arter hastalıkları (KAH) için üçyüze yakın risk faktörü tanımlanmış ancak bunların yedisi ana faktör olarak kabul edilmiştir. Bir bireyde bunlardan iki veya daha fazlası bulunursa o bireyin koroner arter hastalığı (KAH) riski belirginleşmiş demektir.

Bu risk faktörleri;

Yaş: Bağımsız bir risk faktörüdür.

Cinsiyet: Belirgin olarak erkeklerde fazla tespit edilmiş.

Aile öyküsü: Ailede aynı hastalık varsa risk beş kat daha fazladır.

Sigara: İlişki çok yüksektir.

Hipertansiyon: Çok önemli bir risk faktörüdür. Ateroskleroza başlatır ve hızlandırır. Hipertansif hastalarda hastalık sıklığının artmasının yanı sıra KAH mortaliteside artar.

Hiperlipidemi: En önemli risk faktörüdür. LDL' nin %25 azaltılması kalp-damar hastalıklarına bağlı mortaliteyi %30 azaltmaktadır.

DM bir çok risk faktörünün iç içe bir arada bulunduğu komplike bir bozukluktur. Diyabetli hastaların %80' i koroner ateroskleroza bağlı nedenlerle ölmektedir. Tip 2 DM de koroner mortalite dört kat daha fazladır. Tip 1 DM' de ise on kat artar.³⁵ Bu faktörlerin dışında; kişilik yapısı, kişisel ve toplumsal stres, hiperhomosisteinemi, trombojenik faktörler sayılabilir.³⁵

2.4. DİABETES MELLİTUS VE LİPİD METABOLİZMASI

DM insülin salgılanmasında ve/veya etkisindeki yetmezlikten kaynaklanan ve hiperglisemi, hipelipidemi ve hiperaminoasidemi ile karakterize sistemik bir hastalıktır.⁸¹

Lipid metabolizması bozuklukları diabetiklerde de çok sık görülmektedir. Hatta lipid ve lipoprotein metabolizması bozukluğunun en sık görüldüğü grup diabetir. Diabet aterosklerozun önemli bir sebebi olduğundan aterojenik lipoproteinlerin diabetli kişilerde akümülyasyonuna özel bir dikkatle eğilmek gerekmektedir. Daha az tehlike arzeden, ksantomaların oluşumu da VLDL ve IDL veya LDL'lerin birikmesinden

kaynaklanmaktadır.⁸¹ Diabetle hiperlipidemi arasındaki ilişkinin anlaşılması kolay değildir. Hipertrigliseridemi insülin rezistansına ve glukoz toleransının bozulmasına yol açmaktadır.

Diabetik hastalarda en sık görülen bulgular, hipertrigliseridemi, normal veya hafif artmış kolesterol seviyesi (LDL-Kolesterol) ve azalmış, normal veya artmış HDL-Kolesterol seviyeleridir. Özellikle HDL-Kolesterol deki farklılıklar diabetiklerin statüsünden kaynaklanmaktadır. Trigliserid konsantrasyonundaki artış Tip 2 'de Tip 1 'den daha önemli bir problemdir. Diğer taraftan diabetik erkeklerdeki prevalans kadınlardan büyüktür. Hipergliseminin kontrolü de bir diğer faktördür. İyi kontrol edilmemiş diabetiklerde trigliserid ve LDL-Kolesterol seviyeleri yükselmiş, HDL-Kolesterol ise azalmıştır. Lipid bozuklukları albüminürlü hastalarda nonalbüminürlü kontrollere göre artmıştır.⁸²

Orta yaştaki Tip 2 diabetiklerde total kolesterol değişmemekte, HDL-Kolesterol düşmekte, trigliseridler ise artmaktadır. Hipertrigliseridemi ve hiperkolesteroleminin ve düşük HDL-Kolesterol derecelerinin hiperglisemiyle ilgili olduğu deneysel olarak tespit edilmiştir.^{83,84}

İnsülin, karaciğerde trigliserid ve kolesterol sentezini arttırmakta, LPL üretim ve etkisini artırmakta, aynı zamanda yağ dokusunda trigliserid sentezini artırıp lipolizi önlemektedir. İnsülin yetmezliğinde, yağ dokusunda lipoliz ve bunun sonucu olarak karaciğere yağ asiti akışı artmaktadır. Serbest yağ asitleri karaciğerde trigliserid sentezini artırmakta ve VLDL sekresyonunda artışa yol açmaktadır. İnsülinin hepatik lipaz ve Apo E reseptörleri üzerindeki etkisi iyi bilinmemekle beraber, muhtemelen Apo B-E reseptörlerine LDL'nin bağlanmasını, karaciğere girişini ve parçalanmasını artırmaktadır. Kısacası insülinin etkisindeki azalma, trigliserid üretiminin artmasına,

kolesterol taşıyan partiküllerin artmasına, HDL'nin azalmasına, LPL aktivitesinin inhibisyonuna ve apoproteinlerin (özellikle Apo B) glikozilasyonuna yol açmaktadır. Glikozile LDL partiküllerinin makrofajlar tarafından alınması, parçalanması, nonglikozile olanlara nazaran daha yavaş olmaktadır.^{81,85} Damar duvar dokusunun glikozilasyonu da damar içinde uzun süre kalan lipidlerle etkileşmekte ve bütün bunlar aterositeniteyi artırmaktadırlar.^{81,86,87,88}

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Materyal

Bu çalışmada, Atatürk Üniversitesi Araştırma Hastanesine müracaat edip Tip 2 Diabetes Mellitus tanısı konan ve diabete bağlı komplikasyon gelişmiş 26 hasta kanı ile çalışıldı. Diabetik komplikasyonu olmayan 20 Tip 2 Diabetes Mellitus hastası kontrol grubu olarak alındı. Hastalardan 5 mL periferik venöz kan örneği alındı ve 3 mL'si jelli biyokimya tüplerine aktarılarak, serumda glukoz, Total kolesterol, LDL-K, HDL-K, VLDL-K ve trigliserid analizleri için kullanıldı. 2 mL kan örneği EDTA'lı tüplere aktarılarak HbA1c analizi ve DNA izolasyonu için kullanıldı. Ticari kit kullanılarak PCR-strip hibridizasyon tekniği ile apo B R3500Q mutasyon analizi yapıldı. Sonuçlar SPSS istatistik programı ile analiz edildi.

3.2. Kullanılan Cihaz Ve Kimyasallar

3.2.1. Cihazlar

- Hibridizasyon cihazı: ProfiBlot T48 (Austria)
- DNA İzolasyon Cihazı: QuatroProbe QP10 (Bee Robotics, UK)
- Termal döngü cihazı (Biometra-Germany)
- Yatay elektroforez sistemi (Biometra- Germany)
- Elektroforez güç kaynağı (Biometra- Germany)
- UV transillumunator (Biometra-Germany)
- UV görüntü analiz sistemi (Biometra-Germany)
- Hassas terazi (Sartorius-Germany)
- Vorteks (Genie, U.S.A)

- Etüv (Heraeus-Hanau)
- Mikrodalga Fırın (Kenwood)

3.2.2. Kimyasal Maddeler

- Proteinaz-K (Merc-Germany)
- Taq DNA polimeraz enzimi (Fermentas-U.S.A)
- 10 X PCR buffer (Roche)
- PCR Primerleri (Genome Identification-Germany)
- Agaroz (Sigma-Germany)
- Etil alkol (Sigma-Germany)
- Etidyum bromür (Sigma)

3.3. DNA İzolasyon Yöntemi

3.3.1. Otomatik DNA İzolasyonu

Dondurulmuş EDTA'lı tam kan örneklerinden DNA izolasyonu QuatroProbe QP10 (Bee Robotics, UK) otomatik DNA izolasyonu cihazı kullanılarak yapıldı. Bu sistem özel polimerle kaplı manyetik bilye teknolojisine dayanmaktadır. Lökositlerden açığa çıkan DNA'nın bağlama tamponuyla manyetik bilyelere bağlanması sağlanır ve daha sonra proteinler, tuzlar ve alkolün uzaklaştırılmasından sonra DNA, manyetik rak üzerinde elüsyon tamponuyla bilyelerden sıvı faza alınır.

DNA izolasyonu için cihazın kendi özel kartuşuna (QuatroPak) 250 µL EDTA'lı tam kan örneği ve 350 µL lizis tamponu pipetlendi. Daha sonra kartuş, cihaza yüklendi ve otomatik izolasyon prosedürü başlatıldı. Cihaz kendi özel ticari kit reaktiflerini kullanarak izolasyon işlemini gerçekleştirmektedir. İşlem sonunda QuadroPak kartuşlar cihaz üzerinden alınarak manyetik raka aktarıldı ve sıvı fazdan 300 µL DNA örneği alındı.

3.3.2. DNA İzolasyon Kiti İçeriği

<u>Reaktif İsmi</u>	<u>Hacmi / Miktarı</u>
Manyetik Bilyeler	2.65 mL
Parçalama Tampon Solüsyonu	18.50 mL
Bağlama Tampon Solüsyonu	50.20 mL
Beyaz Tampon Solüsyonu	44.00 mL
Mavi Tampon Solüsyonu	44.00 mL
10x Elüsyon Tampon Solüsyonu	10.00 mL

DNA izolasyonu kiti reaktifleri açıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 ay kadar stabildir.

3.3.3. Gerekli Diğer Malzemeler

- 1.5 - 2 mL' lik mikrosantrifüj tüpleri
- Aerosol bariyerli pipet uçları
- Manyetik rak
- 2 µL- 1000 µL ayarlanabilir pipet

3.3.4. DNA İzolasyon Reaktiflerinin Hazırlanması

Tüm reaktifler ve numuneler oda sıcaklığına getirilir.

- 1- 10xElüsyon tamponu moleküler derecede su kullanarak son hacmi 100 mL olacak şekilde 1:10 oranında dilüe edilir. Cihazla birlikte temin edilen KIRMIZI etiketli şişeye koyulur.
- 2- Tüm manyetik bilyeler YEŞİL etiketli bağlama tamponuna eklenir. Bilyeler ve bağlama tamponu QuatroProbe'a yerleştirilmeden önce iyice karıştırılmalıdır.
- 3- Orijinal şişe kapakları cihazla birlikte temin edilen tamamlayıcı plastik tüpleri olan kapaklarla değiştirilir.

3.3.5. QuatroProbe Kullanımı

Uygun bir rak'a örnekler yerleştirilir. Her bir tüp numaralandırılır. QuatroPak kutusu açılır, kapaklar çıkarılır ve her bir numuneye karşı gelecek kanal belirlenir. Yeteri kadar reaktif olup olmadığını kontrol edilir. Her bir çalışma öncesi, cihaz üzerindeki 6 adet enjektör ucu değiştirilir.

3.3.6. Numunelerin Çalışılması

Her bir QuatroPak kanalına 250 µl tam kan örneği pipetlenir. Üstüne 350 µL parçalanma tamponu pipetlenir ve numune pipetaj yapılarak karıştırılır. Köpük ve hava kabarcığı oluşmaması için özen gösterilir.

QuatroPak kartuşları cihaza yüklenir ve otomatik izolasyon işlemi başlatılır. İşlem sonunda kartuşlar cihaz üzerinden çıkartılır ve özel manyetik rak üzerine konulur. QuatroPak kartuştan en az 300 µL' lik DNA örneği alınabilir. Bu numune ya direk PCR çalışmalarında kullanılır veya gerek duyulana kadar bir tüpte saklanabilir.

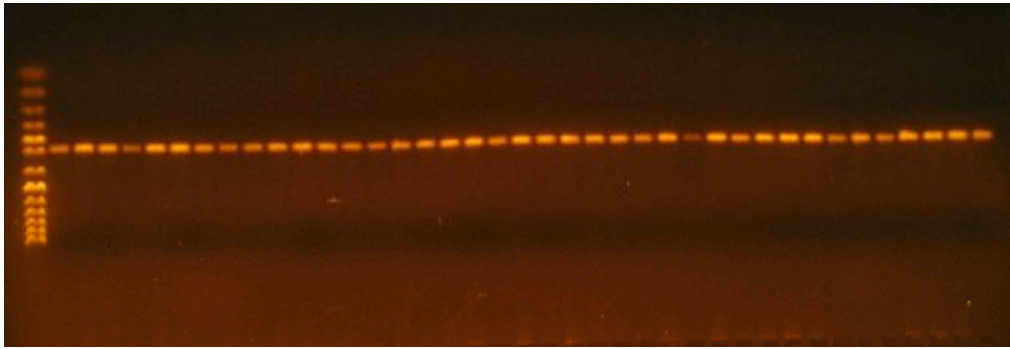
3.3.7. DNA Konsantrasyonunun Ölçülmesi

İzole edilen DNA'ların konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle belirlendi. 5 µL stok DNA örneği ve 195 µL distile su alınarak spektrofotometrede 260 nm ve 280 nm'de absorbans ölçülerek DNA'nın miktarı ve saflığı tayin edilir. İzole edilen DNA'nın saflığı ise OD_{260}/OD_{280} oranına göre saptanır. Bu oran temiz bir üründe 1.8-2.0 arasında beklenir. 2.0'ın üzerindeyse RNA, 1.8'in altındaysa protein kontaminasyonu var demektir. 1.5'in altındaysa kirlilikten dolayı PCR çalışmasında DNA saflığına bağlı problemler ortaya çıkabilir. Stok DNA örnekleri -20°C'de saklanır.

3.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi şu şekilde yapıldı.

- 1- 1.5 gr agaroz tartılarak 250 mL'lik bir erlenmayere kondu ve üzerine 75 ml 1X Tris Asetik Asit EDTA (TAE) tamponu eklendi. Mikrodalga fırınında agar eriyene kadar yaklaşık 1.5 dakika tutuldu ve kaynatıldı.
- 2- Eriyen agar solüsyonu oda ısısında bekletilerek yaklaşık 55 °C'ye kadar soğutuldu ve 0.5 mg/mL'lik etidyum bromür'den 2.5 µL ilave edildi.
- 3- Daha önceden tarakları, tabanda yaklaşık 1 mm boşluk kalacak şekilde yerleştirilen elektroforez kabına hazırlanan agaroz jel döküldü ve donması için oda sıcaklığında 20-30 dakika bekletildi.
- 4- Taraklar her iki uçtan tutularak dikkatlice çıkartıldı ve jel kabı elektroforez tankına yerleştirildi.
- 5- Jelde ortaya çıkan kuyucuklara total 5 µL olacak şekilde uygun DNA marker ve PCR ürünleri (5 µL PCR ürünü + 1 µL 6X yükleme tamponu) aktarıldı.
- 6- Elektroforez 70 volt'da 2 saat süreyle yapıldı.
- 7- Ortaya çıkan bantlar UV transilliminatorde marker ve DNA'ların katettikleri mesafeler gözlemlendi. UV görüntü analiz sistemimizde sonuçlar kaydedildi. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. PCR işleminden sonra DNA'ların agaroz jel elektroforezinde yürütülmeleriyle elde edilen resim.

3.5. Apolipoprotein B Geninde Arg3500Gln mutasyonunun Belirlenmesi

İçin Ters Hibridizasyon Kiti

3.5.1. Kit İçinde Bulunan Materyaller (Her bir kit için)

Kit kapasitesi	12 test
ApoB gen problemleri emdirilmiş nitroselüloz strip	12 strip
Denaturasyon çözeltisi (çözelti 1)	0,6 mL
Hibridizasyon tamponu (çözelti 2)	15 mL
Bağlanma yıkama tamponu (çözelti 3)	40 mL
Yıkama I çözeltisi (çözelti 4)	40 mL
Bağlama çözeltisi (konsantre)	0,2 mL
Bağlama tamponu (çözelti 5)	15 mL
Yıkama II çözeltisi (çözelti 6)	40 mL
Substrat (çözelti 7)	15 mL
İnkübasyon tepsisi	1 adet

3.5.2. Kit Çözeltilerinin Hazırlanması

2-8°C'de saklanan çözeltiler kullanımdan önce oda sıcaklığında bir yerde bekletilmeli. Hibridizasyon tamponu ve bağlama yıkama çözeltisi su banyosunda 47°C'ye kadar ısıtılmalı. Çözeltilerde çökelek olmamalı. Gerçek sıcaklığı sağlamak için inkübasyon tepsisi su banyosuna üçte birine kadar batırılmalı.

Konjugat Seyreltmesi

Konsantre konjugat kullanımdan kısa bir süre önce konjugat tamponu ile 1:100 oranında seyreltilmeli. Her strip için, 10µl konjugat 1ml konjugat tamponu ile seyreltilip dikkatlice karıştırılmalı.

3.5.3. Test Prosedürü

1. Çözelti 2 ve 3 47°C'ye diğer tüm çözeltiler ise önceden oda sıcaklığına getirildi. Komplikasyonlu ve komplikasyonsuz grupların sayısına göre inkübasyon tepsi hazırlandı. Inkübasyon tepsinin kuyucukları köşelerine işaretlendi. (Önceden içlerinde çalışma yapılan kuyucuklar tekrar kullanılmamalı.)
2. 40 µL denatürasyon çözeltisi (çözelti-1) işaretlenen kuyucuğa pipetlendi.
3. Denatürasyon çözeltisine 20 µL amplikon pipetlenir. İyi karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
4. Her kuyucuğa dikkatlice 1 mL çözelti 2 pipetlendi.
5. Stripler cımbız ile tüplerin dışına alındı ve inkübasyon tepsinine kondu. Stripler tamamen sıvıya batmalı. Bu uygulama sonraki inkübasyon ve yıkama işlemlerinde de uygulandı.
6. Tepsi su banyosu çalkalayıcısında 47°C'da 30 dakika inkübe edildi.
7. Hibridizasyon tamponu tamamen çıkarıldı ve her seferinde stripler oda sıcaklığında bir dakika hafif hareketlerle yatay çalkalayıcıda 1mL çözelti-3 ile iki kere yıkandı.
8. Her stribe 1 mL bağlama yıkama çözeltisi eklendi ve 47°C'de 15 dakika hafifçe çalkalanan su banyosunda inkübe edildi.
9. Bundan sonra oda sıcaklığında devam edildi. Çözelti ayrıldı ve stripler iki kere 1 mL yıkama 1 çözeltisi (çözelti 4) ile yıkandı.

10. Her bir scribe 1 mL bağlama çözeltisi (konsantre çözelti 1:100 oranında çözelti 5 ile seyreltilir) eklendi ve oda sıcaklığındaki çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edildi.
11. Bağlama çözeltisi çıkarıldı ve 1mL çözelti 6 çözeltisi ile üç kere her bir strip çalkalayıcıda 1 dakika yıkandı.
12. Her kuyucuğa pipetle 1 mL çözelti 7 eklendi ve 10-20 dakika inkübe edildi.
13. Reaksiyon 1 mL destile su ile iki kere yıkanarak durduruldu.
14. Cımbız ile stripler çıkarıldı ve kağıt havlu üzerinde kurutuldu. Stripler güneş ışığından korunmalıdır.

3.5.4. Değerlendirme

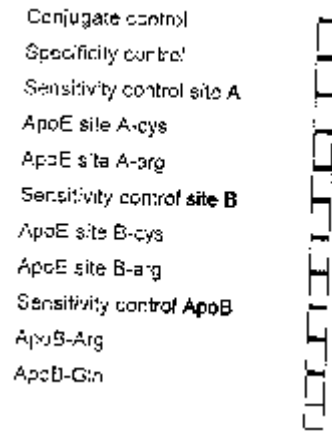
Stripleri kuruttuktan sonra beyaz bir kağıdın üzerine konmalı. Sonucun değerlendirilmesi için reaksiyon bölgeleri işaretlenen, kit içindeki özel şablon kullanılmalı. İşaretlenen boşluğun alt son çizgisi striplerdeki numaraların üstündeki siyah çizgi ile tam uyuşmalı.

Eğer şablon üzerinde işaretlenen pozisyon strip üzerindeki reaksiyon bölgesiyle tam uyuşursa reaksiyon bölgesi tanımlanır. Her sribin bir eşleniği, bir spesifikliği ve üç duyarlılık kontrol bölgesi vardır. Eşlenik ve duyarlılık kontrol bölgeleri test süresince tamamen oluşmalı. Eğer bu kontrol bölgeleri oluşmazsa hatalı negatif sonuç gözükcektir. Bu durumda test tekrarlanmalıdır.

Eğer spesifiklik kontrol bmlgesi oluşmuşsa yanlış pozitif reaksiyon kaydedilir. Bu durumda test yine tekrar edilmelidir.

3.5.5. Sonuçların Yorumu

11 Reaksiyon bölgesi belirlenebilir (Şekil.3.2).



Şekil 3.2. Nitrocellulose strip üzerinde kontrol ve çalışma gen bölgeleri.

Konjugat Kontrolü

Bu reaksiyon bölgesi konjugat bağlanma verimini gösterir. Mutlaka oluşmalıdır.

Spesifiklik Kontrolü (Specificity control)

Bu reaksiyon bölgesi sadece yıkama sıcaklığı çok düşük olduğunda oluşur. Spesifik olmayan hibridizasyonu gösterir.

Apo B Hassasiyet Kontrolü (Sensitivity control ApoB)

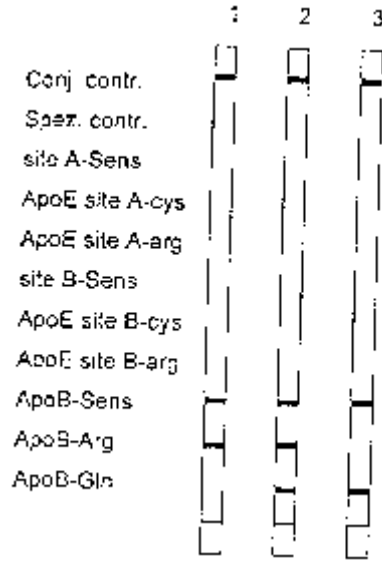
Bu reaksiyon bölgesi Apo B PN karışımının çoğalma kontrolü olarak fonksiyon görür ve hibridizasyonun en uygun hassasiyetini belgeler.

Apo B-Arg

Bu reaksiyon bölgesi eğer 3500 pozisyonundaki Apo B geni arginin için kodlanırsa oluşur.

Apo B-Gln

Bu reaksiyon bölgesi eğer 3500 pozisyonundaki Apo B geni glutamin için kodlanırsa oluşur. Eğer sadece Apo B-PN karışımı birleşmişse aşağıdaki band dizisi görülür (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Apo B-PN'nin hibridizasyonundan sonra band dizesi.

Şekil 3.3'ün band dizesi Apolipoprotein B genotipinin sonucunu gösterir.

1. homozigot ApoB-Arg
2. heterozigot ApoB-Arg // ApoB-GIn
3. homozigot ApoB-GIn ⁸⁹⁻¹⁰⁶

3.6. İstatistik Analiz

Sonuçlar ortalama değer \pm standart sapma ($\bar{x} \pm SD$) olarak ifade edildi. Ölçülen biyokimyasal parametreler için grup ortalamaları arasındaki farkın önemlilik derecesi Mann Whitney U testi ile belirlendi. R3500Q mutasyonunun diabetin komplikasyonu ile ilişkisinin analizi için X^2 testi yapıldı. Bu işlemler için "SPSS for Windows v 11.0" istatistik paket programı kullanıldı ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Yapmış olduğumuz çalışma sonucu elde ettiğimiz biyokimya parametrelerine ait ortalama sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir. Bu tablodan görüldüğü gibi komplikasyonlu grup ile komplikasyonu olmayan grubun aynı parametreleri (Glukoz, Total Kolesterol, LDL-K, HDL-K, Trigliserid, HbA1c, VLDL) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ($p>0.05$)

Tablo 4.1. Komplasyonu olan ve olmayan gruplara ait bulguların karşılaştırılması.

Parametre	Komplikasyonlu Kişiler (X±SD)	Komplikasyonu olmayan kişiler (X±SD)	Anlamlılık
Glukoz	235.57±132.71	196.15±73.37	$p>0.05$
Total Kolesterol	191.09±48.98	200.06±23.23	$p>0.05$
LDL-K	134.98±34.61	138.31±21.55	$p>0.05$
HDL-K	37.27±10.63	46.56±16.50	$p>0.05$
Trigliserid	229.00±163.87	217.69±104.97	$p>0.05$
VLDL	46.59±33.38	43.56±20.95	$p>0.05$
HbA1c	8.51±1.42	8.56±1.42	$p>0.05$

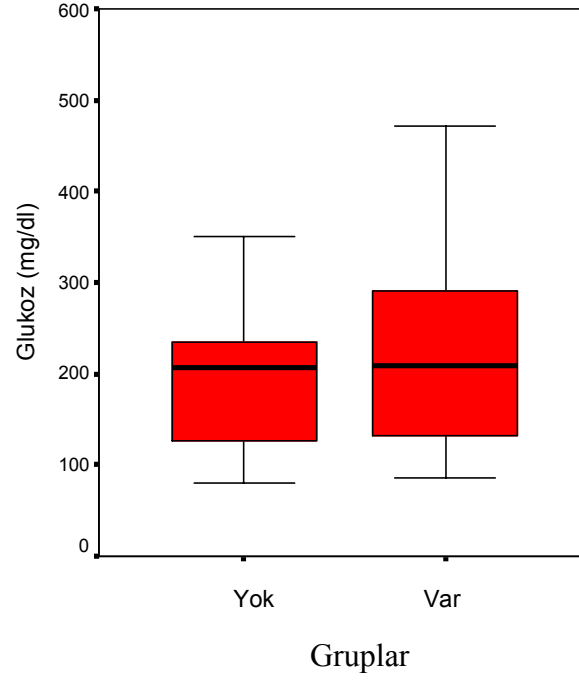
Çalışmalarımız sonucu elde edilmiş olan değerlerin şekilsel gösterimleri aşağıda verilmiştir.

Komplikasyonlu ve komplikasyonsuz grupların glukoz sonuçlarının karşılaştırılmasına ait grafik Şekil 4.1’de verilmiştir. Komplasyonu ve komplikasyonsuz grupların total kolesterol sonuçlarının karşılaştırılmasına ait grafik

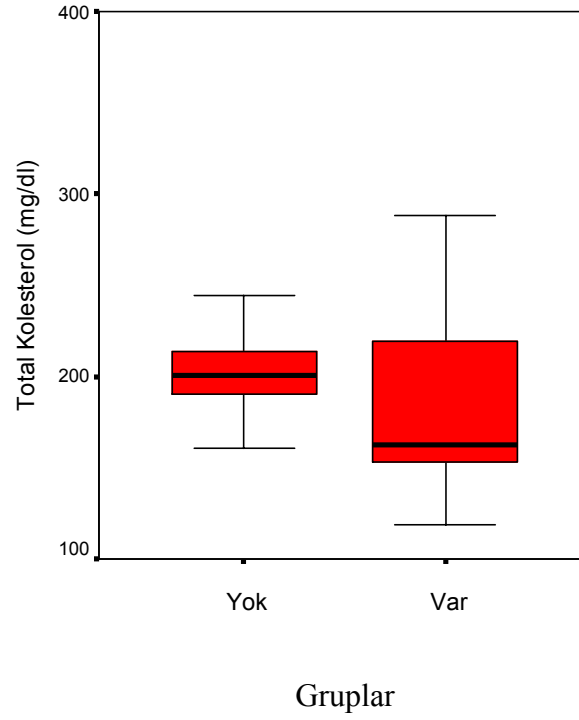
Şekil 4.2 'de verilmiştir. Komplikeşyonlu ve komplikeşyonsuz grupların LDL-K sonuçlarının karşılaştırılmasına ait grafik Şekil 4.3 'de verilmiştir. Komplikeşyonlu ve komplikeşyonsuz grupların HDL-K sonuçlarının karşılaştırılmasına ait grafik Şekil 4.4'de verilmiştir. Komplikeşyonlu ve komplikeşyonsuz grupların trigliserid sonuçlarının karşılaştırılmasına ait grafik Şekil 4.5 'da verilmiştir. Komplikeşyonlu ve komplikeşyonsuz grupların VLDL sonuçlarının karşılaştırılmasına ait grafik Şekil 4.6'da verilmiştir. Komplikeşyonlu ve komplikeşyonsuz grupların HbA1c sonuçlarının karşılaştırılmasına ait grafik Şekil 4.7'de verilmiştir.

Şekil grafiklerinde üst ve alt çizgiler standart sapmayı, orta çizgi medyan (bulguların %50'sinin toplandığı kısım), medyanın üstü dağılımın %75'ini, medyanın altı dağılımın %25'ini göstermektedir.

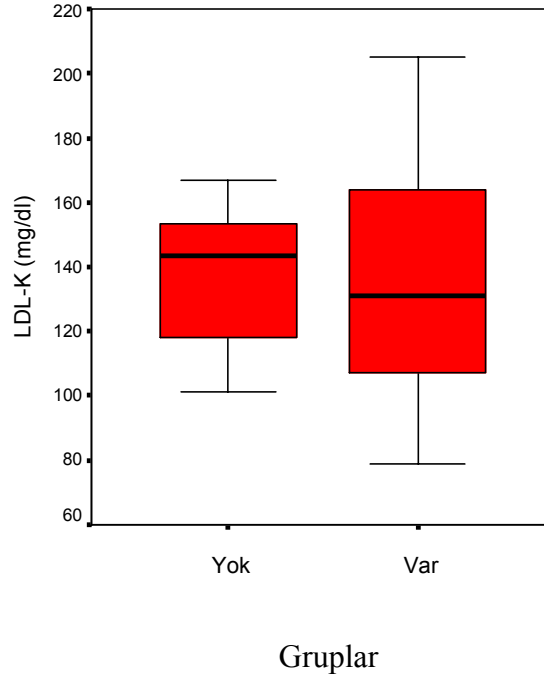
Yapmış olduğumuz çalışma sonucu elde ettiğimiz bulgulara ait grafikler aşığıda verilmiştir.



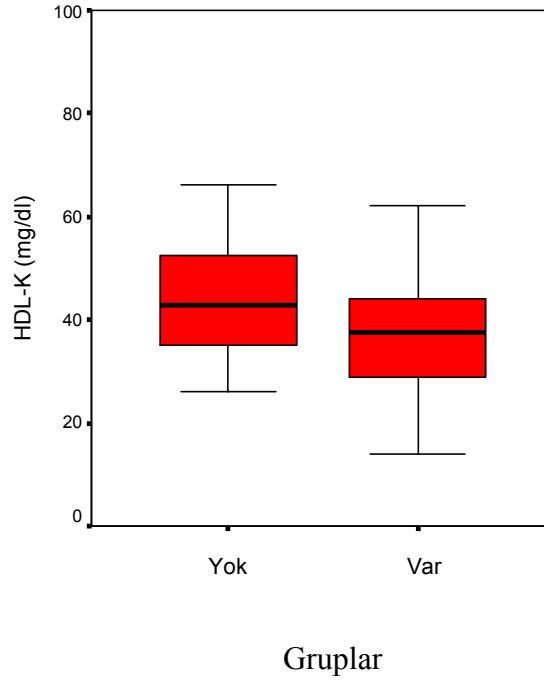
Şekil 4.1. Komplikeşonsuz (Yok) ve komplikeşyonlu (Var) grupların glukoz değęerlerinin karşılaştırılması.



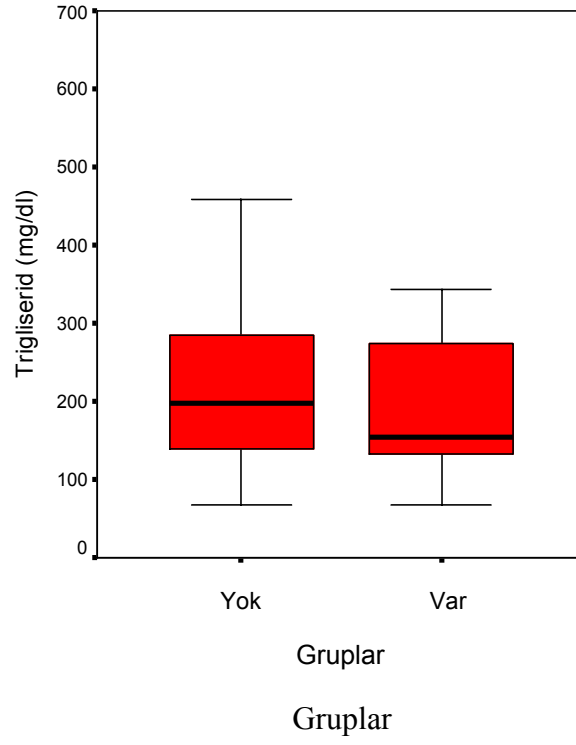
Şekil 4.2. Komplikeşonsuz (Yok) ve komplikeşyonlu (Var) grupların total kolesterol değęerlerinin karşılaştırılması.



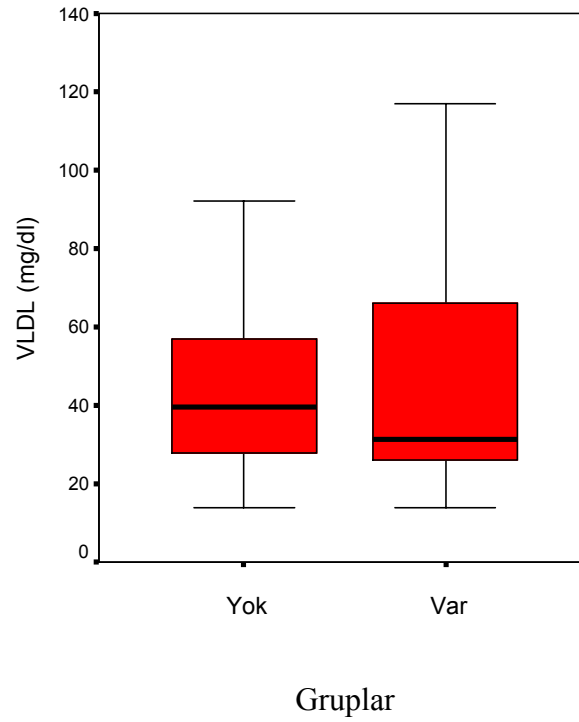
Şekil 4.3. Kompliksionsuz (Yok) ve kompliksionlu (Var) grupların LDL-K değerlerinin karşılaştırılması.



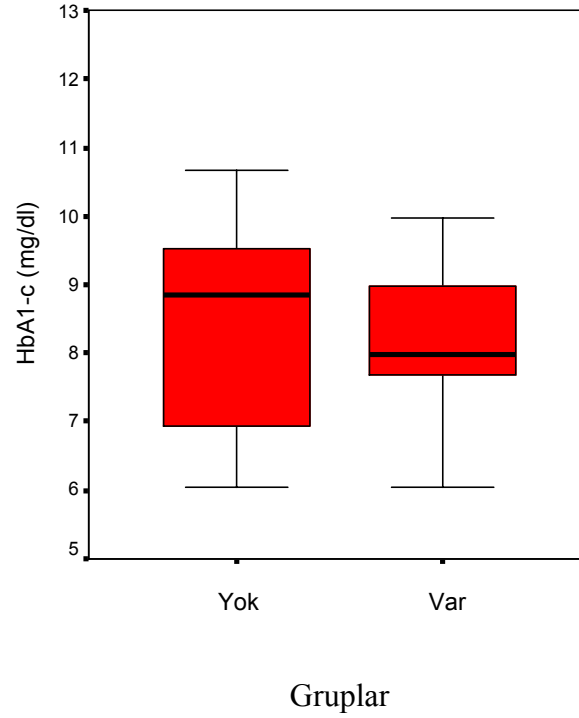
Şekil 4.4. Kompliksionsuz (Yok) ve kompliksionlu (Var) grupların HDL-K değerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.5. Komplikeşonsuz (Yok) ve komplikeşonlu (Var) grupların trigliserid değęerlerinin karşılaştırılması.



Şekil 4.6. Komplikeşonsuz (Yok) ve komplikeşonlu (Var) grupların VLDL değęerlerinin karşılaştırılması.



Şekl 4.7. Komplikasyonsuz (Yok) ve komplikasyonlu (Var) grupların HbA1-c değerlerinin karşılaştırılması.

Komplikasyonlu ve komplikasyonsuz gruplarda R3500Q mutasyonu görülüp görülmemesine ait bulgular Tablo 4.2'de verilmiştir. R3500Q mutasyonu komplikasyonlu grupta %19.23, herhangi bir komplikasyonu olmayan grupta %15.00 ve tüm gruplarda %17.39 bulunmuştur. Komplikeasyonlu ve komplikeasyonsuz gruplarda R3500Q mutasyonu görülüp görülmemesine ilişkin X^2 istatistik sonuçları tablo 4.3'de verilmiştir.

Bu tablolardan görüldüğü gibi komplikasyonlu ve komplikeasyonsuz gruplar arasında R3500Q mutasyonu görülüp görülmemesi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($p>0.05$)

Tablo 4.2. Komplıkasıyonlu ve komplıkasıyonsuz grıplarda R3500Q mutasyonu gürölüp gürölmemesine ait bulgular.

	KOMPLİKASYONU OLMAYAN GRUP	KOMPLİKASYONU OLAN GRUP
Hasta No	Apo B tipi	Apo B tipi
1	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
2	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
3	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
4	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
5	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
6	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
7	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
8	HETEROZİGOT Apo B ARG/Apo B GLN	HOMOZİGOT Apo B ARG
9	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
10	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
11	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
12	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
13	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
14	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
15	HETEROZİGOT Apo B ARG/Apo B GLN	HETEROZİGOT Apo B ARG/Apo B GLN
16	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
17	HETEROZİGOT Apo B ARG/Apo B GLN	HETEROZİGOT Apo B ARG/Apo B GLN
18	HOMOZİGOT Apo B ARG	HETEROZİGOT Apo B ARG/Apo B GLN
19	HOMOZİGOT Apo B ARG	HOMOZİGOT Apo B ARG
20	HOMOZİGOT Apo B ARG	HETEROZİGOT Apo B ARG/Apo B GLN
21		HETEROZİGOT Apo B ARG/Apo B GLN
22		HOMOZİGOT Apo B ARG
23		HOMOZİGOT Apo B ARG
24		HOMOZİGOT Apo B ARG
25		HOMOZİGOT Apo B ARG
26		HOMOZİGOT Apo B ARG

Tablo 4.3. Komplikeşonsuz ve komplikeşonlu gruplarda R3500Q mutasyonu görölüp görölmemesine ilişkin X^2 istatistik sonuçları.

		Komplikasyon				Toplam	%**	p
		Var		Yok				
		n	%*	n	%*			
Genotip	Mutant	5	62,5	3	37,5	8	17,4	
	Normal	21	55,3	17	44,7	38	82,6	1,0
	Toplam	26	56,5	20	43,5	46	100,0	

*.sadır yüzdesi

**..sütun yüzdesi

Risk Tahmini			
	Değer	95% Güven Aralığı	
		Düşük	Yüksek
Olasılık Oranı	1,35	0,28	6,47

5. TARTIŞMA

Le Tensorer'e göre R3500Q mutasyonu mezolitik çağda yaşayan ortak atalar arasında ortaya çıkmıştır (10000-6000 yıl önce).¹⁰⁷ R3500Q mutasyonu Avrupalılar tarafından kolonize edilen Avusturalya, Kuzey Amerika, Preneslerde ve Alplerin kuzeyindeki merkezi Avrupadaki popülasyonda baskın olduğu için Myant ve arkadaşları bu mutasyonun yaklaşık olarak 7000 yıl önce merkezi Avrupada ilk kez ortaya çıktığını ileri sürdü.¹⁰⁸

İnsan vücudunda kolesterolü karaciğerden perifere taşıyan esas lipoprotein LDL'dir. Sirkülasyondaki LDL'lerin %30'u LDL (Apo B-E) reseptörleri ile uzaklaştırılmaktadır. Karaciğere giren LDL'ler lizozomal aktivite ile parçalanır. Kolesterol sentezinin inhibisyonu sonucu karaciğer hücresinden çıkan kolesterol azalır. Plazma LDL seviyesinde, karaciğere giren LDL seviyesinde ve enzimin inhibisyonunda azalma olur. Bunun dışında bu yol LDL reseptörleri ile de kontrol edilmektedir.

Apolipoprotein B, 4536 aminoasit içeren büyük bir proteindir ve LDL reseptörleri için ligand olarak görev görür. Apo B geni birkaç şekil ve mutasyonlar içermektedir. Bu mutasyonlardan biri de R3500Q mutasyonudur. Bu mutasyon, mutasyona uğramış LDL'nin reseptörüne bağlanma aktivitesini azaltmakta ve hiperlipidemiye neden olmaktadır.

Diabet genellikle plazma lipoproteinlerinde anormal değişikliklerle birlikte görülür. VLDL, trigliserit konsantrasyonlarında artma en çok görülen lipoprotein anormallikleridir.

Son yıllarda diabetin genetik temelleri üzerindeki çalışmalar yoğunluk kazanmış, araştırmacılar diabeti moleküler düzeyde inceleyerek, bu hastalıkla ilgili bir defekt bulmaya çalışmaktadırlar. Diabetik hastaların lipid metabolizmalarının bozuk olması bunlarda Apolipoprotein B geni ile ilgili bir defektin olabileceğini bize

düşündürmüştür. Bu amaçla çalışmamızda NIDDM' li hastalarda Apolipoprotein B geninde görülen R3500Q mutasyonu ve bu mutasyonun serum lipid profili ile ilişkisini inceledik.

Apolipoprotein B-100 VLDL, IDL, LDL gibi lipoproteinlerin yapısal proteini olmasının yanında LDL 'nin LDL reseptörüne bağlanmasında rol oynamaktadır. LDL 'nin kandaki kolesterolün % 70 'ini taşıdığı göz önüne alınırsa bu proteindeki kolesterole bağlanmasını etkileyen bir değişikliğin hiperkolesterolemiye yol açacağı şüphesizdir. Bu yüzden Apolipoprotein B-100 'de mutasyon araştırması yapmak uygundur.

R3500Q mutasyonu, apolipoprotein B-100 'de bir amino asit değişikliğine yol açarak bu proteinin LDL reseptörüne bağlanmasını bozan ve ailevi defektif apo B-100 (FDB) olarak adlandırılan tabloya yol açan mutasyondur .^{109,110} Apo B-100 proteininin 3500 üncü amino asidi normal proteinde arginin iken bu mutasyonun varlığında 3500 üncü amino asit glutamin olarak yer alır. Buna yol açan gendeki tek bir baz değişikliği olup dizi CCG 'den CAG 'ye değişir. Sonuçta tek bir amino asit değişikliği proteinin sekonder ve/veya tersiyer yapısını değiştirerek LDL reseptörüne bağlanmasını azaltır. Bu mutasyon sonucu heterozigot bireylerin LDL'sinin LDL reseptörlerine bağlanma aktivitesi, in vitro bağlanma deneylerinde, normal LDL'nin %32 'si kadardır .¹¹¹

Orta Avrupa'nın özellikle İsviçre (1:209) ve Belçika'nın (1:250) yüksek frekansta R3500Q mutasyonuna ev sahipliği yaptığı literatürde belgelenmiştir.^{112,113}

Amerikada prevalansı artan kronik hastalıklar içinde en önemlisi NIDDM olarak belirlenmiş ve NIDDM daki esas ölüm sebebi ise koroner arter hastalıkları olarak bulunmuştur. Bu durumun en önemli faktörlerinden birisi diabette lipoproteinlerdeki artıştır. Lipoproteinlerdeki bu anormallikler düzeltildiği takdirde, NIDDM da koroner arter hastalıklarının gelişimi önlenir. ¹¹⁴

Bu çalışmanın amacı Erzurum bölgesindeki NIDDM’li Türk populasyonunda Apo B R3500Q mutasyonunun görülme sıklığını ortaya çıkarmaktır.

Yapılacak moleküler testlerin sensitivitesini nükleik asit ürünü, saflık derecesi ve amplifikasyon reaksiyonuna katılacak DNA miktarı belirlemektedir.

Geleneksel manuel nükleik asit ekstraksiyon yöntemlerinin aksaklıkları uzun zaman gerektirmeleri, çok yorucu olmaları, kontaminasyon ihtimalinin çok fazla olması ve işlemin kalitesinin uygulayan kişiye bağlı olması yani hata ihtimalinin yüksek olması olarak sayılabilir.

Otomatik DNA izolasyon yöntemlerinin faydaları ise testin doğruluk derecesini ve tekrarlanabilirliğini artırmaları, insan kaynaklı hataları minimuma indirmeleri ve çok sayıda numuneyi çok daha kısa sürede çalışmamızı sağlamaları olarak sıralanabilir. Örneğin bizim kullandığımız QuadroProbe QP10 (Bee Robotics, UK) cihazla 50 dakikada 48 örnekten DNA elde edilebilmektedir.

Otomatik DNA izolasyon yöntemlerinin bu avantajlarından dolayı çalışmalarımızda özel polimerle kaplı manyetik bilye tekniğini kullanarak, taze veya dondurulmuş tam kan örneklerinden DNA izolasyonuna imkân veren QuadroProbe QP10 otomatik DNA izolasyon sistemini kullandık.

Yapmış olduğumuz çalışma sonucu elde ettiğimiz biyokimya parametrelerine ait ortalama sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

Bu tablodan görüldüğü gibi komplikasyonlu grup ile komplikasyonu olmayan grubun aynı parametreleri (Glukoz, Total Kolesterol, LDL-K, HDL-K, Trigliserid, HbA1c, VLDL) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir.

Gruplar arasında R3500Q mutasyonu görülme sıklığı bakımından anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

Apo B-100 LDL nin bir iç bileşimidir ve LDL reseptörü için ligant olarak görev yapar. Bundan dolayı Apo B genindeki mutasyonlar fonksiyonel faaliyetlerini önemli ölçüde değiştirirler ve LDL reseptörüne bağlanmayı azaltarak LDL partiküllerinin klirensini geciktirirler. Sonraki durum genellikle aterosklerozun erken başlama riskiyle birlikte çok ciddi veya orta düzeyde hiper kolesterolemiye neden olur.^{115,116}

Yapmış olduğumuz çalışmada herhangi bir komplikasyonu olan ve olmayan NIDDM' li kişilerde Apolipoprotein B polimorfizminin dağılımı incelendi ve daha önce yapılmış olan sağlıklı popülasyonlardaki dağılımlarla karşılaştırıldı. Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'de de görüldüğü gibi herhangi bir komplikasyonu olan ve olmayan NIDDM lu kişilerde Apolipoprotein B genotiplerinin dağılımı arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Bu sonuç da bize herhangi bir komplikasyonu olan ve olmayan NIDDM' li kişilerde Apolipoprotein B-100 R3500Q ilgili bir defekttten söz edilemeyeceğini göstermektedir.

R3500Q mutasyonunun geniş bir coğrafya ve nüfus dağılımı değişimine sahip olduğu bilinir. Bu dağılım Avrupada en düşük 1:1250 en yüksek 1:71 seviyesindedir¹¹⁷ ve ortalama nüfus yoğunluğu Kuzey Amerika ve Merkezi Avrupa'da 1:500 ile 1:700 arasındadır.¹¹⁸⁻¹²⁰ Nüfus araştırmaları Avrupanın değişik bölgelerindeki mutasyon sıklığını değerlendirmek için yapılmıştır.

R3500Q mutasyon sıklığı avrupanın merkezinde yüksek olduğu ve doğudan batıya gittikçe azaldığı için İspanya, Türkiye ve İsrail gibi Akdeniz ülkelerinde tamamen ortadan kaybolur.¹²¹ Bu yüzden Erzurum Bölgesinde de yaygın olmaması bulgusu literatür araştırmaları ile uyumludur. Literatür taramalarında özellikle Erzurum Yöresinde NIDDM'li hastalarda R3500Q mutasyonu ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız Erzurum Bölgesinde bu mutasyonla ilgili değerli bilgiler

sunar ve R3500Q mutasyonunun NIDDM hastalarındaki rolünü değerlendirmek amacıyla gelecekteki çalışmalara öncü olmuştur.

6. SONUÇ

Kaynak taramalarında Türk toplumunda Tip 2 diabetiklerde apo B R3500Q mutasyonunu ve serum lipid profili ile ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu alışma ile Erzurum yoresindeki Türk populasyonunda Tip 2 diabetiklerde apo B R3500Q mutasyonunun lipid ve apolipoprotein düzeylerine etkisi ilk kez ortaya çıkarılmıştır. Herhangi bir komplikasyonu olan ve olmayan Tip 2 diabet grupları ele alınıp karşılaştırıldığında R3500Q mutasyonu görülme sıklıkları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çalışmamız Erzurum Bölgesinde bu mutasyonla ilgili değerli bilgiler sunar ve R3500Q mutasyonunun NIDDM hastalarındaki rolünü değerlendirmek amacıyla gelecekteki çalışmalara basamak teşkil edecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Laakso M. Lipids and lipoproteins as risk factors for coronary heart disease in non insulin dependent diabetes mellitus. *Annals of Medicine*. 1996; 28: 341-345.
2. Dodsan PM and Barnett AH. Lipids diabetes and vascular disease. Science Presse Limited. London. 1992.
3. Boemi M, Sirolla C, Amadio L, Fumelli P, Pometta D. Apolipoprotein E polymorphism as a risk factor for vascular disease in diabetic patients. *Diabetes Care*. 1995; 18 (4): 504-508.
4. Taskinen MR. Quantitative and qualitative lipoprotein abnormalities in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1992; 41 (Suppl 2): 12-17.
5. Eto M, Watanabe K, Iwashima Y, Morikawa A, Chonan N, Oshima E, Sekiguchi M, Ishii K. Increased frequency of apolipoprotein E4 allele in type II diabetes with hypercholesterolaemia. *Diabetes*. 36. 1987; 1301-1306.
6. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodvel VW. *Harper's Biochemistry*, Appleton Lange, California. 1991; 134-145.
7. Calbmeath DF. *Clinical Chemistry. A Fundamental Testbook*. WB Saunders Company. Philadelphia. 1992; 278-298.
8. Montgomery R, Conway YW, Spector AA. *Biochemistry: A Case oriented Approach*. The C. V. Mosby Company. Toronto. 1990; 409-460
9. Bhagavan NV, Jones P, Barlett P. *Medical Biochemistry*. Boston. 1990: pp.447- 468.
10. Whitby LG, Simith AF, Backett GL. Disorders of Plasma Lipids. In lecture notes on clinical chemistry. Blackwell Scientific Public. Oxford. 1988: 223-241.
11. Evan A, Stein MD. Lipid, lipoproteins and apolipoproteins. In *Textbook of Clinical Chemistry*. 1986; 829-900.

12. Örem A. Sağlıklı Kişilerde lipid ve lipoprotein düzeyleri, Uzmanlık tezi, Trabzon, 1993; 1-35.
13. Gotto AM, Pownall HJ, Hovel HJ. Introduction to the plasma lipoproteins. In: Methods in enzymology. Segrest P, Albers JJ. (Eds) Academic Press. London. 1986: 3-41.
14. Stein AE, Myers LG. Lipids, Lipoproteins and apolipoproteins. In: Brus A, Ashwood ER (eds). Tietz textbook of clinical chemistry, W. B. Saunders Co. Philadelphia. 1994; 1002-1093.
15. Bhagavan NV. Medical Biochemistry, Jones and Barlett Publishers, London, 1992: 447-467.
16. Martin DW. (Harper's Review of Biochemistry, 19. Ed. Lange Medical Publications), Menteş NK, Menteş G. (Çevirenler), Harper'ın Biyokimyaya Bakışı, İzmir. Ege Üniv. Basımevi. 1986; Cilt 1, 206.
17. Breslow JK. Apolipoprotein genetic variation and human disease. American Physiological Review. 1988; 68; 85-106.
18. Breckenridge WC. Deficiencies of plazma lipolytic activities. Am. Heart J. 1987; 113/2. (2): 567.
19. Tietz NW. Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia. W. B. Saunders Company. 1986; 830.
20. Olofsson SO, Boström K, Carlsson P, et.al. Structure and biosynthesis of apolipoprotein. Am. Heart. J. 1987: 113: 446-452.
21. Breslow JL. Genetic regulation of apolipoproteins. Am. Heart J. 1987: 113: 2: 422-427.

22. Gries A, Nimpf J, Nimpf M, et al. Free and Apo B associated Lp(a) specific protein in human serum. *Clin. Chem. Acta.* 1987; 164: 93-100.
23. Hajjar HA, Gavish D, Breslow JL, et. al. Lipoprotein (a) modulation of endothelial cell surface fibronolysis and its potential role in atherisclerosis. *Nature.* 1989; 339: 303-305.
24. Miles LA. A potential basis for the thrombotic risk assaciated with lipoprotein (a). *Nature.* 1989; 339: 301-303.
25. Kılınç Ç, Yıldırımkaaya M, Gültepe M, Karaca L. Apolipoproteinler: Metabolik fonksiyonları ve klinik önemleri. *Optimal Tıp Dergisi*, 1993; s.1:41-47.
26. Scanu AM. Physiopathology of plasma lipoprotein metabolism. *Kidney Inter.* 1991; 39: 53-57.
27. Harel RJ, Kene JP. Structure and metabolism of plasma lipoproteins. Seiver CK, Beaudet AL, Sly W, Valle D. (Eds.). *The Metabolic Basis of İnherited Disease.* Mc Graw Hill. New York. 1989; 1129-1139.
28. Mahley RW, Innerarity TI, Roll SC, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: Apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984; 25: 1277-1299.
29. Cowan LD, Wilcosky T, Criqui MH, Barrent-Connor E, Suchindram CM, Wallace R, Laskarzewski P, Walden C. Demographic, behavioural, biochemical and dietary correlates of plasma triglycerides. *Lipid Research Clinics Program Prevalence Study. Arteriosclerosis.* 1985; 5: 466-480.
30. Thompson G. Plazma lipidleri ve lipoproteinleri. *Hiperlipidemi*, Londra. 1991; 3-50, 69-75.

31. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of low density lipoprotein receptors: implications for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Circulation*. 1987; 76: 504-507.
32. Asayama K, Miyao A. High density lipoprotein (HDL) and HDL cholesterol concentrations determined in serum of newborns, infants, children adolescents and adults by use of a micromethods for combined precipitation ultracentrifugation. *Clin Chem*. 1990; 36: 129-131.
33. Atger V, Malon D, Bertiere MC, Diaye F, Girard GA. Cholesterol distribution between high-density lipoprotein subfraction HDL and HDL determined in serum by discontinuous gradient gel electrophoresis. *Clin Chem*. 1991; 37: 1149-1152.
34. Rifai N, Warnick GR, Mc Namara JR, Belcher JD, Grinstead GF, Frants ID. Measurement of low density lipoprotein cholesterol in serum. *Clinic Chemistry*. 1990; 38: 150-157.
35. Kadayıfçı A, Karaaslan Y, Köroğlu E. Pratisyen Hekimin El Kitabı. Hekimler Yayın Birliği. Ankara. 1998: 1-541.
36. Türkemen F, Akkuş İ, Büyükbaş S, Çığlı A. Diyabetes Mellitusda biyokimyasal değişiklikler ve komplikasyonlar. *Türkiye Klinikleri*. 1990; 1-10.
37. Sözen T. İnsülin tedavisi. *İlaç ve Tedavi Dergisi*. 1995; 8: 17-22.
38. Walter MR, Üriü-Hare YJ, Olin LK, Oster HM, Anowatt DB, ark. Copper, Zinc, Manganase and Magnesium status and complication of DM. *Dibetes Care*. 1991; 14: 1050-1056.
39. Elmastaş M. Glikozillenmiş hemoglobin tayininde elektroforez ve immünoassay metodlarının değerlendirilmesi. Karadeniz Teknik Üniversitesi, Biyokimya Anabilim

Dalı, Yüksek lisans tezi. 1995.

40. America Diabetes Association. Complicatin of the diabetes control; and complication trial. Diabetes Care. 1993; 16: 1517-1520.

41. Covet C, Genton P, Pointel J, et al. The prevalence of rethynophaty is similar in diabetes mellitus secondary to chronic pancreatitis with or without pancreatectomy and in idiopathic diabetes mellitus. Diabetic Care. 1985; 8: 323-328.

42. Champe PC, Harvey RA. Biochemistry. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E. Biyokimya. İstanbul. Nobel Tıp Kitapları. 1997: 1-421.

43. Gedik O, Akalın S, eds. Tip II DM fizyopatolojisi. Modern Tıp Seminerleri. Güneş Kitabevi. Ankara. 1989: 36-41.

44. Kurtul N. Diabetik retinopatili hastaların lökosit membranlarındaki ve plazma fosfolipidlerdeki yağ asidi bileşiminin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi Sağ. Bil. Enst. Doktora tezi. Erzurum. 1999.

45. The expect committe on the diagnosis and clasifcation of DM. Diabetes care. 1997; 20(7): 1183-1197.

46. Dods RF. Theory, analysis and correlation. In Kaplan LA, Pesce AJ, eds. Clinical chem. Philadelphia. The CV Mosby Comp. 1989; 436-453.

47. Bogardus C, Lillioja S, Molt DM, Hollenbeck C, Reaven G. Relationship between degree of obesity and in vivo insülin action. Am J. Physiol. 1985; 248 (E): 286-291.

48. Kolterman OG, Gray RS, Griffin J, et al. Receptör and possreceptör defects contribute to the insülin resistance in NIDDM. J Clin. Invest. 1981; 68: 957-969.

49. Özmen H. Diabetli hastalarda AAS yöntemiyle serumda krom miktarı. Uludağ

Üniv. Tıp Fak. Uzmanlık tezi. Bursa.1991.

50. Guyton CA. Tıbbi Physioloji. Gökhan N, Çavuşoğlu H. Tıbbi fizyoloji. Nobel tıp kitabevi. 1989; 1333-1353.

51. Klein R, Klein BEK. Diabetic eye disease. Lancet. 1997; 350: 197-204.

52. King GL, Banskota NK. Mechanisms of diabetic microvascular complication. In Kahn CR, Weir GC eds. Joslin's DM. Inretnatio. ed: A Waverly Comp. 1994; 634-648.

53. Engerman RL, Kern TS. Experimental galactosemia produces diabetic retinopathy. Diabetes. 1984; 33: 97-100.

54. Sözen T. DM'un dejeneratif komplikasyonları. In: Gedik O, Akalın S, eds. DM modern tıp seminerleri. Güneş Kitabevi. Ankara. 1989; 93-138.

55. Umudum FZ. Diabetiklerde eritrosit aldoz redüktaz aktivitesi ve lipid peroxidasyonu. Atatürk Üniv. Sağ. Bil. Ens. Doktora tezi. Erzurum. 1993.

56. Kinoshita JH. Role of aldose redüktase in the development of diabetes. The Am J of Med. 1985; 79 (sup7A): 8-12.

57. Hattat N. Diabet retinopatisinin etyopatogenezi. Oftalmoloji. 1993; 2: 13-15.

58. Rand I. Recent advances in diabetic retinopatı. Am J Med. 1981; 70: 595-602.

59. Juvenil diabetes foundation international countdown: rethynophaty. Research prognosis report. 1988; 9: 16-18.

60. Arısoy İ. Diyabetik anjiopati ve tedavisi. In Türk diabet yıllığı. İstanbul. Nurettin Uycan Basım Sanayi. 1984: 94-111.

61. Nishimura C, Saito T, Ito T, Omori Y, Tanimato T. High levels of erythrocyte aldose redüktase and diabetic rethynopatı in NIDDM patietn. Diabetologia 1999; 37:

328-330.

62. Taysi S. Van yöresinde yaşayan diabetik hastalarda serum Cr, Ca, Mg miktarı ile bazı biyokimyasal parametrelerin araştırılması. Yüzüncü yıl Ü. Sağlık bilimleri Enst. Yüksek lisans tezi. Van. 1996.

63. Riales R, Albrink JM. Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high-density lipoprotein of adult men. The American journal of clinical nutrition. 1981; 34: 2670-2678.

64. Gallop PM, Pfluckiger R, Heneken A, Miniosahn MM, Gabbay HK. Chemical quantitation of hemoglobin glycosilation: Fluorometric detection of formaldehyde released upon periodate oxidation on glycoglobin. Anal. Biochem. 1981; 117: 427-432.

65. Agardh E, hultberg B, Agardh CD. Severe retinopathy in type I diabetic patients is not related to the level of plasma homocysteine. Scand J Clin. Lab. Invest. 2000; 60: 169-174.

66. Pavia C, Ferrer I, Vals C, et al. Total homocysteine in patients with type I diabetes. Diabetes Care. 2000; 23: 1: 84-87.

67. Hofmann MA, Kohl B, Zumbach MS, et al. Hyperhomocysteinemia and endothelial dysfunction in IDDM. Diabetes Care. 1997; 20: 12: 1880-1886.

68. Oisihi K, Nagake Y, Ymasaki H. et al. The significance of serum Hcy levels in diabetic patients on haemodialysis. Nephro. Dial. Transplant. 2000; 15: 851-855.

69. Yılmaz F, Özeydin M, Yüce G. Ateroskleroz ve aterogenez. İzmir Devlet Hastanesi Tıp Dergisi. 1994; 4: 398-405.

70. Köseoğlu MH, Fadıloğlu M. Koroner kalp hastalıklarında serum yağ asitleri dağılımı. Türk Biyokimya Derg. 2000; 25/1: 21-28.

71. Durak İ, Kaçmaz M, Çimen MYB, Büyükkoçak Ü, Öztürk HS. Blood oxidant/antioxidant status of atherosclerotic patients. J Cadiology. 2000; 27: 293-297.

72. Manns BJ, burgess ED, Hyndman ME, Parsons HG, et al. Hiperhomocysteinemia and the prevalence og atherosclerotic vasküler disease in patients with ESRD. Am J Kidney diseas. 1999; 34: 4: 669-677.
73. Delen Y. Tip II DM'a bağlı olarak gelişen mikrovaküler ve makrovasküler komplikasyonlara hiperhomosisteineminin katkısı ve homosistein metabolizmasını etkileyen faktörler. Ege Ü. Biyokimya ABD. Uzmanlık tezi. İzmir. 1999.
74. Mahley RW. Lipoprotein metabolism and molecüler biology of atherogenesis. Merc Co. Inc, Whitehause station. New York. 1993.
75. Meisenberg G, William H, Simmon S. Principles of medical biochemistry. Toronto. Mosby. 1998: 1-668.
76. Yücel D, Aydoğdu S, Çehreli S, Saydam G, Canatan H, et al. Increased oxidative stres in dilated cardiomyophatic heart fealire. Clin Chem. 1998; 44: 148-154.
77. Kukreja RC, Hess ML. The oxygen free radical system: From equations through membrane protein interaction to cardiovascüler injüry and protection. Cardiovasc Res. 1991; 62: 641-655.
78. Halliwell B, Guttridge JMC. Role of free radicals and catalitic metal ions in human disease: an overview. Methods enzymol. 1990; 186: 1-85.
79. Kong K, Lesnefsky JE, Ye J, Horwitz LD. Prevention of lipid peroxidation does not prevent oxidant-induced myocardial contractile dysfunction. Am Physiol Soc. 1991; H: 2371-2377.
80. Topuzoğlu G, Saydam G, Erbay AR, Yücel D, Kütük E. Dilate kardiomyopatili hastalarada plazma total antioksidan aktivitesi. Tr. Biokimya dergisi. 2000; 25/4: 123-130.
81. Galloway John A, Janet H, Potvin Charles R. Diabetes Mellitus, 9 th. Edition, Eli Lilly and Company, Lilly Corporate Center İndianapolis, İndiana. 1988.
82. Löke DFM, Viegas OAC, Kek LP, Rauff M, Thai AC. Lipid Profiles During and After Normal Pregnancy, Gynecol Obstet invest. 1991: 32 : 144-147.

83. Eckel RH, Albers JJ, Cheung MC, Wahl PW, Lindgren FT, Bierman EL. High density lipoprotein composition in insulin dependent diabetes mellitus, *Diabetes*, 1981; 30: 132-138.
84. Vlachokosta FV, Asmal AC, Ganda OM, Aoki TT, The effect of strict control with the artificial B-cells on plazma lipid levels in insulin dependent diabetes, *Diabetes Care*, 1983; 6: 351-355.
85. Kortlant W, Benschop C, Erkelens DW, Thijssen JH, A simple method for the measurement of total and glycated apolipoprotein B and its relevance to apolipoprotein-B metabolism in diabetes mellitus, *Clinica Chimica Acta*. Dec. 29. 1989; 186 (1) 109-118.
86. Howard BV, Abbalt WG, Egusa G, Taskinen MR. Coordination of very low density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B metabolism in humans, effects of obesity and non insülin dependent diabetes mellitus *Am. Heart J.* Feb. 1987; 113, (2pt 2), 522-526.
87. Joven J, Vtella E, Costa B, Turner PR, Richart C, Masana L. Concentrations of Lipids and Apolipoproteins in Patients with Clinically Well-Controlled Insulin Dependent and Non Insulin Dependent Diabetes, *Clin Chem*. May. 3515, 1989; 813-816.
88. Otho T, Nakomura R, Kodama M, Matsuda. Lipid and Apolipoprotein Compositions of Two species insulin-Dependent Diabetes Mellitus, *Pediatr. Res.* Jul. 28, 1990; (1). 42-45.
89. Mahley RVV, Huang Y. Apolipoprotein E: from atherosclerosis to Alzheimer's disease and beyond *Curr Opin Lipidol.* 1999; 10: 207-217.

90. Houlston RS, Snowden C, Green F. Apolipoprotein (Apo) E genotypes by polymerase chain reaction and allele-specific oligonucleotide probes *Hum Genet* 83: 1989: 364-368.
91. Price DL, Sisodia SS, Borchelt DR. Alzheimer disease when and why? *Nature Genetics*. 1998: 19: 314-316.
92. Blacker D, Tanzi RE. The Genetics of Alzheimer Disease *Arch Neurol*. 1998: 55: 294-296.
93. Strittmatter VVJ, Saunders AM, Schmechel D. Apolipoprotein E: high avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993: 90: 1977-1981.
94. Meyer MR, Tschanz JT, Norton MC. Apo E genotype predicts when - not whether - one is predisposed to develop Alzheimer disease *Nature Genetics*. 1998: 19: 321-322.
95. Mayeux R, Saunders A, Shea S. Utility of the Apolipoprotein E Genotype in the Diagnosis of Alzheimer's Disease *New Eng J of Med*. 1998: 19: 505-511.
96. Lopez O, Lopez-Pousa S, Kamboh MI. Apolipoprotein E Polymorphism in Alzheimer's Disease: A Comparative Study of Two Research Populations from Spain and the United States *Eur Neurol*. 1998: 39: 229-233.
97. Seshadri S, Drachman DA, Lippa CF. Apolipoprotein E ϵ 4 allele and the lifetime risk of Alzheimer's disease *Arch Neurol*. 1995: 52: 1074-1079.
98. Lovestone S. Early diagnosis and the clinical genetics of Alzheimer's disease, *J Neurol*. 1999: 246: 69-72.
99. Mc Connell LM, Koenig BA, Greely HT. Genetic testing and Alzheimer disease: Has the time come? *Nature Medicine*. 1998: 7: 757-759.

100. Mahley RW, Huang Y, Rall SC. Pathogenesis of type III hyperlipoproteinaemia, *Lipid Res.* 1999; 40: 1933-1949.
101. Feussner G, Feussner V, Hoffmann MM. Molecular basis of type III hyperlipoproteinaemia in Germany *Hum Mutat.* 1998; 11: 417-423.
102. Civeira F, Pocovi M, Cenarro A. ApoE variants in patients with type III hyperlipoproteinaemia *Atherosclerosis.* 1996; 127: 273-282.
103. Anne TH, Rolf S, Hans M, Peter S. Associations Of Mutations In The Apolipoprotein B Gene With Hypercholesterolemia And The Risk Of Ischemic Heart Disease *New England J of Med.* vol 338, no 22: 1577-1584.
104. Loux N, , Saint JB, Collod G, Benlian P. Identification of Haplotype Associated With ApoB-3500 Mutation in A French Hypercholesterolemic Subject: Further Support For A Unique European Ancestral Mutation. *Hum Mutat.* 1993; (2); 145-147.
105. Rauh G, Keller C, Schuster H, Wolfram G, Zollner N. Familial Defective Apolipoprotein B-100: A Common Cause Of Primary Hypercholesterolemia. *Clin. Invest.* 1992; (70); 77-84.
106. Miserez AR. Familiare Hypercholesterinämie: Zvveite WHO-Konferenz und Internationales MED-PED-Programm *Schweiz Med Forum Nr.* 2001; 29/30; 760-764.
107. Le Tensorer JM, Niffeler U. Verlag Schweizerische Gesellschaft für Urund Frühgeschichte. 1993; pp 203–241 (Deutsch).
108. Myant N, Forbes S, Day I, Dallagher J. Estimation of the age of the ancestral arginine 3500→glutamine mutation in human apoB-100. *Genomics.* 1997; 45: 78–87.
109. Innerarity TL, Mahley RW, Weisgraber KH, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein b that causes hypercholesterolemia. *J. Lipid Res.* 1990; 31: 1337-1349.

110. Sona LF, Ludwig EH, Clarke HRG, Vega GL, Grundy SM, Mc Carthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; 86: 587-591.
111. Innerarity TL, Weisgraber KH, Arnold KS, et al. Familial Defective Apolipoprotein B-100: low density lipoproteins with abnormal receptor binding. *Proc. Acad. Sci. U.S.A.* 1987; 84: 6919-6923.
112. Miserez AR, Laager R, Chiodetti N, Keller U. High prevalence of familial defective apolipoprotein B-100 in Switzerland. *J Lipid Res.* 1994; 35: 574-583.
113. Kotze MJ, Peeters AV, Langenhoven E, Wauters JG, Van Gaal LF. Phenotypic expression and frequency of familial defective apolipoprotein B-100 in Belgian hypercholesterolemics. *Atherosclerosis.* 1994; 111: 217-225.
114. Mahley RW. Atherogenic lipoproteins and coronary artery disease. *Circulation.* 1985; 72; 943-946.
115. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated path way for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986; 232: 34-47.
116. Boren J, Ekstrom U, Agren B, Nilsson-Ehle P, Innerarity TL. The molecular mechanism for the genetic disorder familial defective apolipoprotein B 100. *J Biol Chem.* 2001; 276: 9214-9218.
117. Horvath A, Ganev V. The mutation APOB-100 R3500Q in Eastern Europe. *Atherosclerosis* 2001;156:241-242
118. Innerarity T, Mahley R, Weisgraber K, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: a mutation of apolipoprotein B that causes hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 1990; 31: 1337- 1349.

119. Tybjerg-Hansen A, Gallagher J, Vincent J, Houlston R, Talmud P, Dunning A, et al. Familial defective apolipoprotein B-100: detection in the United Kingdom and Scandinavia, and clinical characteristics of ten cases. *Atherosclerosis*. 1990; 80: 235-242.
120. Schuster H, Rauh G, Kormann B, Hepp T, Humphries S, Keller C, et al. Familial defective apolipoprotein B-100. Comparison with familial hypercholesterolemia in 18 cases detected in Munich. *Arteriosclerosis*. 1990; 10: 577–581.
121. Amira SS, Rose TD, Zaher KO, Rabab NAK, Ghazi SZ, Rami ARM. ApoB-100 R3500Q mutation in the Lebanese population: Prevalence and historical review of the literature. *Mol Biol Rep*. 34. 2007; 267–270.