



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASİT FOSFATAZ GEN POLİMORFİZMLERİ İLE METABOLİK
SENDROM ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

FİLİZ ÖZDEMİR
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. AYŞE ÖZER

İSTANBUL-2007

I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda yardım eden, desteğini üzerimden eksik etmeyen, sorunlarla karşılaştığımda en iyi yolu gösterdiğine inandığım, hayatım boyunca örnek aldığım ve alacağım değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Ayşe Özer'e,

Eğitimim boyunca katkı ve desteklerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu'na,
Tezimin hazırlanmasında ve sonuçlanmasındaki destek ve yardımlarından ötürü Sayın Dr. Mustafa Akkiprik ve Sayın Dr. Cenk Aral'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardımlarını ve sıcak dostluklarını her zaman hissettiğim Fatih Eren (M.Sc.) ve Dr. Rıfat Bircan'a,

Tez çalışması süresince katkı ve yardımlarından ötürü Sayın Prof.Kd.Alb.Dr.Metin Özata ve Sayın Uzm.Dr.Sinan Çağlayan'a

Eğitimim boyunca beni destekleyen ve her zaman yanımda olan eşim ve aileme

sonsuz teşekkür ederim.

II. İÇİNDEKİLER

I. Teşekkür	I
II. İçindekiler	II
III. Kısaltma ve simgeler	IV
1. Özet	1
2. Summary	2
3. Giriş ve Amaç	3
4. Genel Bilgiler	5
4.1. Metabolik Sendrom Tanımı	5
4.2. Metabolik Sendromun Patogenezi	6
4.2.1. İnsülin Direnci	8
4.2.2. İnsülin Direnci ve Viseral Obezite	8
4.2.3. İnsülin Direnci ve Aterojenik Dislipidemi	8
4.2.4. İnsülin Direnci ve Diabetes Mellitus	8
4.2.5. İnsülin Direnci ve Hipertansiyon	9
4.2.6. İnsülin Direnci ve Hiperkoagulabilite	9
4.3. Metabolik Sendrom Sıklığı	9
4.4. Metabolik Sendrom Tanı Kriterleri	10
4.4.1. Yetişkin Tedavi Paneli III (ATPIII) Tanı Kriteri	10
4.4.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) Metabolik Sendrom Tanı Kriteri	11
4.4.3. Amerikan Yetişkin Kolesterol Eğitim Paneli (AACE)	
Metabolik Sendrom Tanı Kriteri	12
4.4.4. Türkiye Endokrinoloji Metabolizma Derneği	
Metabolik Sendrom Tanı Kriteri	14
4.5. Asit Fosfataz Lokus 1 (ACP1) Tanımı ve Lokalizasyonu	14

4.5.1. ACP1 İzofomları	15
4.5.2. ACP1 Allelleri	16
4.5.3. ACP1 Fonksiyonları	17
4.5.4. ACP1 Genotipleme	18
5. Gereç ve Yöntem	19
5.1. Kullanılan aletler	19
5.2. Kimyasal maddeler	20
5.3. Kullanılan Çözeltiler	20
5.4. Kullanılan Primerler	22
5.5. Kullanılan Enzimler	22
5.6. Hasta Grubu ve DNA İzolasyonu	22
5.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	23
5.8. Agaroz Jel Elektroforezi	24
5.9. RFLP (Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi)	25
5.9.1. Ekson 6 Bölgesine Ait PCR Ürününün Taq I Enzimi ile Kesimi	25
5.9.2. Ekson 3 Bölgesine Ait PCR Ürününün HhaI Enzimi ile Kesimi	26
5.10. İstatistiksel Analiz	27
6. Bulgular	28
6.1. DNA İzolasyon Sonuçları	28
6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları	28
6.2.1. Ekson 6 Bölgesinin PZR İle Çoğaltılması	28
6.2.2. Ekson 3 Bölgesinin PZR İle Çoğaltılması	28
6.3. RFLP Sonuçları	29
6.3.1. Ekson 3 Bölgesinin HhaI Enzimi İle Kesimi	29
6.3.2. Ekson 6 Bölgesinin TaqI Enzimi İle Kesimi	30
6.4. Hastaların ve Kontrol Grubunun Genotipleme Sonuçları	31

6.5. İstatistiksel Analiz Sonuçları	44
7. Tartışma ve Sonuç	47
8. Kaynaklar	50
9. Özgeçmiş	59

III. KISALTMA VE SİMGELER

A	: Adenin
AACE	: Amerikan yetişkin tedavi eğitimi
ACP1	: Asit fosfataz lokus 1
ALBP	: Adipozit lipit bağlayıcı protein
ATP III	: Amerikan tedavi paneli III
B3P	: Band 3 protein
bç	: Baz çifti
C	: Sitozin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	: Etilendiamintetra asetik asit
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FFA	: Serbest yağ asidi
FMN	: Flavin mononükleotid
G	: Guanin
HDL	:Yüksek dansiteli lipoprotein
İR	: İnsülin reseptörü
kb	: Kilobaz
kD	: Kilodalton
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein

LMTP	: Düşük moleküler ağırlıklı tirozin fosfataz
LMPTP	: Düşük moleküler ağırlıklı protein tirozin fosfataz
MS	: Metabolik sendrom
PAI	: Plazminojen aktivatör inhibitörü
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Restriksiyon kesim uzunluk polimorfizmi
SNP	: Tek nükleotid polimorfizmi
SYA	: Serbest yağ asitleri
T	: Timin
TEKHARF	: Türk Erişkinleri Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması
VKİ	: Vücut kitle indeksi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
WHR	: Bel kalça oranı

1.ÖZET

Asit Fosfataz Gen Polimorfizmleri ile Metabolik Sendrom Arasındaki İlişki

Metabolik sendrom gelişmesinde rol alabileceği düşünülen çok sayıda genetik faktör tanımlanmıştır. Bunlar arasında asit fosfataz loküs 1 (ACP1) polimorfik varyantlarının obez bireyler arasında vücut kitle indeksi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu polimorfik varyantların farklı enzimatik aktiviteye sahip olmaları sonucunda insülin direncinin düzenlenmesinde etkili olabileceği gösterilmiştir. Tez çalışması kapsamında metabolik sendrom tanısı konmuş hastalarda ACP1 gen polimorfizmleri belirlenip normal sağlıklı popülasyon ile kıyaslaması yapılmıştır. GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Endokrinoloji servisinde takip edilen metabolik sendromlu hastalar ATP III tanı kriterine uygun olarak seçilmiştir. Elli üç MS'lu hasta ve 168 kontrol grubu çalışmaya alınmıştır. Periferik kandan DNA izolasyonunu takiben ACP1 genotiplemesi PCR-RFLP yöntemi ile yapılmıştır. Hastalardan 6'sı (% 11.3) AA alleleline, 10'u (%18.8) AB alleleline, 11'i (20.7) AC alleleline 12'si (%22.6) BC alleleline ve 14'ü (% 26.4) BB alleleline sahip bulunmuştur. Kontrol grubunda ise; AA alleli 19 (11.3), AB alleli 71 (% 42.2), AC alleli 3 (% 1.7), BC alleli 6 (% 3.5), BB alleli 69 (% 41) kişide gözlenmiştir. Düşük enzimatik aktiviteli allele sahip kişiler kontrol grubunda hasta grubundan; yüksek enzimatik aktiviteli allele sahip kişiler de hasta grubunda kontrol grubundan istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Sonuç olarak; düşük enzimatik aktiviteli allele sahip bireylerde insülin reseptörüne olan düşük baskılamadan dolayı insüline karşı tolerans gelişir ve metabolik sendromdan korunabilir; yüksek enzimatik aktiviteli allele sahip bireylerde de insülin reseptörüne olan güçlü baskılamadan ötürü insüline karşı direnç gelişip metabolik sendroma yatkınlık oluşturabilir diyebiliriz.

Anahtar kelimeler: Metabolik Sendrom, Asit Fosfataz Lokus 1 (ACP1), Düşük Moleküler Ağırlıklı Protein Tirozin Fosfataz (LMPTP), İnsülin Direnci, Obezite

2.SUMMARY

Association of the Acid Phosphatase Gene Polymorphisms with Metabolic Syndrome.

There are many genetic factors have been reported to be associated with playing roles for developing metabolic syndrome. The link between obesity and ACP1 polymorphic variant locus associated with the body mass index have been determined; Therefore, this polymorphic variants have own different enzymatic activity so that they play an important role in regulation of insulin resistance. In this study, patients were defined metabolic syndrome which ACP1 gene polymorphic identified with cross section study with the normal population. The patients were selected by ATPIII diagnosis criteria in GATA Haydarpaşa Education Hospital Endocrinology Unit. Fifty three patients with metabolic syndrome and 168 control subjects included by this study. After DNA isolated via peripheral blood, ACP1 phenotyping has been studied by PCR-RFLP. Six of the patients (%11.3) have been identified AA allele, 10 of the patients (%18.8) AB, 11 of the patients (%20.7) AC, 12 of the patients (%22.6) BC, 14 of the patients (%26.4) BB allele. In the control groups as well; 19 of the control group (%11.3) have been reported AA, 71 of the control group (%42.2) AB, 3 of the control group (%1.7) AC, 6 of the control group (%3.5) BC, 69 of the control group (%41) BB allele. Subjects of the control group who have low enzymatic activity allele have been reported more than the patients group. Cases with metabolic syndrome who have high enzymatic activity allele have been found more than the control group. In conclusion, the subject which low enzymatic alleles have insulin tolerance by the low down regulation to the insulin receptor and they protected from metabolic syndrome. High enzymatic activity alleles have high down regulation to the insulin and then insulin resistance develops and finally this situation causes a tendency to metabolic syndrome.

Key words: Metabolic Syndrome, Acid Phosphatase Locus 1 (ACP1), Low Molecular Weight PTPase (LMWPTPase), İnsulin Resistance, Obesity

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Metabolik sendrom, insülin direnci ile başlayan abdominal obezite, glukoz intoleransı veya diabetes mellitus, dislipidemi, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı gibi sistemik hastalıkların birbirine eklendiği, yaygın mortalite ve morbidite nedeni olan bir endokrinopatidir. Yaygınlığı batı toplumlarında 20-29 yaş grubunda % 6-7 dolayında iken, 60-69 yaş grubunda % 43-44 düzeyine yükselmektedir (1). Yetişkin tedavi paneli III'e (ATP III) göre metabolik sendrom görülme sıklığı ülkemizde 31 yaşın üzerinde erkeklerde % 30, kadınlarda %40 civarında olduğu belirtilmiştir (2). Metabolik sendromda esas defektin büyük olasılıkla kasta insülin aracılı glukoz tüketimine olan rezistans olduğu düşünülmektedir. İnsüline direnç kas dokusu, karaciğer ve yağ dokusunda olmaktadır (3).

Asit fosfataz lokus 1 (ACP1) gen ürünü, insülin, PDGF reseptörleri ve T-hücre reseptörlerinin sinyal iletiminde rol alan, yüksek polimorfik yapı gösteren ayrıca insülin sinyal iletiminde negatif modülasyonda rol alan, düşük moleküler ağırlıklı protein tirozin fosfataz enziminin fonksiyonlarını (LMTP) düzenlemektedir (4). Yapılan araştırmalar, ACP1'in polimorfik varyantlarının diyabet hastalığının klinikte ortaya çıkmasında önemli rol oynayabileceğini göstermektedir. Çalışmalar, özellikle insülin-reseptör fosfotirozin yolağının düzenlenmesinde enzimin rolü üzerine yoğunlaşmıştır (5). Asit fosfatazin (ACP1) ACP1 A alleli, diğer ACP1 allellerinden daha düşük enzimatik aktiviteye sahiptir ve embriyonun uterus içindeki yaşamı boyunca vücut büyümesi ile ilişkili bulunmuştur. ACP1 A alleli aşırı vücut kitle dağılımı ile ilişkilendirilmiştir. ACP1 allel dağılımları obez ve obez olmayan bireylerde farklı olarak gözlenmezken, obez bireyler arasında obezitenin derecesini etkilediği belirtilmiştir (6). Obez ve çok obez kadınlarda ACP1 genotipleri, total kolesterol ve trigliserit düzeyleri ile anlamlı olarak ilişkilendirilmiştir. ACP1 A taşıyıcılığının hipertrigliseridemiye karşı etkili olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmalar ACP1 A taşıyıcılığının metabolik sendrom gelişimine karşı etkili olabileceğine işaret etmektedir. Lucarini ve ark. tarafından İtalyan popülasyonda sadece kan lipitleri normal olan Tip 2 diyabetiklerde vücut kitle indeksi (VKİ) ve ACP1 A alleli arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Araştırmacılar, A alleli bulunmayan bireylerde VKİ 29 kg/m'den fazla iken, trigliserit oranlarının çok yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (7).

Metabolik sendrom gelişmesinde rol alabileceği düşünülen çok sayıda genetik faktör tanımlanmıştır. Bunlar arasında asit fosfataz loküs 1 (ACP1) polimorfik varyantlarının obez bireyler arasında vücut kitle indeksi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu polimorfik varyantların farklı enzimatik aktiviteye sahip olmaları sonucunda insülin direncinin düzenlenmesinde etkili olabileceğinin gösterilmesi önemlidir.

Bu çalışmanın amacı Türk toplumunda ACP1 gen polimorfizmlerinin dağılımının belirlenmesi ve metabolik sendrom ile ilişkisinin saptanmasıdır. Tez çalışması kapsamında metabolik sendrom tanısı konmuş hastalarda ACP1 gen polimorfizmleri belirlenerek normal sağlıklı bireylerle kıyaslanması hedeflenmiştir. Bu amaçla periferik kandan DNA izolasyonunu takiben PZR-RFLP yöntemi ile ACP1 genotiplemesi yapılarak metabolik sendromla ilişkisi araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. METABOLİK SENDROMUN TANIMI

Metabolik sendrom (MS) günümüzde gittikçe daha fazla önem kazanan ve üstünde en çok araştırmanın yapıldığı konulardan biridir. Metabolik sendrom multiple bir kardiyovasküler risk faktörüdür, sendromun hem kendisi hem de tek başlarına öğelerinin herbirisi kardiyovasküler komplikasyonlar için artmış riske işaret etmektedir (8). Reaven ve ark. tarafından 1988 yılında sendrom X adıyla tanımlanan (9) ayrıca insülin rezistans sendromu adı ile de anılan metabolik sendrom abdominal obezite, yüksek trigliserid düzeyleri, aterojenik dislipidemi (düşük HDL), yüksek kan basıncı, yüksek kan şekeri değerleri ve /veya insülin direnci ile kendini gösterir. Metabolik sendrom aynı zamanda protrombotik ve proinflamatuvar bir durum sergilemektedir.

Çok etkenli bir patogeneze sahip MS'un altında yatan başlıca iki etken abdominal obezite ile insülin direncidir; yaşlanma, fiziksel inaktivite, genetik unsurlar gibi tetikleyici faktörlerin varlığında belirlenebilmektedir. Bu nedenle metabolik sendromun yüksek prevalansı obezitenin tüm dünyadaki endişe verici bir hızla artan prevalansı ile sıkı şekilde ilişkilidir (10-16). Aynı durum Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) de tüm etnik gruplarda özellikle erişkinler, yaşlılar, beyaz erkekler, zenci ve hispanik kadınlarda izlenmektedir (17-23).

Sendromun ayırt edici özelliği olan abdominal adipozitenin kalıtsal kökeninde, bugün, 11b-hidroksisteroid dehidrogenaz tip 1 (11b-HSD-1) enziminin ve glikokortikoid reseptörünün (GcR) belirleyici rolü üzerinde fikir birliğine varılmıştır. Bu enzim ve reseptörü omental yağ hücrelerinde trigliseridlerin birikimini ve omental bölgede adeta bir Cushing hastalığının gelişimini sağlamakta (24,25) ve bu bölgede biriken yağ dokusu, salgıladığı substrat [serbest yağ asitleri (FFA) ve gliserol] (26,27) ve hormonlarla (28) metabolik sendromun komponentlerini oluşturmaktadır. Serbestleşen gliserol glikoneogenez sürecinde substrat olarak kullanılırken, gerekli enerji oksidasyona uğrayan FFA'lar tarafından sağlanır; metabolik sendromda karaciğer glikoz üretiminin artması ve sürekli hiperglisemi büyük ölçüde bu mekanizmalarla gelişmektedir (26,27). Endokrin bir organ gibi çalışan yağ dokusu ise, yağ hücresi ve makrofajlarda ekspresse edilen bazıları

parakrin, bazıları endokrin etki gösteren proteinlerle [parakrin etkililer: *11b-hidroksisteroid dehidrogenaz tip 1 (11b-HSD-1)*, *glikokortikoid reseptörü (GcR)*, *perilipin'ler (PLINs)*, *akuagliseroplin'ler (AQP)*, *“fatty acid transport proteins” (FATPs)*, *“fatty acid binding protein-2” (FABP-2)*; endokrin etkililer: *“Fasting-induced adipose factor” (FIAF)*, *tümör nekroz faktörü-a (TNF-a)*, *interlökin-6 (IL-6)*, *resistin*, *leptin*, *adiponektin*, *anjyotensinojen*, *addusin-a*, *plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1)*, v.b.,] metabolik sendrom gelişme sürecine katkıda bulunmaktadır (30-32).

Metabolik sendrom ilk tanımlandığından bu yana değişik şekillerde adlandırılmıştır. Athero-trombojenik sendrom, Beer-belly sendrom (Bira göbeği sendromu), Kardiyovasküler metabolik sendrom, Kısmi kardiyovasküler risk faktör sendromu, Ölümcül dördü, Dismetabolik sendrom, İnsülin direnci sendromu, İnsülin direnci dislipidemi sendromu, Metabolik kardiyovasküler sendrom, Metabolik sendrom, Metabolik sendrom X, Plurimetabolik sendrom, Reaven's sendromu, Sendrom X (33).

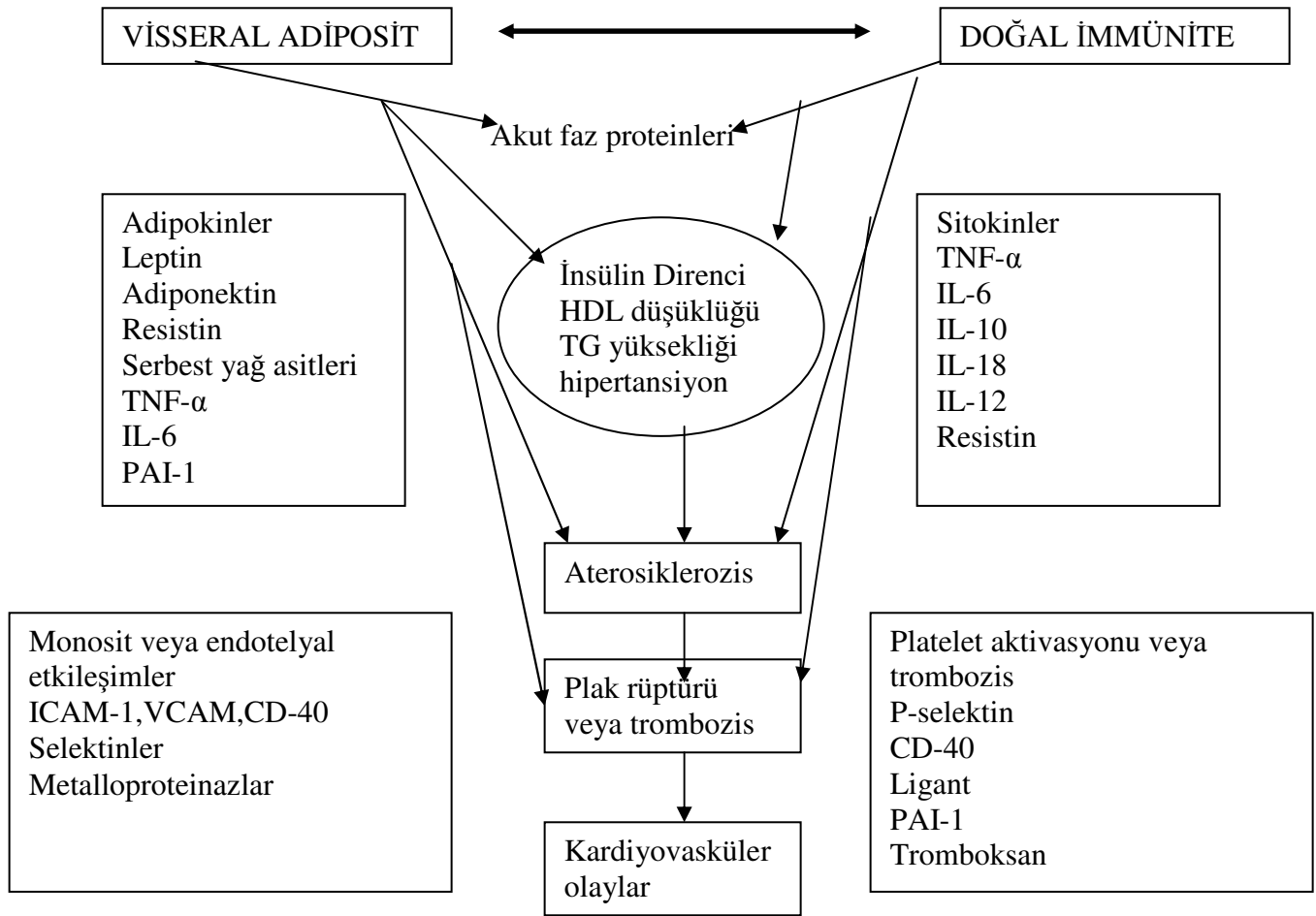
4.2. METABOLİK SENDROMUN PATOGENEZİ:

Metabolik sendrom patogeneğinde, genetik faktörler, insülin direnci, obezite, hipertansiyon, dislipidemi, vasküler anormallikler, inflamasyon, hiperandrojenizm, ürik asit ve vitamin D azlığı rol oynamaktadır (33).

Metabolik sendromun ana patofizyolojik özellikleri;

- İnsülin direnci,
- Düşük HDL, Trigliserid ve LDL'de artış ile kendini gösteren aterojenik dislipidemi.
- İnsülin direnci olan bireylerde sık gözlenen hipertansiyon,
- Akut faz reaktanlarının (c-reaktif protein-CRP gibi) yüksekliği ile seyreden proinflamatuvar durum,
- Plazminojen Aktivatör İnhibitörünün (PAI-1) ve fibrinojenin yüksekliğinin görüldüğü protrombotik durum olarak özetlenebilir (34-37).

Metabolik sendromun etyolojisi obezite ve yağ dokusu bozuklukları, insülin direnci ve bağımsız faktörler (vasküler, hepatik ve immünolojik kökenli moleküller gibi) olarak üç kategoride incelenebilir (38). Metabolik sendromu oluşturan hastalıkların (dislipidemi, hiperglisemi, hipertansiyon, obezite) hepsinin temelinde insülin direncinin rolü bulunmaktadır. Bu hastalıklar ve insülin direnci endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz sürecini hızlandırarak klinikte koroner arter hastalığı, inme ve periferik damar hastalığı gibi yüksek mortalite ile seyreden tablolara neden olmaktadır (39).



ŞEKİL- 4.1. Metabolik sendromun fizyopatogenezi.

4.2.1. İnsülin Direnci: Metabolik sendromun temelindeki esas patolojik olay olan insülin direnci (40), hücre ve dokularda, karaciğerde endojen ve eksojen insülinin normal düzeylerine beklenenden daha az yanıt olması hali olarak tanımlanmaktadır (38).

4.2.2. İnsülin Direnci ve Viseral Obezite: Metabolik sendromun gelişiminde viseral obezite merkezi bir rol oynamaktadır. Viseral obezite; kan basıncı, açlık kan glukozu ve insülin değerleri ile pozitif, HDL kolesterol düzeyleri ile negatif ilişki göstermektedir (41). Serbest yağ asitleri (SYA) düzeyleri ile insülin direncinin doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (42). Metabolik sendromun tanı kriterlerinden biri olan obezite bugünkü görüşlerle, çevresel faktörlerinden ziyade genetik olarak belirlenmektedir.

4.2.3. İnsülin Direnci ve Aterojenik Dislipidemi: Dislipidemi, şeker hastalığı ve hipertansiyon oluşumunu destekleyen önemli bir faktördür. İlerlemiş ateroskleroz durumunda, dislipidemi ile beraber trombosit agregasyonu ve endotel disfonksiyonu artmakta böylece aterosklerotik vasküler hastalık riski yükselmektedir. Hiperlipidemi, obezite ve insülin direnci arasında belirgin bir ilişki bulunmuştur. İnsülin direncinin en belirgin sebebi abdominal obezitedir. Burada da esas etken subkutan yerleşimden ziyade viseral yerleşimli yağlanmadır. Bu yağ çoğunlukla trigliseridlerden oluşmaktadır. Üç yağ asidinin bir gliserol molekülü ile birleşmesinden oluşan trigliserid yağ dokusunda birikmekte, enerji gereksinimi ile paralel olarak yeniden yağ asitlerine ayrılarak dokuların bu ihtiyacını karşılamaktadır. Şişman kişilerde daha fazla yağ asidi salgılanmakta, dokulardaki yağlanma daha fazla olmaktadır. Böylece dokulardaki, özellikle de kaslarda ve karaciğerdeki fazla yağ miktarı insülin direncini artırmaktadır (43).

4.2.4. İnsülin Direnci ve Diabetes Mellitus: Günümüzde metabolik sendromda özellikle diyabet mevcutsa, koroner arter hastalığına eşit mortalite riski taşıdığı kabul edilmektedir (44). Ülkemizde metabolik sendromun en sık rastlanan şekli hipertansiyon ve HDL düşüklüğüdür (45).

4.2.5. İnsülin Direnci ve Hipertansiyon: Hiperinsülinemi sempatik sinir sistemi aktivitesini artırarak, vasküler cevabı vazokonstriksiyon yönüne kaydırarak ve sodyum tutulumuna yol açarak kan basıncı yüksekliğine neden olmaktadır. İnsülin ve IGF-1 (İnsülin Like Growth Factor-1) damardaki düz kas hücrelerinin poliferasyonuna yol açtığından, damar duvarları kalınlaşıp bu riskin daha da yükselmesine sebep olmaktadır. Damar lümeninde daralmalar perifer damar direncini artırmakta ve hipertansiyon ortaya çıkmaktadır (46).

4.2.6. İnsülin Direnci ve Hiperkoagulabilite: İnsülin direnci olan hastalarda arteriyel trombozis ve inflamasyonu uyaran koagülasyon faktörlerinde değişiklikler meydana gelmektedir (47). Yaygın olarak endotel hücrelerinin aktivasyonu, LDL oksidasyonu uyarımı, faktör VII, IX ve X, protrombin ve plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) düzeylerinde artma metabolik sendromdaki protrombotik durumun nedenlerinden başlıcalarıdır (48).

4.3. METABOLİK SENDROM SIKLIĞI

Metabolik sendrom ABD’de ortalama olarak popülasyonun %24’nü etkilemektedir. Üçüncü uluslar arası sağlık ve beslenme sorgu incelemesi (NHANES III) kriterlerine göre ABD’de 47 milyon bireyde metabolik sendrom mevcuttur (49) ve bu kişilerin %44’ü de 50 ve üstü yaş grubundadır (50). Metabolik sendroma normal glukoz toleransı olan erkeklerin %15’inde, kadınların %10’nunda, bozulmuş açlık toleransı olan erkeklerin %64’ü ve kadınların %42’sinde ve tip 2 diabeti olan erkeklerin %84’ü, kadınların da %78’inde rastlanılmaktadır (51). 1988-1994 yılları arasında obeziteye bağlı rahatsızlıklar nedeni ile yapılan doktor ziyaretleri ABD’de %90 oranında artmıştır (52). Güney ve güneydoğu Asya halkları, Afrika asıllı Amerikalılar, Meksikalılar ve yerli Amerikalılar gibi bazı etnik gruplarda prevalansın daha da yüksek saptanması bu prevalans yüksekliğinde genetik bazı faktörlerin de rol oynadığını düşündürmektedir (53).

Ülkemizde MS sıklığı ve akıbetiyle ilgili ilk araştırma TEKHARF (Türk Erişkinleri Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması) çalışmasının 1997/98 taraması esas alınarak ve ATPIII kriterleri uygulanarak gerçekleştirilmiştir (54). Bu çalışmada özellikle erkeklerde abdominal obeziteye ilişkin 102 cm'lik kriterin Türk erkeklerinin önemli bir bölümünü kapsamayarak risk altında değilmiş gibi göstermesi sonucu, yeni kriter (95 cm'lik bel çevresi) geliştirilerek araştırmalarda kullanılmıştır (55,56). Daha sonra kadınlarda da (91 cm'lik bel çevresi ile <45 mg/dl'lik yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)-kolesterol düşüklüğü) yeni kriterlerin halkımızda daha uygun olabileceği düşünülmüştür (57).

Metabolik sendrom prevalansı erişkinlerde ortalama %22 olarak bilinmektedir. Prevalans yaş ile artmakta, 20-29 yaş grubunda %6.7, 60-69 yaş grubunda ise %43.5 oranında görülmektedir. Türk Erişkinleri Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması (TEKHARF) çalışmasına göre, 2000 yılı itibariyle Türkiye genelinde 30 yaş ve üzerindeki 9.2 milyon kişide metabolik sendrom mevcuttur ve Koroner Arter Hastalığı gelişen bireylerin %53'ü aynı zamanda metabolik sendrom hastasıdır. Türk toplumunda metabolik sendrom görülme sıklığı, erkeklerde 40-49 yaş grubunda %44, kadınlarda ise 60-69 yaş grubunda %56 gibi oldukça yüksek değerlere ulaşır (58).

4.4. METABOLİK SENDROMUN TANI KRİTERLERİ :

Uluslar arası Kalp, Akciğer, Kan Enstitüsü güncel metabolik sendrom tanımı ile ilgili raporunda Yetişkin Tedavi Paneli III (ATP III), Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Klinik Endokrinolojinin Amerikan İlişkisi (AACE) tanımlarının özetini yapmaktadır (1).

4.4.1. Yetişkin Tedavi Paneli III (ATP III) Tanı Kriteri

Ulusal Kolesterol Eğitim Programı [National Cholesterol Education Program (NCEP)] Uzman Paneli, 2001 yılında yetişkinlerde yüksek kan kolesterolü tespiti, değerlendirme ve

tedavisi raporunu (ATP III) hazırlamıştır. Bu raporda, metabolik sendrom tanısı için Tablo 4.1. belirtilen beş kriterden üçünün bir arada bulunmasının yeterli olduğu bildirilmiştir (59). Abdominal obezitenin de bu tabloya alınması, sendromun patogenezindeki önemini ortaya bir kez daha koymaktadır. Özellikle genetik yatkınlığı olan gruplarda bel çevresindeki küçük bir artış dahi bir çok risk faktörünü tabloya dahil eden bir tetik görevi görebilmektedir. ATP III'e göre metabolik sendrom tanımını yapabilmek için yüksek açlık glukozunu (FBG) göstermek yeterlidir, insulin rezistansının gösterilmesi gerekli değildir (60).

Tablo 4.1. ATP III Metabolik Sendrom Tanı Kriteri (61).

Risk Faktörü	Değerler
Abdominal Obazite	
Erkek	>102 cm
Kadın	>88 cm
Trigliserid Düzeyi	≥ 150 ml/dl (≥ 1.69 mmol/l)
Düşük HDL Düzeyleri	
Erkek	<40 mg/dl (<1.04 mmol/l)
Kadın	<50 mg/dl (<1.29 mmol/l)
Artmış Kan Basıncı	Sistolik>130 mmHg veya diastolik >85 mmHg
Artmış açlık kan şekeri	>110 mg/dl (6.1 mmol/l)

4.4.2. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) MS Tanı Kriteri:

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 1998 yılında metabolik sendromu, diyabet, bozulmuş açlık glukozu, bozulmuş glukoz toleransı veya insülin direnci ile birlikte, hipertansiyon (>160/90mmHg), hiperlipidemi, santral obezite (bel çevresi) ve mikroalbuminüriden en az ikisinin birlikte görülmesi olarak tanımlanmıştır.

Metabolik sendrom tanısının yapılması için insülin direncinin gösterilmesi istendiğinden, WHO tarafından yapılmış olan kriterler farklılık gösterir. WHO ayrıca ATP III'den farklı HDL ve kan basıncı sınırları kullanmakta ve yüksek kilo (BMI > 30 kg/m) ve santral adipoziteyi (bel/kalça oranı erkekte > 0.9, kadında > 0.85) kriter olarak kabul edip, proteinüriyi de risk faktörü olarak görmektedir (61).

Tablo 4.2. Metabolik Sendrom için WHO Tanı Kriterleri

Aşağıdakilerden biri ile insülin direnci tanısı:	Aşağıdaki bulgulardan en az ikisinin insülin direncine eşlik etmesi:
Tip 2 diabetes	Antihipertansif tedavi veya kan basıncı sistolik .140 mmHg , diastolik . 90 mmHg
Bozulmuş açlık glukozu	Trigliserid . 150 mg/dl
Bozulmuş glukoz toleransı	HDL erkekte <35, kadında < 39 mg/dl
Glukoz uptake'in incelenen Popülasyonun en düşük yüzdenin altında olması	Vücut Kitle İndeksi (BKİ) > 30 kg/m veya bel-kalça oranı erkekte > 0.9, kadında > 0.85
	Üriner albumin atılımı . 20 mcg/dk veya albumin/kreatinin oranı. 30 mg/g

4.4.3. Amerikan Yetişkin Kolesterol Eğitim Paneli (AACE) MS Tanı Kriteri:

Daha çok ATP III ve WHO kriterlerinin kombinasyonu şeklinde olan bu değerlendirme, metabolik sendrom tanısı için gerekli kriterlerin sayısını vermeyip klinisyenin yorumuna bırakmaktadır (62).

Tablo 4.3. İnsülin Rezistansı Sendromu için AACE Tanı Kriterleri

Risk Faktörü	Değerler
Fazla kilo / obezite	BMI . 25 kg/m ²
Trigliserid	150 mg/dl
Düşük HDL	
Erkek	< 40 mg/dl
Kadın	< 50 mg/dl
Kan basıncı	≥130/85 mmHg
Diğer risk faktörleri	Ailede Tip 2 diabetes, hipertansiyon, kardiovasküler hastalık öyküsü
	Polikistik over sendromu
	Sedanter hayat tarzı
	İleri yaş
	Tip 2 diabetes veya kardiovasküler hastalık için yüksek riskli etnik gruba dahil olmak

Son olarak 2005 yılının Nisan ayında *Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)* tarafından Berlin’de düzenlenen “1. *Uluslararası Metabolik Sendrom Kongresinde*”, Metabolik Sendrom tanı kriterlerine son şekli verilmiştir (63).

Buna göre; bel çevresinin erkeklerde 94 cm, kadınlarda 80 cm’den fazla bulunmasına ek olarak aşağıda belirtilen 4 faktörden ikisinin varlığı tanı koymak için yeterli kabul edilmektedir.

1. Trigliserid düzeyinin 150 mg/dl’den fazla oluşu veya bunu sağlamak için bir ilaç kullanılıyor olması,
2. HDL-Kolesterol düzeyinin erkeklerde < 40 mg/dL, kadınlarda < 50 mg/dL oluşu veya bunu sağlamak için bir ilaç kullanılıyor olması,

3. Büyük tansiyonun 130 mmHg veya küçük tansiyonun 80 mmHg düzeyine eşit veya üzerinde olmaları veya daha önce hipertansiyon tanısı konulup ilaç kullanılıyor olması,
4. Açlık kan şekerinin 100 mg/dl üzerinde bulunması veya daha önce tip 2 diyabet tanısı konulmuş olması.

Yeni tanı kriterlerinde en çarpıcı değişiklik bel çevresi için daha önce erkeklerde belirtilen 102, kadınlarda 88 cm rakamlarının değişmesidir.

4.4.4. Türkiye Endokrinoloji Metabolizma Derneği MS Tanı Kriteri

Tablo 4.4. Metabolik sendrom çalışma grubunun önerdiği metabolik sendrom tanı kriterleri (33).

Aşağıdakilerden en az biri	Aşağıdakilerden en az ikisi
İnsülin direnci	Hipertansiyon(> 130 / 85) Antihipertansif ilaç kullanıyor olmak
Bozulmuş glukoz toleransı	Dislipidemi(trigliserit düzeyi > 150 mg /dl veya HDL düzeyi erkekte < 40 mg/dl, kadında < 50 mg/dl)
Aşikar Şeker Hastalığı	Abdominal obezite(VKİ > 30 kg / m ² veya bel çevresi :erkeklerde >102 cm , kadınlarda > 88 cm)
	Mikroalbüminüri (idrar albümin atılımı >20 mcg/dakika veya albümin / kreatinin oranı >30 mg/g)

4.5. ASİT FOSFATAZ LOKUS 1 (ACP1) TANIMI VE LOKALİZASYONU

Asit fosfataz lokus 1 (ACP1) geni yüksek polimorfik düşük moleküler ağırlıklı protein tirozin fosfatazı (LMPTP) kodlamaktadır. Bu enzim insülin sinyal iletiminde negatif düzenlemede rol oynamakta ve insülin reseptörünün fosforillenmiş tirozin

bölgesini defosforile ederek insülini baskılamaktadır (64,65). İnsan dokularında ACP1 gen ürününün her zaman bulunan 2 izoformu mevcuttur. Bu izoformlar ACP1-F ve ACP1-S olarak isimlendirilir. Ayrıca LMPTP-A ve LMPTP-B olarak da adlandırılabilir (66). Aynı lokus adiposit LMPTP kodlar. Adiposit asit fosfataz olarak da bilinir. Adiposit lipid binding proteinin (ALBP) fosforile olmuş tirozinini invitro olarak defosforile edebilmektedir (67).

Hopkinson ve ark. ilk olarak protein düzeyinde ACP1 polimorfizmini tanımlamışlardır. ACP1 yüksek polimorfik yapı gösteren bir gendir. Caucasian popülasyonda ACP1 A, B ve C olarak isimlendirilen 3 yaygın kodominant allelin kombinasyonundan oluşan 6 farklı genotipi gözlenmiştir. Bu genotipler; A/A, A/B, B/B, A/C, B/C, ve C/C olup total enzimatik aktivite ve iki izoformun konsantrasyonları arasındaki oranda güçlü varyasyonlar gösterirler (66).

Yedi ekzon ve 6 introndan oluşan ve LMPTP kodlayan ACP1 geni, 2. kromozomun kısa kolunun 2. bölgesinin 5. bandında (2p25) yer almaktadır (68).

4.5.1. ACP1 İzoformları:

ACP1 lokusundaki her bir allel hızlı (F) ve yavaş (S) olarak 2 izoform kodlar (70). F ve S izoformları arasında enzimatik ve moleküler özelliklerin her ikisinde anlamlı farklar gösterilmiştir. F ve S izoformlar hücrelerde farklı biyolojik fonksiyonlara hizmet edebilmektedir. S izoform konsantrasyonu C allel taşıyan genotiplerde diğer genotiplerden daha yüksek bulunmuştur (71). İzoformlar arasındaki oran (F/S) A allelinde 2:1, B alelinde 4:1, C allelinde 1:4 olarak gösterilmiştir. Her iki izoform 157 aminoasit içeren ve 18 kilodalton molekül ağırlığından meydana gelen küçük enzimdir. İki izoformun *in vitro*da substart tercihi, kinetiği ve allosterik özellikleri farklılık göstermektedir. ACP1 genotipi ilişkisinde S ve F izoform konsantrasyonları Tablo 4.6. da gösterilmektedir (70, 72).

Tablo 4.6. ACP1 genotipi ilişkisinde S ve F izoform konsantrasyonları

ALLEL	F İzoform konsantrasyonu	ALLEL	S Izoform konsantrasyonu
B/B	16.4	C/C	20.6
A/B	12.0	A/C	12.7
B/C	11.3	B/C	12.1
A/A	7.9	B/B	3.9
A/C	7.5	A/B	3.4
C/C	5.7	A/A	3.3

Not : Kırmızı hücrelerin 1 mililitresinde verilen enzim miktarı gösterilmiştir.

4.5.2. ACP1 Allelleri:

Spencer ve ark. enzimatik aktivitedeki allelik katkıyı yada sırayı şu şekilde tanımlamışlardır; **ACP1A<ACP1B<ACP1C** (72).

Tablo 4.7. ACP1 allellerindeki enzimatik aktivite sırası

ALLEL	ENZİMATİK AKTİVİTE
ACP1A/A	122.4
ACP1A/B	153.9
ACP1B/B	188.3
ACP1A/C	183.8
ACP1B/C	212.3
ACP1C/C	Çok nadir

Alleller enzimatik aktivite açısından; düşük, orta ve yüksek enzimatik aktiviteli olarak 3 gruba ayrılmıştır.

Tablo 4.8. Enzimatik aktivite açısından allel grupları

ENZİMATİK AKTİVİTE GRUBU	ALLEL
Düşük enzimatik aktiviteliler	A/A, A/B
Orta enzimatik aktiviteliler	B/B, A/C
Yüksek enzimatik aktiviteliler	B/C, C/C

4.5.3. ACP1 Fonksiyonları:

Deneysel kanıtlar temelinde ACP1'in 2 önemli fonksiyona sahip olduğu önerilmiştir.

- 1) Flavın fosfataz aktivitesi
- 2) Tirozin fosfataz aktivitesi

1) Flavın fosfataz aktivitesi; ACP1 Flavın mononükleotidin riboflavine dönüşümünü kataliz etmektedir. Flavın adenin dinükleotidin (FAD) hücresel konsantrasyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

2) Tirozin fosfataz aktivitesi; Fosfotirozin fosfataz olarak bu enzim; hücre büyümesinin düzenlenmesini ve reseptör aktivitesini kontrol ederek, glikolitik oranın düzenlenmesinde etkili olmaktadır. *In vitro* olarak ACP1 İnsan İnsülin Reseptörü (İR) ve Band 3 proteinin (B3P) fosfotirozin içeren sentetik peptidlerini hidroliz edebilmektedir. Yüksek ACP1 aktivitesi insülin hareketini baskılayarak yüksek glisemik düzeye yol açabilmektedir.

B3P fosforilasyonu; aldolaz, fosfofruktokinaz ve gliseraldehid 3 fosfat dehidrojenazın aktivasyonu ile glikolitik oranı artırmaktadır. ACP1 B3P defosforile ederek glikolitik enzim aktivitesini azaltıp glikolizi inhibe etmektedir. Bu nedenle; yüksek ACP 1 aktivitesi glikolitik enzimlerin azalmış aktivitesiyle yüksek glisemik düzeye yol açabilmektedir (73-76). İntrasellüler kinazlar fosforillenmiş kritik hedef proteinlerle yüzey reseptörlerinden sinyale aracılık etmektedir. Oysa ki fosfatazlar bu fonksiyonu inhibe etmektedir.

Tablo 4.9. ACP1 Fonksiyonları

Fosfotirozin fosfataz olarak fonksiyonu	Düşük enzimatik aktivitenin mümkün etkisi
1) ZAP 70 in negatif regülatör bölgesindeki tirozinin defosforilasyonu	T hücre düzenlenmesini yapabilir.
2) İnsülin reseptörünün defosforilasyonu	Adipositlerde insülinin etkisini artırır.
3) Adiposit Lipit Bağlayıcı Proteinin(ALBP) defosforilasyonu	Adipositlerde lipit depolayabilir.
Flavin Mononükleotid Fosfataz (FMN)olarak Fonksiyonu	
1) FMN defosforilasyonu	FMN konsantrasyonunu ve flavoenzim aktivitesini artırır.

4.5.4. ACP1 Genotipleme

Hopkinson ve ark. 1963’de kırmızı hücre hemolizatında nişasta jel elektroforeziyle ACP1 A, B, C olarak bilinen 3 baskın alleli tanımlamışlardır (66). Üç ACP1 alleli 3 spesifik bölgede tek baz değişimi göstermektedir. A ve B allelleri 2 baz değişimi ile birbirinden farklıdır. Bu baz değişimlerinin birincisi; kodon 41 ekzon 4 de yer alan C-T değişimdir. İkincisi ise; kodon 105 ekzon 6 da yer alan A-G değişimdir. ACP1 C alleli A ve B allellerinden bir baz değişimi ile farklıdır. Bu değişim kodon 43 ekzon 3 bölgesinde yer alan C-T değişimidir (76). B ve C allellerinde 105. bölgede bulunan glutamin (kodon CAA) aminoasidi A allelinde arjinin aminoasidine (CGA) değişmektedir. Tek Nükleotid Değişimlerinin (SNP) diğer ikisi aminoasit değişimiyle sonuçlanmamaktadır. Fakat alternatif mRNA splicing ve sonuç olarak 2 izoform arasındaki oranda güçlü etkileri bulunmaktadır. Allellerde 2 izoform arasındaki oran (F/S) şu şekilde gösterilmektedir: 2:1 A alleli, 4:1 B alleli, 1:4 C alleli (77).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Aletler

Agaroz Jel Elektroforez Güç Kaynağı, ATTO (Japonya)
Agaroz Jel Tankı ve Düzeneği (Mini), Biometra (ABD)
Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)
Derin Dondurucu -20 °C, Philco (Türkiye)
Etüv, Heraeus (Almanya)
Hassas Terazı, Mettler AT 261 (İsviçre)
Hassas Terazı, Mettler PJ6000 (İsviçre)
Isı Döngü Cihazı, Biometra (ABD)
Kamera, Polaroid MP-4 (ABD)
Kırık Buz Makinesi, Scotsman (ABD)
Laminar Flow, Özge A.T. (Türkiye)
Laminar Flow, Heraeus (Almanya)
Manyetik Karıştırıcı, Eletro-Mag (Türkiye)
Manyetik Karıştırıcı, IKA (ABD)
Mikrosantrifüj, IEC Micro-MB (ABD)
Mikrosantrifüj, Heraeus Biofuge® B (Almanya)
Otoklav, All American (ABD)
Otomatik Mikropipetler, Gilson (Fransa)
PH Metre, WTW (Almanya)
UV Kaynağı, Vilber Lourmat (Fransa)
Jel Dokümantasyon Sistemi, Synergene Genius (İngiltere)
Spektrofotometre, Ultraspec 3300 pro Biochrom Ltd. (İngiltere)
Vorteks, Elektro-Mag (Türkiye)
Vorteks, IKA (ABD)

5.2. Kimyasal Maddeler

Agaroz, İnvitrogen (ABD)

Brom fenol mavisi, Sigma (ABD)

dNTP set, MBI Fermentas (Litvanya)

EDTA, Sigma (ABD)

Etanol, Carlo Erba (İtalya)

Etidyum bromid, Sigma (ABD)

Fenol, Sigma (ABD)

İzoamil alkol, Merck (Almanya)

Kloroform, Carlo Erba (İtalya)

Magnezyum klorür, Sigma (ABD)

Nonidet P 40, Sigma (ABD)

Sodyum klorür, Merck (ABD)

Taq DNA Polimeraz Enzim Seti, MBI Fermentas (Litvanya)

Tris, Sigma (ABD)

50 bp Step Ladder, DNA belirteç, MBI Fermentas (Litvanya)

100 bp Step Ladder, DNA belirteç, MBI Fermentas (Litvanya)

5.3. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada kullanılan kimyasal çözeltiler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

Kandan DNA İzolasyonu

Solüsyon 1 :

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

10 mM KCl

10 mM MgCl₂

Solüsyon 2 :

10 mM Tris-HCl (pH 7.6)

10 mM KCl

10 mM MgCl₂

0.5 mM NaCl

2 mM EDTA

%0.5 SDS

TE Tamponu :

10 mM Tris-HCl (pH 7.4)

1 mM EDTA (pH 8.0)

PZR**10X Reaksiyon Tampon :**

500 mM Tris-HCl (pH 8.8)

160 mM (NH₄)₂SO₄

0.1% Tween 20

1.5 mM MgCl₂

10mM dNTPs: 100 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP solüsyonlarından 10'ar µl alınarak karıştırıldı ve üzerine 60 µl steril dH₂O eklenerek hazırlandı.

AGARoz JEL ELEKTROFOREZİ**10XTBE (500 ml) :**

54gr Tris baz

27gr Borik Asit

20 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0)

Çözelti 1Lt'ye kadar dH₂O ile tamamlandı.

Yükleme Boyası :

% 0.25 Bromfenol Mavisi

%0.25 Ksilen Siyanol FF

%30 Gliserol

5.4. Kullanılan Primerler

Tablo 4.10. PZR da kullanılan primerler

Ekzon	DNA Dizisi (5'→3') ileri	DNA Dizisi (5'→3')geri
3	AGG CCA ACC TGA ACT CCT CTG	CCT GTC TTG CTT TAT GGG CT
6	TTC AGA ACA CCC TAG CAG ATG	TTG CAA AAC CTG CAT AAC AA

5.5. Kullanılan Restriksiyon Enzimleri

Hha I, MBI Fermantas (Litvanya)

Taq I , MBI Fermantas (Litvanya)

5.6. Hasta grubu ve DNA izolasyonu

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Endokrinoloji servisinde takip edilen metabolik sendromlu hastalar NCEP ATP III 2001 kriterine uygun olarak seçilmiştir. Abdominal obezitesi, glukoz intoleransi veya diabetes mellitusu olan ve kan basıncı 130/85 mmHg üzerinde olan 53 metabolik sendromlu hasta ve yaş grubu hastalar ile uyumlu 168 kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastaların ve kontrol grubunun rıza olur formu alındıktan sonra alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu ve ACP1 genotiplemesi yapılmıştır. Araştırma GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi etik kurulu tarafından onaylanmıştır.

Çalışmaya katılan bireylerden 1/100 hacimde 0.5 mmol / L sodyum EDTA içeren tüplere 3 ml kan alındı. Kandan DNA izolasyonu John ve arkadaşlarınca tanımlandığı üzere fenol-kloroform yöntemi ile izole edildi (78). Çalışma öncesi Sol II ve TE 65 °C bekletilmek üzere etüve bırakıldı. Önce kan alt-üst ederek karıştırıldı ve 15 ml'lik falkon tüpe boşaltılarak üzerine 2 katı Sol I konuldu. Üzerine 120 µ lt Nonidet P40 (igepal) ilave edilerek tüpler 2000 rpm de 10 dak. santrifüj edildi. Pellet oynatılmadan üst faz döküldü. Her hasta için 4 adet 2'lik ependorf hazırlandı. Pelletin üzerine 800 µ lt Sol II ekleyerek pipetle al-ver yaptıktan sonra temiz ependorfa aktarıldı. 400 µ lt fenol ekleyerek 12000 rpm de 1 dak. santrifüj edildi. Üst fazı temiz ependorfa alarak üzerine 200 µ lt fenol

200 µ lt kloroform izoamilalkol ilave edip tüp alt üst edildi ve 12000 rpm 1 dak. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst faz temiz ependorfa alındı. Üzerine 700 µ lt kloroform izoamilalkol ilave edilip tüp alt-üst edilerek 12000 rpm 1 dak. santrifüj edildi. Üst faz temiz ependorfa aktarılarak üzerine 2 katı kadar % 100 etanol ilave edip tüp alt – üst edildi ve 14000 rpm 10 dak. santrifüj edilerek DNA'nın çökmesi sağlandı. Etanol dökülerek ve sonra tüpler ters çevrilerek kurutma kağıdının üzerine bırakıldı. Üzerine 200 µ lt TE tampon eklenerek 65 °C de 5 dak. bekletip kısa bir santrifüj yapıldıktan sonra -20 °C'de saklandı. Elde edilen DNA'nın saflığını ve konsantrasyonunu belirlemek amacıyla 260 ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümler yapıldı.

5.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) *in vitro* koşullarda belirli bir DNA bölgesinin çoğaltılmasını sağlayan ve 1985'te geliştirilen bir metottur. Temel olarak PZR üç basamak döngü sistemi içermektedir. DNA'nın yüksek ısı ile tek iplikli hale getirilmesini takiben özel olarak hazırlanan oligonükleotid primerlerin kalıp DNA ile eşleşmesi ve DNA polimeraz tarafından sentezin gerçekleştirilmesi temel prensibini oluşturur. İlk olarak çift iplikli DNA'nın 94 °C de tek iplikli forma dönüşümü sağlanır. Ardından özel olarak hazırlanan 17-35 nükleotid uzunluğundaki primerler ile DNA üzerindeki komplementer bölgelere bağlanır. Primerleri oluşturan bazlar temel alınarak hesaplanan Tm değerine göre bağlanma ısı belirlenir. Bu işlem genelde 37-55 °C aralığında gerçekleşir. Son olarak Taq DNA polimeraz 72 °C de 5' → 3' yönünde primere uygun nükleotidleri ekler. PZR etkinliği ve doğruluğu primer, dNTP ve MgCl₂ konsantrasyonu ile reaksiyona giren DNA miktarı ile direkt ilişkilidir (79).

Bu çalışmada ACP1 geni ekzon 3 ve 6 bölgeleri Tablo 4.10. da gösterilen primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. Reaksiyonlarda kullanılan reaksiyon içeriği Tablo 4.11. de verilmiştir. Ependorf tüpleri içerisinde (0.5 ml) ve buz üzerinde hazırlanan reaksiyon karışımı 49'ar µ lt tüplere dağıtıldıktan sonra üzerine 1 µ lt örneklerin genomik DNA sı konuldu ve örnekler daha önceden programlanmış ısısal döngü cihazına yerleştirildi. Reaksiyon 2 dak. 94 °C de ön denatürasyonun ardından 94 °C de 45 saniye denatürasyon, 54 °C de 45 saniye bağlanma ve 72 °C de 45 saniye uzama olmak üzere 35 döngü

gerçekleştikten sonra 72 °C de 5 dak. final uzaması ile tamamlandı. Örnekler cihazdan çıkarıldıktan sonra kısaca yüksek devirde santrifüj edildikten sonra – 20 °C ye kaldırıldı.

Tablo 4.11. PCR ile çoğaltılan bölgeler ve özellikleri

Gen	Çoğaltılan bölge	Kullanılan primerler	Amplikon uzunluğu (bç)	Primer bağlanma ısı (°C)
ACPI	Ekzon 3	3 F ve 3 R	342 bç	56 °C
	Ekzon 6	6 F ve 6 R	300 bç	54 °C

Tablo 4.12. Reaksiyon içeriği

PCR ŞARTLARI	1 örnek için (µ lt)
10x Buffer	5
25 mM MgCl ₂	3
Primer ileri (10pm/µ lt)	1
Primer geri (10pm/µ lt)	1
25 mM dNTP	1
Taq polimeraz (5U/µ lt)	0.1
Su	37.9
DNA	1
TOPLAM	50

5.8. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA parçalarının ayrılması, tanımlanması, ve saflaştırılması için standard bir metod olarak agaroz jel elektroforezi kullanılmaktadır. Agaroz jel elektroforezi ile yaklaşık

60 - 0.1 kb uzunluğunda DNA parçaları ayrılabilir. Jeldeki DNA bantları jelin bir floresans boya olan etidyum bromür ile boyanması ve jelin mor ötesi ışık altında incelenmesi ile saptanabilir. Çoğunlukla jel elektroforezinde bilinen büyüklükteki bir belirteç DNA kullanılarak moleküler büyüklüğü bilinmeyen DNA'ların boyları kolayca saptanabilmektedir (80).

Yapılan bu çalışmada PZR ile amplifiye edilen ürünlerin doğruluğunun ve kalitesinin belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi uygulandı. Elde edilen ürünlerin boylarını tanımlayabilmek için %2' lik jel kullanıldı. Agaroz jel 1 X TBE tamponunda kaynatılarak hazırlandı. Çözeltiye DNA'nın UV ışık altında görüntülenebilmesi için 0.25 µg / ml EtBr ilave edildi. Elektroforez 90 V / 45 mA olacak şekilde uygulandı. Yaklaşık 45 dak. sonra güç kaynağı kapatıldı. Jel UV ışını altında incelendikten sonra fotoğrafı çekildi.

5.9. Restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi (RFLP)

Restriksiyon endonükleaz enzimleriyle tanımlanabilen bireyler arasında DNA dizisindeki polimorfik farklılıktır. DNA polimorfizmlerinin çoğunu tek baz çifti değişimleri oluşturur. Bunlar restriksiyon enzimi tanıma bölgesini ortadan kaldıran veya yeni bir tanıma bölgesi oluşturan değişimlerdir. Eğer 2 restriksiyon bölgesinde DNA fragmenti delesyon veya insersiyona uğramışsa restriksiyon fragmentlerinin boyları farklı olacaktır

Restriksiyon endonükleaz: Bakteriden köken alan, DNA'da özgül bir diziyi tanıyarak bu dizi içinden veya yakınından DNA'yı kesebilen enzimdir. DNA'nın bu enzimlerden bir veya bir kaç ile kesime uğradıktan sonra agaroz jel elektroforezine tabi tutulması ve sonra EtBr ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe RFLP adı verilir (81).

5.9.1. Ekson 6 bölgesine ait PCR ürününün Taq I enzimi ile kesimi

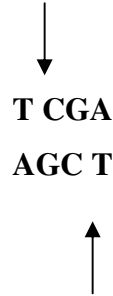
Ekson 6 bölgesine ait PCR ürünü Taq I enzim i ile 1 saat 65⁰C de kesim işlemine tabi tutuldu. Tablo 4.13. de belirtilen reaksiyon içeriğine uygun olarak tüpler buz üstünde hazırlandı. Isıtıcı blok 65⁰C ye ayarlanarak tüpler bloğa yerleştirildi. Kesim sonrası ürünler % 3 agaroz + % 1 nusieve agaroz içeren jelle 4 µ lt yükleme bufferi ile karıştırılarak

yüklendi. Eğer kesim gerçekleşmişse 199 ve 101 baz çiftlik 2 bant gözlendi (A alleli). Kesim yoksa 300 baz çiftlik bant gözlendi (B ve C alleli).

Tablo 4.13. Ekzon 6 RFLP reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	Miktarı (μ lt)
PCR ürünü	7
10x Taq buffer	1
Taq I enzim	1
Su	1

Taq I enzimi tanıma dizisi



Yabanıl tip allel dizisi TCAA içerdiğinden Taq I enzimi bu diziyi tanıyamayacak ve kesemeyecektir. Fakat mutant allel dizisi TCGA olduğundan Taq I enzimi ile kesilecek 199 ve 101 baz çiftlik bantlar gözlenecektir. A allelinde A-G bir değişim söz konusudur (TCGA tanıma dizisine sahip). Bu durumda enzim A allelini tanıyıp kesebilecektir. B ve C allellerinde adenin bazı bulunduğundan tanıma dizisi TCAA olur ve Taq I enzimi ile bu alleller kesilemez.

5.9.2. Ekzon 3 bölgesine ait PCR ürününün HhaI enzimi ile kesimi

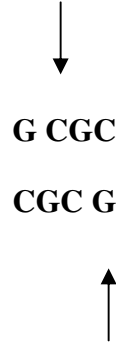
Ekzon 3 bölgesine ait PZR ürünü HhaI enzimi ile gece boyu 37 °C de kesime tabi tutuldu. Tablo 4.14. da belirtilen reaksiyon içeriğine uygun olarak tüpler buz üstünde hazırlandı.

Gece boyu 37⁰C etüvde bekletildi. Daha sonra ürünler % 3 agaroz + % 1 nusive agaroz içeren jele 4 µ lt yükleme bufferi ile karıştırılarak yüklendi.

Tablo 4.14. Ekzon 3 RFLP reaksiyon içeriği

Reaksiyon içeriği	Miktarı (µ lt)
PCR ürünü	9
10x Taq buffer	2
Hha I enzim	1
Su	8

Hha I enzimi için tanıma dizisi



Yabanıl tip allel dizisi **GCGC** içerdiğinden enzim yabanıl tip alleli tanıyıp kesecektir. A ve B allelleri **GCGC** içerdiğinden **HhaI** enzimi ile kesilecektir. **C allelinde C-T e değişim** olduğundan tanıma dizisi GTGC olur ve enzim tarafından kesilemez. Kesim gerçekleşmişse (**A ve B allelleri**) 254 ve 88 baz çiftlik bantlar gözlemlendi. Kesim gerçekleşmemişse (**C alleli**) 342 baz çiftlik bant gözlemlendi.

5.10. İstatistiksel Analiz

MS'lu hasta grubu ve kontrol grubu arasındaki ACP1 allel dağılımları Ki-kare testi kullanılarak değerlendirildi. Aynı şekilde vaka ile düşük, orta ve yüksek enzimatik aktiviteli allel dağılımları Ki-kare testi ile incelenerek yorumlandı. Tüm testlerde istatistiksel anlamlılık p<0.05 olarak alındı. Analizler "Statistical Package for the Social Services" (SPSS) software programına taşınarak yapıldı

6. Bulgular

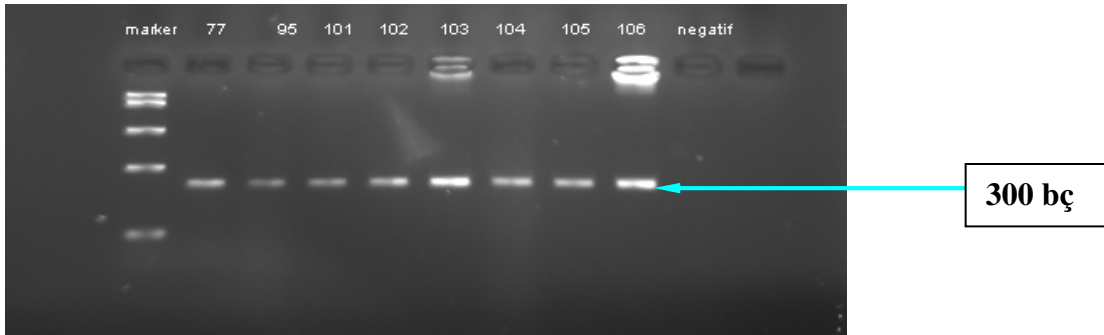
6.1. DNA İzolasyon sonuçları

Çalışmaya alınan 53 MS'lu hasta ve 168 kontrol grubunun kanından elde edilen DNA'ların saflık ve konsantrasyon tayini için spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçümleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre saflık derecesini gösteren 260/280 oranının 1.2 ile 1.6 arasında yoğunlaştığı görüldü.

6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

6.2.1. Ekzon 6 Bölgesinin PZR İle Çoğaltılması

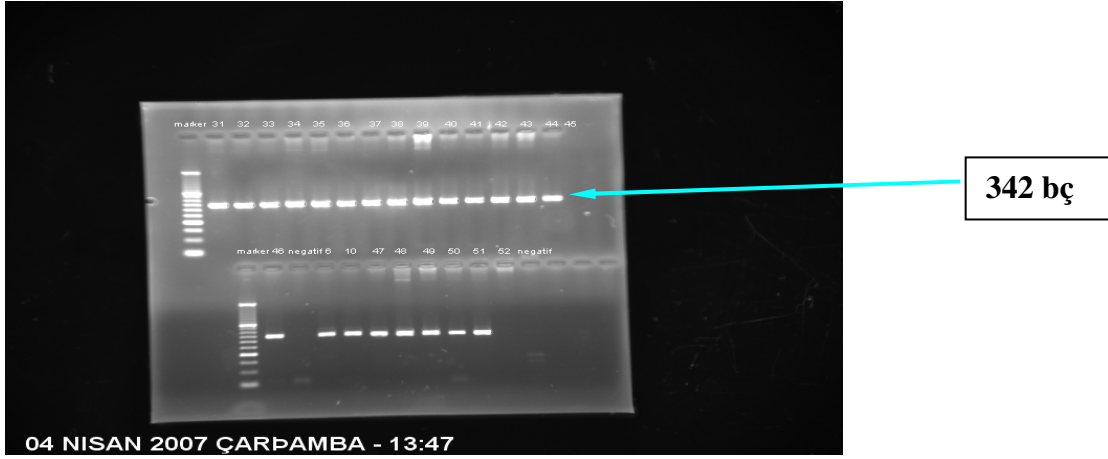
Çalışmaya alınan 53 MS hasta ve 168 kontrol grubunun ekzon 6 bölgesi PZR ile çoğaltıldı. PZR sonucu %2 lik agaroz jelde 300 bç lik ürün gözlemlendi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Ekzon 6 amplifikasyon örneği. 1. kuyu, marker ; 2-8. kuyular, 300 bç lik PZR ürünü ; 11. kuyu, kör olarak sıralanmaktadır.

6.2.2. Ekson 3 Bölgesinin PZR İle Çoğaltılması

53 MS hasta ve 168 kontrol grubunun ekson 3 bölgesi PZR ile çoğaltıldı. PZR sonucu %2 lik agaroz jelde 342 bç lik ürün gözlemlendi.

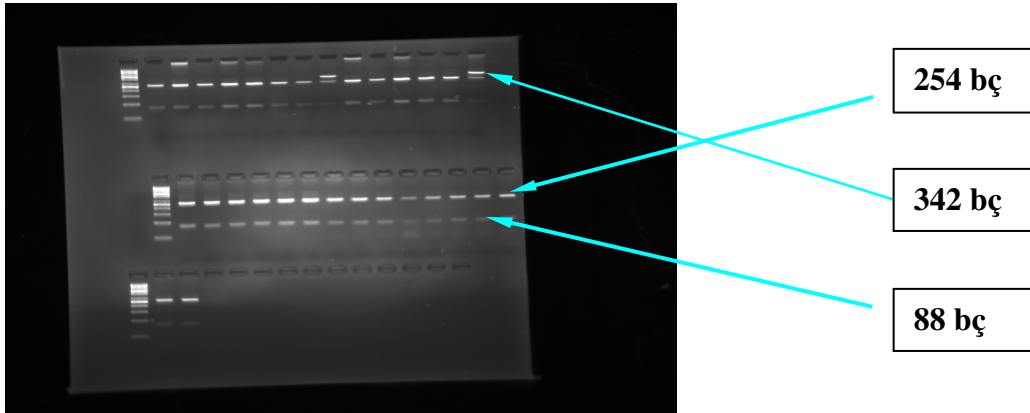


Şekil 4.3. Ekzon 3 bölgesi amplifikasyon örneği. 1. kuyu, marker; 2-15.kuyular ve 17-23.kuyular, 342 bp lik PZR ürünü; 16. kuyu kör olarak sıralanmıştır.

6.3. RFLP Sonuçları

6.3.1. Ekson 3 bölgesinin HhaI enzimi ile kesimi

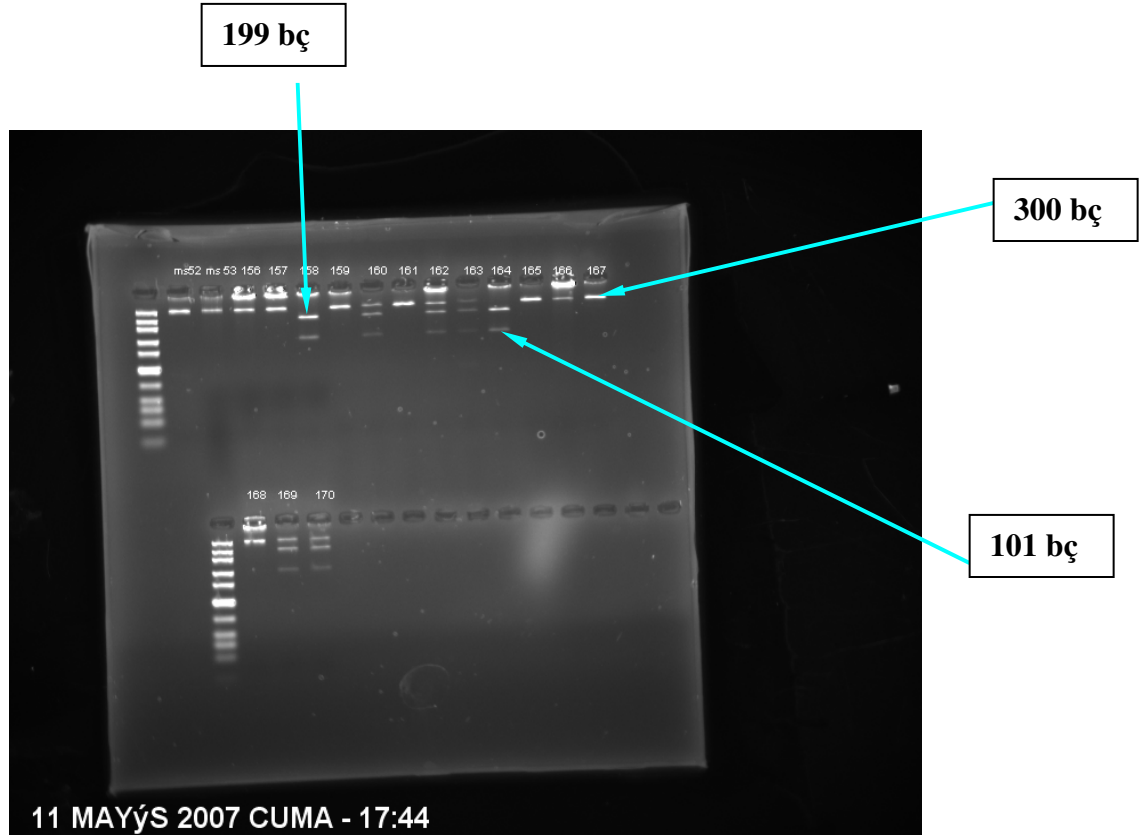
Ekson 3 bölgesinin Hha I enzimi ile gece boyu kesimi sonucu (A ve B alleli) 254 ve 88 bp'lik ürünler gözlemlendi. Kesim olmaması durumunda (C alleli) 342 bp'lik ürün gözlemlendi



Şekil 4.4. Ekzon 3 bölgesinin kesim örneği. 1. kuyu, 16.kuyu marker; 2-8., 10-14., 17-30. ve 32-33. kuyular, 254 ve 88 bp'lik kesim örneği; 9 ve 15.kuyular 342, 254 ve 88 bp'lik heterozigot kesim örneği.

6.3.2. Ekson 6 bölgesinin Taq I enzimi ile kesimi

PZR ürünü Taq I enzimi ile 1 saat boyunca 65⁰C kesime tabi tutuldu. Eğer kesim varsa A alleli olarak genotiplendi ve kesim sonucu 199 ve 101 bç'lik ürünler gözlemlendi. Eğer kesim yoksa B ve C alleli olarak genotiplendi ve 300 bç'lik PZR ürünü gözlemlendi.



Şekil 4.5. Ekson 6 bölgesinin kesim örneği. 1. kuyu, marker; 2-5., 7., 9., 13-15. ve 17. kuyular 300 bç'lik PZR ürünü (kesim yok); 6. ve 12. kuyular 199 ve 101 bç'lik kesim sonucu oluşan ürünler ; 8., 10., 11., 18. ve 19. kuyular 300 , 199 ve 101 bç'lik heterozigot kesim ürünü.

6.4. HASTALARIN VE KONTROL GRUBUNUN GENOTİPLEME SONUÇLARI

Metabolik sendromlu hasta sonuçları Tablo 4.15. de görülmektedir.

Tablo 4.15. MS hastaların ekson 6 ve ekson 3 bölgesi için kesim sonuçları ve bu sonuçlara göre belirlenen allel dağılımları

HASTALARIN KODU	EKSON 6	EKSON 3	ALLEL
MS1	kesim yok	heterozigot	BC
MS2	kesim var	heterozigot	AC
MS3	kesim yok	heterozigot	BC
MS4	kesim yok	heterozigot	BC
MS5	kesim yok	heterozigot	BC
MS6	heterozigot	heterozigot	AC
MS7	heterozigot	heterozigot	AC
MS8	kesim yok	heterozigot	BC
MS9	heterozigot	heterozigot	AC
MS10	heterozigot	heterozigot	AC
MS11	heterozigot	heterozigot	AC
MS12	kesim yok	heterozigot	BC
MS13	kesim yok	heterozigot	BC
MS14	kesim yok	heterozigot	BC
MS15	heterozigot	kesim var	AB
MS16	heterozigot	heterozigot	AC
MS17	heterozigot	heterozigot	AC

HASTALARIN KODU	EKSON 6	EKSON 3	ALLEL
MS18	kesim var	heterozigot	AC
MS19	heterozigot	heterozigot	AC
MS20	kesim yok	heterozigot	BC
MS21	heterozigot	kesim var	AB
MS22	kesim yok	heterozigot	BC
MS23	kesim yok	kesim var	BB
MS24	kesim yok	kesim var	BB
MS25	heterozigot	kesim var	AB
MS26	kesim var	kesim var	AA
MS27	heterozigot	kesim var	AB
MS28	kesim var	kesim var	AA
MS29	heterozigot	kesim var	AB
MS30	kesim var	kesim var	AA
MS31	kesim yok	kesim var	BB
MS32	kesim var	kesim var	AA
MS33	heterozigot	kesim var	AB
MS34	kesim yok	kesim var	BB
MS35	kesim var	kesim var	AA
MS36	kesim yok	kesim var	BB
MS37	kesim yok	kesim var	BC
MS38	kesim yok	heterozigot	BB

HASTALARIN KODU	EKSON 6	EKSON 3	ALLEL
MS40	heterozigot	kesim var	AB
MS41	kesim yok	kesim var	BB
MS42	kesim yok	kesim var	BB
MS43	kesim yok	heterozigot	BC
MS44	kesim yok	kesim var	BB
MS45	heterozigot	kesim var	AB
MS46	heterozigot	heterozigot	AC
MS47	heterozigot	kesim var	AB
MS48	kesim var	kesim var	AA
MS49	heterozigot	kesim var	AB
MS50	kesim yok	kesim var	BB
MS51	kesim yok	kesim var	BB
MS52	kesim yok	kesim var	BB
MS53	kesim yok	kesim var	BB
MS54	kesim yok	kesim var	BB

Tablo 4.16. Metabolik Sendromlu hastaların ACP1 geni allel dağılımları

AA	AB	AC	BC	BB	ALLEL
6 (%11.3)	10 (%18.8)	11 (%20.7)	12 (%22.6)	14 (%26.4)	Hasta sayısı

MS'lu hastaların düşük, orta ve yüksek enzimatik aktiviteli olarak 3 grupta incelenme sonuçları Tablo 4.17. da verilmiştir.

Tablo 4.17. Enzimatik aktivite grubuna göre allel dağılımı

Enzimatik aktivite grubu	Allel	Hasta sayısı
Düşük enzimatik aktiviteliler	A/A , A/B	16 hasta (% 30.1)
Orta enzimatik aktiviteliler	B/B , A/C	25 hasta (%47.1)
Yüksek enzimatik aktiviteliler	B/C , C/C	12 hasta (%22.6)

Tablo 4.18. Kontrol grubunun ekson 6 ve ekson 3 bölgesi için kesim sonuçları ve bu sonuçlara göre belirlenen allel dağılımları gösterilmektedir.

KONTROL GRUBUNUN KODU	EKSON 6	EKSON 3	ALLEL
MSK 1	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 2	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 3	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 4	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 5	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 6	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 7	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 8	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 9	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 10	heterozigot	Kesim var	AB

MSK 11	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 12	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 13	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 14	heterozigot	Kesim var	AB
MSK 15	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK16	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK17	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 18	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 19	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 20	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 21	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 22	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 23	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 24	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 25	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 26	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 27	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 28	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 29	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 30	Kesim yok	Heterozigot	BC
MSK 31	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 32	Kesim var	Kesim var	AA

MSK 33	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 34	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 35	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 36	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 37	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 38	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 39	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 40	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 41	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 42	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 43	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 44	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 45	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 46	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 47	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 48	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 49	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 50	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 51	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 52	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 53	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 54	Kesim yok	Kesim var	BB

MSK 55	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 56	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 57	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 58	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 59	Kesim yok	Heterozigot	BC
MSK 60	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 61	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 62	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 63	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 64	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 65	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 66	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 67	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 68	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 69	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 70	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 71	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 72	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 73	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 74	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 75	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 76	Kesim yok	Kesim var	BB

MSK 77	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 78	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 79	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 80	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 81	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 82	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 83	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 84	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 85	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 86	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 87	Heterozigot	Heterozigot	AC
MSK 88	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 89	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 90	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 91	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 92	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 93	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 94	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 95	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 96	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 97	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 98	Kesim yok	Kesim var	BB

MSK 99	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 100	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 101	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 102	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 103	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 104	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 105	Kesim yok	Heterozigot	BC
MSK 106	Keim yok	Kesim var	BB
MSK 107	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 108	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 110	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 111	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 112	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 113	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 115	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 116	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 117	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 118	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 119	Heterozigot	Heterozigot	AC
MSK 120	Heterozigot	Heterozigot	AB
MSK 121	Kesim yok	Kesim yok	BB
MSK 122	Kesim yok	Kesim var	BB

MSK 123	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 124	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 125	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 126	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 127	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 128	Heterozigot	Heterozigot	AC
MSK 129	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 130	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 131	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 132	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 133	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 134	Kesim yok	Heterozigot	BC
MSK 135	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 136	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 137	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 138	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 139	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 140	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 141	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 142	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 143	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 144	Kesim yok	Kesim var	BB

MSK 145	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 146	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 147	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 148	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 149	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 150	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 151	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 152	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 153	Kesim yok	Heterozigot	BC
MSK 154	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 155	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 156	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 157	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 158	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 159	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 160	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 161	Kesim yok	Heterozigot	BC
MSK 162	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 163	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 164	Kesim var	Kesim var	AA
MSK 165	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 166	Kesim yok	Kesim var	BB

MSK 167	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 168	Kesim yok	Kesim var	BB
MSK 169	Heterozigot	Kesim var	AB
MSK 170	Heterozigot	Kesim var	AB

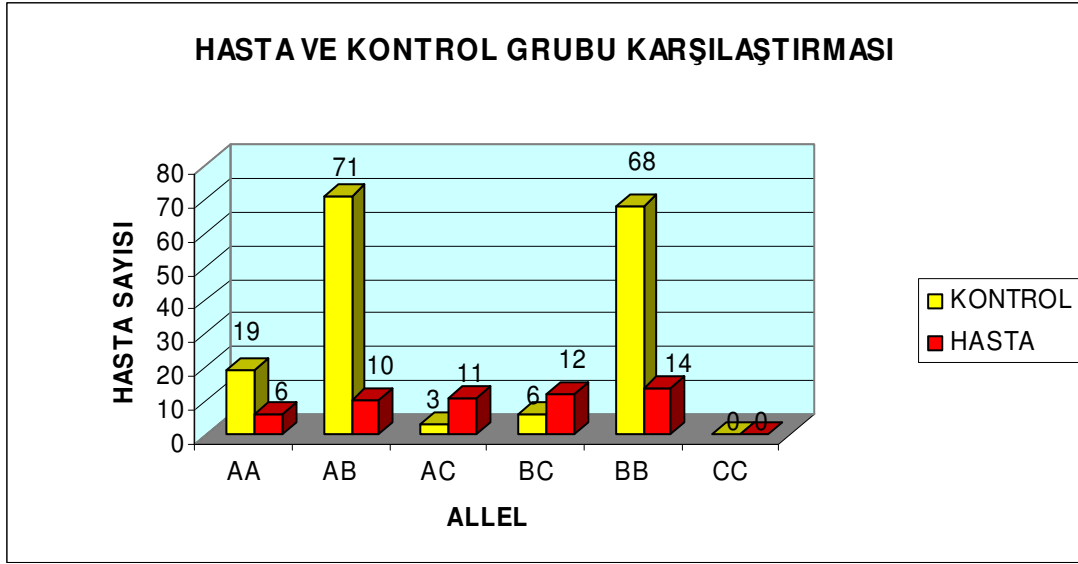
Tablo 4.19. 168 kontrol grubunun allel dağılımları

AA	AB	AC	BC	BB	Allel
19 (%11.3)	71(%42.2)	3(%1.7)	6 (%3.5)	69(%41)	Hasta sayısı

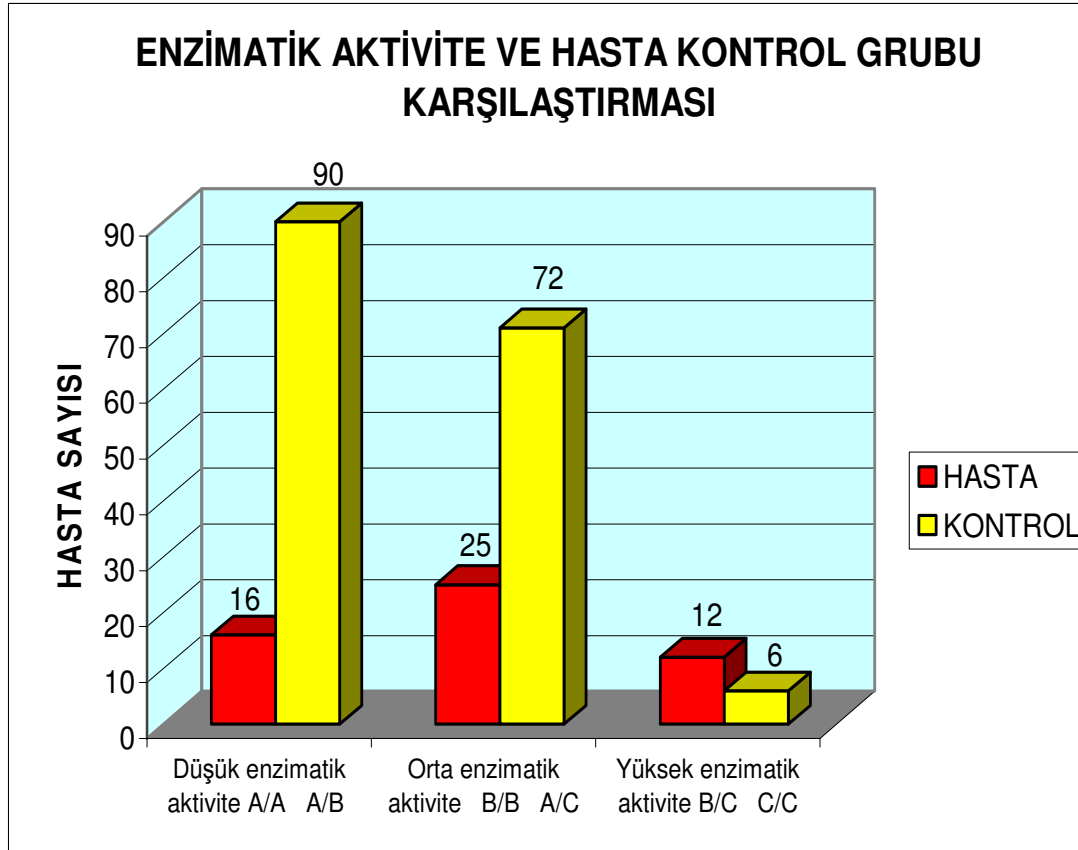
Kontrol grubunu düşük, orta ve yüksek enzimatik aktiviteli olarak 3 grupta ele alındığı zaman Tablo 4.20. de gösterilen değerler elde edilmiştir.

Tablo 4.20. Enzimatik aktivite grubuna göre kontrol grubunun allel dağılımları

Enzimatik aktivite grubu	Allel	Hasta sayısı
Düşük enzimatik aktiviteliler	A/A , A/B	90 (%53.5)
Orta enzimatik aktiviteliler	B/B , A/C	72(%42.8)
Yüksek enzimatik aktiviteliler	B/C , C/C	6(%3.5)



Şekil 4.6. ACP1 allelerinin hasta ve kontrol grubundaki karşılaştırması



Şekil 4.7. Üç enzimatik aktivite grubu ve hasta kontrol karşılaştırması

6.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI

Çalışmaya alınan 53 MS'lu hasta ve kontrol grubunun allel karşılaştırması Ki- kare analizi kullanılarak yapılmıştır. Ki – kare anlamlılık değeri $p < 0.01$ olarak kabul edildi. SPSS bilgisayar programında yapılan veri analizleri, kontrol ve hasta grubu arasında yüksek ve düşük enzimatik aktiviteye sahip alleller arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğunu gösterdi. Kontrol ve hasta grubuna ait allel karşılaştırması sonucunda elde edilen yüzde değerleri Tablo 4.21.'de özetlenmiştir. Sonuçlar dahilinde hasta ve kontrol grubu için düşük, orta ve yüksek enzimatik aktivite grupları göz önüne alınarak ayrı ayrı istatistik programı uygulandı. Tablo 4.21., Tablo 4.22. ve Tablo 4.23. de istatistik sonuçları özetlenmiştir. Yüksek enzimatik aktiviteli allele sahip kişi sayısı hastalarda (% 22.6) kontrol grubundan (% 3.6) istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Düşük enzimatik aktiviteli allele sahip kişi sayısı kontrol grubunda (% 53.6) hastalardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Tablo 4.21. Vaka- allel karşılaştırması

			ALEL					Total
			AA	AB	AC	BB	BC	
VAKA	kontrol	SAYI	19	71	3	69	6	168
		%	11,3%	42,3%	1,8%	41,1%	3,6%	100,0%
	hasta	SAYI	6	10	11	14	12	53
		%	11,3%	18,9%	20,8%	26,4%	22,6%	100,0%
Total	SAYI		25	81	14	83	18	221
	%		11,3%	36,7%	6,3%	37,6%	8,1%	100,0%

Tablo 4.22. Vaka- yüksek enzimatik aktiviteli allel ve diğerlerinin karşılaştırması

			Yüksek enzimatik aktiviteli allele sahip kişi sayısı		Total
			diğerleri	BC veya CC alleli	
VAKA	kontrol	SAYI	162	6	168
		%	96,4%	3,6%	100,0%
	hasta	SAYI	41	12	53
		%	77,4%	22,6%	100,0%
Total		SAYI	203	18	221
		%	91,9%	8,1%	100,0%

P= 0.000 (Fisher's Exact Test)

Tablo 4.23. Yüksek enzimatik aktiviteli allele sahip bireylerde MS için risk tahmini

kontrol / hasta (Vaka) için ek oran	Ortalama değer 7,902	En yüksek değeri 2,798	En düşük değer 22,317
--	-------------------------	------------------------------	--------------------------

Tablo 4.24. Vaka – düşük enzimatik aktiviteli allel ve diğerlerinin karşılaştırması

			Düşük enzimatik aktiviteli allele sahip hasta sayısı		Total
			diğerleri	AA veya AB aleli	
VAKA	kontrol	SAYI	78	90	168
		%	46,4%	53,6%	100,0%
	hasta	SAYI	37	16	53
		%	69,8%	30,2%	100,0%
Total		SAYI	115	106	221
		%	52,0%	48,0%	100,0%

P= 0.004 (Fisher's Exact Test)

Tablo 4.25. Düşük enzimatik aktiviteli allele sahip bireylerde MS için risk tahmini

kontrol / hasta (Vaka) için ek oran	Ortalama değer ,375	En yüksek değer ,194	En düşük değer ,725
--	------------------------	-------------------------	------------------------

Tablo 4.26. Vaka – orta enzimatik aktiviteli allel ve diğerlerinin karşılaştırması

			Orta enzimatik aktiviteli allele sahip hasta sayısı		Total
			diğerleri	BB veya AC aleli	
VAKA	kontrol	SAYI	96	72	168
		%	57,1%	42,9%	100,0%
	hasta	SAYI	28	25	53
		%	52,8%	47,2%	100,0%
Total		SAYI	124	97	221
		%	56,1%	43,9%	100,0%

P= 0.635 (Fisher's Exact Test)

Tablo 4.27. Orta enzimatik aktiviteli allele sahip bireylerde MS için risk tahmini

kontrol / hasta (Vaka) için ek oran	Ortalama değer 1,190	En yüksek değer ,641	En düşük değer 2,213
--	-------------------------	-------------------------	-------------------------

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çok etkenli bir patogeneze sahip metabolik sendromun altında yatan başlıca iki etken abdominal obezite ile insülin direncidir; yaşlanma, fiziksel inaktivite, genetik unsurlar gibi tetikleyici faktörlerin varlığında belirlenebilmektedir. Bu nedenle metabolik sendromun yüksek prevalansı obezitenin tüm dünyadaki endişe verici bir hızla artan prevalansı ile sıkı şekilde ilişkilidir (10-16). Aynı durum Amerika Birleşik Devletlerinde de tüm etnik gruplarda özellikle erişkinler, yaşlılar, beyaz erkekler, zenci ve hispanik kadınlarda izlenmektedir (17-23).

Metabolik sendromun gelişiminde viseral obezite merkezi bir rol oynamaktadır. Viseral obezite; kan basıncı, açlık kan glukozu ve insülin değerleri ile pozitif, HDL kolesterol düzeyleri ile negatif ilişki göstermektedir (41). Serbest yağ asitleri (SYA) düzeyleri ile insülin direncinin doğru orantılı olduğu gösterilmiştir (42). Metabolik sendromun tanı kriterlerinden biri olan obezite bugünkü görüşlerde, çevresel faktörlerinden ziyade genetik olarak belirlenmektedir.

Çalışmamızın amacı Türk toplumunda ACP1 gen polimorfizmlerinin dağılımını belirlemek ve metabolik sendrom ile ilişkisinin saptanmasıdır.

Hopkinson ve ark. ilk olarak protein düzeyinde ACP1 polimorfizmini tanımlamışlardır. Yüksek polimorfik yapı gösteren bir gen olan asit fosfataz lokus 1 (ACP1)'in ürünü, insülin, PDGF reseptörleri ve T-hücre reseptörlerinin sinyal iletiminde rol almaktadır. Bu genin kodladığı LMTP insülin sinyal iletiminde negatif düzenlemede rol alır (4). Bu nedenle metabolik sendrom tanısı konmuş hastalarda ACP1 gen polimorfizmleri belirlenerek normal sağlıklı popülasyon ile kıyaslaması yapılmıştır. Çalışmamızda kontrol grubunda düşük enzimatik aktiviteli allele sahip kişiler hasta grubundan istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Hasta grubunda ise yüksek enzimatik aktiviteli allele sahip kişiler kontrol grubundan istatistiksel açıdan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Asit fosfataz lokus 1'in fizyolojik roldeki derecesi tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat veriler ACP1'in; insülin reseptörleri (82), PDGF (83-86), T hücre reseptörleri (87) ve diğerleri (88-91) gibi membran reseptörleriyle aktive olan sinyal yollarını içeren enzim

olduğunu işaret etmektedir. ACP1 polimorfizmi şiddetli obezite (92,93), malarya (94), Tip 1 diyabet (95), alerjiye (96) artmış eğilim gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.

Bottini ve ark. tarafından yapılan çalışmada ACP1 genotipleri obez ve obez olmayan bireyler arasında fark bulunmamış ancak obeziteyle VKI arasında ilişki saptanmıştır. Araştırmacılar ACP1 enzimatik aktivitesindeki değişkenliğin obezitenin derecesini etkilediğini savunmuşlardır (93). Benzer şekilde Lucarini ve ark. NIDDM örneklerde VKI ve ACP1 A alleli arasında anlamlı pozitif ilişki raporlamıştır (97). Yine aynı grup obez ve obez olmayan menopoz sonrası Hispanik olmayan Amerikan kadınlarda obezitenin klinik çeşitliliği ve ACP1 polimorfizmi arasında ilişkiyi araştırmışlardır. A alleli taşımayan kişilerde VKI'inin artışıyla beraber trigliserit düzeyinde artış gözlenmiştir. A alleli taşıyan bireylerde bel-kalça oranında artışa eğilim olduğunu söylemişlerdir (93).

Diyabetik hamilelerde ve Tip 2 diyabetiklerde düşük aktiviteli genotiplerle orta-yüksek aktiviteli ACP1 genotipleri karşılaştırılmıştır. Düşük aktiviteli ACP1 genotiplerinde daha düşük serum glukoz konsantrasyonu saptamışlardır (5). Yine sağlıklı yetişkinlerde yapılan bir çalışmada yüksek aktiviteli ACP1 genotipli erkeklerde serum glukoz konsantrasyonunun değeri düşük aktiviteli ACP1 genotipli erkeklerden daha yüksek bulunmuştur. Sağlıklı kadınlarda bu durum tersine etki göstermiştir. Şimdi ilginç olarak çalışmalar yaygın hastalıkların her 2 cinsiyette farklı oranda gözlenmesi üzerine yoğunlaşmıştır (98).

Şimdiye kadar yapılan çalışmalar ACP1 allelinin etkili olduğu sinyal yolağıyla ilişkili hastalıkların biri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu tez çalışmasında farklı olarak bu hastalıkların hepsini kapsayan MS ile ACP1 arasındaki ilişki araştırılmış ve ACP1'in metabolik sendrom oluşumunda etkili olduğu bulunmuştur. ACP1 insülin reseptörünü baskılama fonksiyonuna sahiptir ve yüksek polimorfik bir gen olduğu için kişiler arasında reseptör üzerine farklı baskılama gerçekleşecektir. Dolayısıyla kişiler arasında taşıdığı genotipe bağlı olarak glukozu farklı yanıt oluşacaktır. Yüksek aktiviteli ACP1 alleleline sahip bireylerde İR üzerine yüksek inhibisyonndan dolayı insülin hareketi baskılanarak yüksek glisemik düzeyi oluşacaktır. Yüksek ACP 1 aktivitesi aynı zamanda Band 3 Proteinini defosforile ederek glikolitik enzim aktivitesini azaltıp glikolizi inhibe etmektedir.

Glikolizin inhibisyonu ile yine yüksek glukoz düzeyi gözlenecektir. Metabolik sendromun temelinde insülin direnci rol oynamaktadır. ACP1 ve metabolik sendrom arasındaki bu güçlü ilişkiyi insülin direncine bağlayarak; insülinin direncinin metabolik sendrom oluşumundaki ana patofizyolojik olay olduğu bizim çalışmamızla kuvvetlendirilmektedir.

Sonuç olarak; düşük enzimatik aktiviteli allele sahip bireylerde, insülin reseptörüne olan düşük baskılamadan ötürü insüline karşı tolerans gelişir ve metabolik sendromdan korunabilir; yüksek enzimatik aktiviteli allele sahip bireylerde de, insülin reseptörüne olan güçlü baskılamadan ötürü insüline karşı direnç gelişip metabolik sendroma büyük olasılıkla yatkınlık oluşturmaktadır.

8. KAYNAKLAR

1. Expert Panel on Detection, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel UT). JAMA, 85:2486-297, 2001.
2. Onat A., Ceyhan K., Başar O., Erer B., Sansoy V.: Major impact on coronary risk in a population with low cholesterol levels-a prospective and cross-sectional evaluation. Metabolic syndrome, 165:285-92, 2002.
3. Bettowski J.: Adiponectin and resistin-new hormones of white adipose tissue. Med Sci Monit., 9:55-61, 2003.
4. Meloni G., Bottini N., Borgiani P., Meloni T., Bottini E.: Association of the ACP1 genotype with metabolic parameters upon initial diagnosis of type 1 diabetes. Med Sci Monit., 9:105-108, 2003.
5. Gloria-Bottini F., Gerlini G., Lucarini N., Borgiani P., Amante A., La Torre M., Antonacci E., Bottini E.: Phosphotyrosine protein phosphatases and diabetic pregnancy: an association between low molecular weight acid phosphatase and degree of glycemic control. Experientia, 52:340-343, 1996.
6. Bottini E., Lucarini N., Gerlini N., Finocchi G., Scire G., Gloria-Bottini F.: Enzyme polymorphism and clinical variability of diseases: study of acid phosphatase locus 1 (ACP 1) in obese subjects. Experientia, 62:403-11, 1990.
7. Bottini N., MacMurray J., Peters W., Rostamkhani M., and David E.: Comings Association of the acid phosphatase (ACP1) gene with triglyceride levels in obese women. Mol. Genet. Metab., 77: 226-229, 2002.
8. Scott M.G.: Metabolic Syndrom: A Growing Clinical Challenge Medscape. Cardiology, 8:2, 2004.
9. Reaven G.M.: Banting Lecture 1988. Role of Insulin Resistance in Human Disease. Diabetes, 37:1595-1607, 1988.

10. Al Lawati J.A., Jousilahti P.J.: Prevalence and 10-year Secular Trend of Obesity in Oman. *Saudi Med. J.*, 25:346-351, 2004.
11. De Bacquer D., De Backer G., Cokkinos D., et al.: Overweight and Obesity in Patients with Established Coronary Heart Disease: Are We Meeting The Challenge?. *Eur. Heart. J.*, 25:121-128, 2004.
12. Gutierrez-Fisac J.L., Lopez E., Banegas J.R., Graciani , Rodriguez-Artalejo F.: Prevalence of Overweight and Obesity in Elderly People in Spain. *Obes. Res.*, 12:710-715, 2004.
13. Matsushita Y., Yoshiike N., Kaneda F., Yoshita K., Takimoto H.: Trends in Childhood Obesity in Japan Over The Last 25 Years From The National Nutrition Survey. *Obes. Res.*, 12:205-214, 2004.
14. Yoshinaga M., Shimago A., Koriyama C., et al.: Rapid Increase in The Prevalence of Obesity in Elementary School Children. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 28:494-499, 2004.
15. Rami B., Schober E., Kirchengast S., Waldhor T., Sefranek R.: Prevalence of Overweight and Obesity in Male Adolescents in Austria Between 1985 and 2000. A Population Based Study. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab.*, 17:67-72, 2004.
16. Rio-Navarro B.E., Velazquez-Monroy O. , Sanchez-Csatillo C.P. ,et al.: The High Prevalence of Overweight and Obesity in Mexican Children. *Obes. Res.*, 12:215-223, 2004
17. Grundy S.M.: What Is The Contribution of Obesity to The Metabolic Syndrom. *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.*, 33:267-282, 2004.
18. Einhorn D., Reaven G.M., Cobin R.H., et al.: American College of Endocrinology Position Statement on The Insulin Resistance Syndrom. *Endocr. Pract.*, 9:237-252, 2003.
19. Roberts A., King J., Greenway F.: Class III Obesity Continues to Rise in African American Women. *Obes Surg.*, 14:533-535, 2004.
20. Cossrow N., Falkner B.: Race/ethnic Issues in Obesity and Obesity-related Comorbidities. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89:2590-2594, 2004.
21. Hedley A.A., Ogden J.L., Johnson C.L., Carroll M.D., Curtin L.R., Flegal K.M.: Prevalence of Overweight and Obesity Among US Children, Adolescents and Adults, 1999-2002. *JAMA.*, 291:2847-2850, 2004.

22. Kennedy R.L , Chokkalingham K., Srinivasan R.: Obesity In The Eldrely: Who Should We Be Treating, and Why and How?. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.*, 7:3- 9,2004.
23. Patterson P.D. , Moore C.G. , Probst J.C. , Shinogle J.A.: Obesity and Physical Inactivity in Rural America. *J. Rural. Health.*, 20:151-159, 2004.
24. Bujalska I.J., Kumar S., Stewart P.M.: Does central obesity reflect “Cushing’s disease of the omentum?”. *Lancet*, 349: 1210-3, 1997.
25. Engeli S., Bohnke J., Feldpausch M., et al.: Regulation of HSD genes in human adipose tissue: Influence of central obesity and weight loss. *Obes. Res.*, 12: 9-17, 2004.
26. Roust L.R., Jensen M.D.: Postprandial free fatty acid kinetics are abnormal in upper body obesity. *Diabetes.*, 42: 1567-73, 1993.
27. Kishida K., Kuriyama H., Funahashi T., et al.: Aquaporine adipose, a putative glycerol channel in adipocytes. *J. Bio.l Chem.* , 275: 20896-902, 2000.
28. Guerre-Millo M.: Adipose tissue hormones. *J. Endocrinol. Invest.*, 25: 855-61, 2002.
29. Ahima R.S., Flier J.S.: Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol. Metab.*, 11: 327-32, 2000.
30. Shouldiner A.R., Yang R., Gong D-W.: Resistin, obesity, and insulin resitance – the emerging role of the adipocytes as an endocrine organ. *N. Eng.J. Med.*, 345: 1345-6, 2001.
31. Saltiel A.R.: You are what you secrete. *Nature Medicine* , 7: 887-8, 2001.
32. Flier J.S.: The missing link with obesity?. *Nature* , 409: 292-3, 2001.
33. Arslan M.:Metabolik Sendrom: Tanımı, Patogenezi, Tanı Kriterleri Ve Bileşenleri. *Türkiye Klinikleri J. Int. Med. Sci.*, 3:1-7, 2006.
34. Haffner S.M., Alexander C.M., Cook T.J., et al.: Reduced Coronary Events in Simvastatin-treated Patients with Coronary Heart Disease and Diabetes or Impaired Fasting Glucose Levels: Subgroup Analysis in the Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Arch. Intern. Med.* , 159:2661-2667, 1999.
35. Jastrzebska M., Przybycien K., Chelstowski K., Torbus-Lisiecka B., Kornacewicz-Jach Z., Naruszewicz M.: Incrazed Levels of Factor VII, Fibrinogen and Activity of Plasminogen Activator Inhibitor During Postprandial Tryglyceridemia in Patients with Ischemic Heart Disease Confirmed by Angiography. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, 9:33-40, 1999.

36. Steinmetz A., Fenselau S. And Schrezenmeir J.: Treatment of dyslipoproteinemia in the metabolic syndrome. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes.*,109:548-559, 2001.
37. Hotta K. , Funahashi T. , Arita Y. , et al.: Plasma Concentrations of a Novel, Adipose spesific Protein, Adiponectin, in Type 2 Diabetic Patients. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20:1595-1599, 2000.
38. Işıldak ve ark.: Metabolik sendrom ve insülin direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35:96-99, 2004.
39. Özbakkaloğlu M.: Yüzyılın salgını: metabolik sendrom. *SSK Tepecik Hast. Derg.*, 13:121-12, 2003.
40. Davis S.: Insulin, oral hypoglycemic agents, and the pharmacology of the endocrine pancreas. Ed: Hardman J., Limbard L., *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Vol. 9, s. 1487-1517, McGraw-Hill PublishingCo, New York, 1996.
41. Maison P.: Do different dimensions of the metabolic syndrome change together over time?: Evidence supporting obesity as them central feature. *Diabetes Care*, 24:1758-63, 2001.
42. Carey D.G.: Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women:Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes*, 45:633-8, 1996.
43. Onat A.: Halkımızda koroner hastalığın baş suçlusu metabolik sendrom: sıklığı, unsurları, koroner risk ile ilişkisi ve yüksek risk kriterleri. *Türk Kardiyoloji Derneği*, 30:8-15, 2002.
44. Narayan K.M., Beckles G.L., Gregg E.W., Williamson D.F., Saaddine J., Engelgau M.M., Vinicor F.: Treating type 2 diabetes. Study was conducted in exemplary fashion.*B.M.J.*, 6:666-7, 1999.
45. Arslan M.: Metabolik sendrom klavuzu. *Türkiye endokrinoloji ve metabolizma derneği*, 1-13, 2003.
46. Görpe U.: Metabolik sendrom. *Diabetes Mellitus Sempozyumu*, 18-19 Aralık ,İstanbul, 47-51, 1997.
47. Grundy S.M.: Diabetes and cardiovascular disease: A statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*, 100:1134-46, 1999.

48. Miller G.J.: Lipoproteins and the haemostatic system in atherothrombotic disorders. *Baillieres Clin. Haematol.*, 7:713-32, 1994.
49. Ford E.S., Giles W.H., Dietz W.H.: Prevalence of The Metabolic Syndrom Among US Adults: Findings From The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA* , 287:356-359, 2002.
50. Alexander C.M., Landsmann P.B., Teutsch S.M., Haffner S.M.: NCEP-defined Metabolic Syndrom, Diabetes and Prevalence of Coronary Heart Disease Among NHANES III Participants Age 50 Years and Older. *Diabetes*, 52:1210-1214, 2003.
51. Ginsberg H.N., Stahlenhoef A.F.: The Metabolic Syndrom: Targeting Dyslipidemia to Reduce Coronary Risk. *J. Cardiovasc. Risk.* , 10:121-128, 2003.
52. Wolf A.M., Colditz G.A.: Current Estimates of the Economic Cost of Obesity in the United States. *Obes. Res.*, 6:97-106, 1998.
53. Girman J.C., Rhodes T., Mercuri M. , et al.: The Metabolic Syndrom and Risk of Major Coronary Events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study and The Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study (AFCAPS/TexCAPS). *Am. J. Cardiol.*, 93:136-141, 2004.
54. Onat A., Ceyhan K., Başar Ö., Erer B., Toprak S., Sansoy V.: Metabolic syndrome: major impact on coronary risk in a population with low cholesterol levels – a prospective and cross-sectional evaluation. *Atherosclerosis* , 165: 285-92, 2002.
55. Onat A., Hergenç G., Türkmen S., Yazıcı M., Sarı I., Can G.: Discordance between Insulin resistance and metabolic syndrome: features and associated cardiovascular risk in adults with normal glucose regulation. *Metabolism*, 55: 445-52, 2006.
56. Onat A., Uyarel H., Hergenç G., Karabulut A., Albayrak S., Can G.: ‘Determinants and definition of abdominal obesity as related to risk of diabetes, metabolic syndrome and coronary disease in Turkish men: a prospective cohort study’, *Atherosclerosis* , 191: 182-90, 2007.
57. Onat A., Sarı I., Hergenç G., Yazıcı M., Can G., Uyarel H., et al.: Predictors of and consequences in relation to the degree of abdominal obesity among Turkish women: a prospective population-based study. *Metabolism*, 56: 348-56, 2007.

58. Kozan Ö., Oğuz A., Erol Ç.: ‘METSAR çalışması erken dönem sonuçları’, 19.Ulusal Kardiyoloji Kongresi, Antalya, 2003.
59. Bethesda M.D.: National Institutes of Health: Third Report of the on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol Adults. Adult Treatment Panel III. Executive Summary. National Institutes of Health, National Heart Lung and Blood Institute, 01-3670, 2001.
60. Grundy S.M., Brewer H.B., Cleeman J.I., Smith S.C., Lenfant C.: Report of The National Heart, Lung and Blood Institute/American Heart Association Conference on Scientific Issues Related to Definition. Circulation. Definition of Metabolic Syndrom, 109:433-438, 2004.
61. Alberti K.G., Zimmet P.Z.: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications. Part 1: Diagnosis nad Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation. Diabet. Med. , 15:539-553, 1998.
62. Einhorn D., Reaven G.M., Cobin R.H., et al.: American College of Endocrinology Position Statement on The Insulin Resistance Syndrom. Endocr. Pract., 9:237-252, 2003.
63. Alberti K.M., Zimmet P., Shaw J., for the IDF Epidemiology Task Force Consensus Group The metabolic syndrome - a new worldwide definition. Lancet, 366: 1059-62, 2005.
64. Chiarugi P., Marra F., Raugei G., Camici G., Manao G., et al.: LMW-PTP is a negative regulator of insulin-mediated mitotic and metabolic signalling. Biochem. Biophys. Res. Commun., 238:676–682, 1997.
65. Ramponi G., Stefani M.: Structure and function of the low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. Biochim. Biophys. Acta., 1341:137–156, 1997.
66. Hopkinson D.A., Spencer N., Haris H.: Red cell acid phosphatase variants: a new human polymorphism. Nature, 199 :969–971, 1963.
67. Shekels L.L., Smith A.J., Van Etten R.L., Bernlohr D.A.: Identification of the adipocyte acid phosphatase as a PAOsensitive tyrosyl phosphatase. Protein Sci., 1: 710–721, 1992.
68. Bryson G.L., Massa H, Trask B.J., Van Etten R.L.: Gene structure, sequence, and chromosomal localization of the human red celltype low-molecular-weight acid phosphotyrosyl phosphatase gene, ACP1. Genemics , 30:133-40, 1995.

69. Heinrikson R.L.: Purification and characterization of a low molecular weight acid phosphatase from bovine liver. *J. Biol. Chem.*, 244:299-307, 1969.
70. Dissing J.: Immunochemical characterization of human red cell acid phosphatase isozymes. *Biochem. Genet.*, 25:901–17, 1987.
71. Dissing J., Rangaard B., Christensen U.: Activity modulation of the fast and slow isozymes of human cytosolic low-molecular-weight acid phosphatase (ACP1) by purines. *Biochim Biophys Acta*, 26:275-82, 1993.
72. Spencer N., Hopkinson D.A. and Harris H.: Quantitative differences and gene dosage in the human red cell acid phosphatase polymorphism. *Nature*, 201: 299-300, 1964.
73. Vogel W., Lammers R., Huang J., Ullrich A.: Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation. *Science*, 259: 1611–4, 1993.
74. Wo Y.Y., Mc Cormack A.L., Shabanowitz J., et al.: Sequencing, cloning and expression of human red cell-type acid phosphatase, a cytosolic phosphotyrosyl protein phosphatase. *J. Biol. Chem.* , 267:1056– 65, 1992.
75. Ramponi G., Ruggiero M., Berti A., et al.: Overexpression of a synthetic phosphotyrosine protein phosphatase gene inhibits normal and transformed cell growth. *Int.J.Cancer* ., 51:652–6, 1992.
76. Lazaruk K.D.A.: Molecular genetics of human red cell acid phosphatase. University of California, PhD dissertation (Professor Sensabaugh G.F.), Berkeley, 1995.
77. Heinrikson R.L.: Purification and characterization of a lowmolecular weight acid phosphatase from bovine liver. *J. Biol. Chem.*, 244:299-307, 1969.
78. John S.W.M., Weitzner G., Rozen R., Sriver C.R.: A Rapid Procedure for Extracting Genomic DNA from Leukocytes. *Nucleic Acid Res.*, 19: 408, 1988.
79. Dennis Lo Y.M.: Clinical Applications of PCR. Humana Press inc., 3:10, 1988.
80. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New york, 1989.
81. Botstein D., White R.L., Skolnick M. And Davis R.W.: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *J. Human Genet.*, 32:314-331, 1980.

82. Chiarugi P., Cirri P., Marra F., Raugei G., Camici G., Manao G., et al.: LMW-PTP is a negative regulator of insulin-mediated mitotic and metabolic signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238: 676–82, 1997.
83. Chiarugi P., Cirri P., Raugei G., Camici G., Dolfi F., Berti A., et al.: PDGF receptor as a specific in vivo target for low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase. *FEBS Lett*, 372:49–53, 1995.
84. Chiarugi P., Cirri P., Raugei G., Manao G., Taddei L., Ramponi G.: Low M(r) phosphotyrosine protein phosphatase interacts with the PDGF receptor directly via its catalytic site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 219: 21–5, 1996.
85. Ramponi G., Stefani M.: Structure and function of the low Mr phosphotyrosine protein phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1341:137–56, 1997.
86. Taddei M.L., Chiarugi P., Cirri P., Talini D., Camici G., Manao G., et al.: LMW-PTP exerts a differential regulation on PDGF- and insulin-mediated signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270:564–9, 2000.
87. Bottini N., Stefanini L., Williams S., Alonso A., Jascur T., Abraham R.T., et al.: Activation of ZAP-70 through specific dephosphorylation at the inhibitory Tyr-292 by the low molecular weight phosphotyrosine phosphatase (LMPTP). *J. Biol. Chem.*, 277:24220–4, 2002.
88. Ramponi G., Manao G., Camici G., Cappugi G., Ruggiero M., Bottaro D.P.: The 18 kDa cytosolic acid phosphatase from bovine liver has phosphotyrosine phosphatase activity on the autophosphorylated epidermal growth factor receptor. *FEBS Lett*, 250:469–73, 1989.
89. Shimohama S., Fujimoto S., Taniguchi T., Kimura J.: The endogenous substrate of low molecular weight acid phosphatase in the brain is an epidermal growth factor receptor. *Brain. Res.*, 662:185–8, 1994.
90. Rovida E., Rigacci S., Paccagnini A., Dello Sbarba P., Berti A.: The low-molecular-weight phosphotyrosine protein phosphatase, when overexpressed, reduces the mitogenic response to macrophage colony-stimulating factor and tyrosine phosphorylation of its receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 253:300–4, 1998.

91. Stein E., Lane A.A., Cerretti D.P., Schoecklmann H.O., Schroff A.D., Van Etten R.L., et al.: Eph receptors discriminate specific ligand oligomers to determine alternative signaling complexes, attachment, and assembly responses. *Genes. Dev.*, 12:667–78, 1998.
92. Bottini E., Lucarini N., Gerlini G., Finocchi G., Scire G., Gloria-Bottini F.: Enzyme polymorphism and clinical variability of diseases: study of acid phosphatase locus 1 (ACP1) in obese subjects. *Hum. Biol.*, 62: 403–11, 1990.
93. Bottini N., MacMurray J., Peters W., Rostamkhani M., Comings D.E.: Association of the acid phosphatase (ACP1) gene with triglyceride levels in obese women. *Mol. Genet. Metab.*, 77:226–9, 2002.
94. Bottini E., Palmarino R., Lucarelli P., Lista F., Bottini N.: ACP1 and human adaptability: association with past malarial morbidity in the Sardinian population. *Am. J. Human Biol.*, 13:753–60, 2001.
95. Bottini N., Meloni G.F., Borgiani P., Giorgini A., Buzzetti R., Pozzilli P., et al.: Genotypes of cytosolic low-molecular-weight protein-tyrosine-phosphatase correlate with age at onset of type 1 diabetes in a sex-specific manner. *Metabolism.*, 51:419–22, 2002.
96. Bottini N., Ammendola M., Gloria-Bottini F.: ACP1 is associated with allergy. *Allergy*, 57:651–2, 2002.
97. Lucarini N., Antonacci E., Bottini N., Gloria Bottini F., Lowmolecular-weight acid phosphatase (ACP1), obesity, and blood lipid levels in subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Hum. Biol.*, 69 :509–515, 1997.
98. Iannaccone U., Bergamaschi A., Magrini A., Marino G., Bottini N., Lucarelli P., Bottini E., Gloria-Bottini F. Serum glucose concentration and ACP1 genotype in healthy adult subjects. *Metabolism Clinical and Experimental* , 54 : 891– 894, 2005.