

59645

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

DEMANSİYEL HASTALIKLARDA
“ÖZELLİKLE ALZHEİMER HASTALIĞINDA”
APOLİPOPROTEİN E
GEN POLİMORFİZMİNİN LİPİD PROFİLLERİ
İLE OLAN İLİŞKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Tıbbi Biyolog BEDİA AĞAÇHAN

Tez Danışmanı: Prof. Dr. TURGAY İSBİR

İstanbul-1997



Bu çalışma İ.Ü. Araştırma Fonu'na desteklenmiştir. Proje No: T-268 / 301096



*Eğitimim ve tez çalışmalarım süresince yardımlarını ve ilgisini
esirgemeyen danışmanım Sayın Hocam Prof. Dr. TURGAY
İSBİR'e, çalışma arkadaşlarıma , aileme ve sonsuz desteğinden
dolayı eşim AYHAN AĞAÇHAN'a teşekkürler...*

İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ VE AMAÇ.....	1-2
2.	GENEL BİLGİLER.....	3-30
2.1.	Demanslar	
2.1.1.	Alzheimer Hastalığı	
2.1.2.	Alzheimer Hastalığının Klinik Özellikleri	
2.1.3.	Alzheimer Hastalığının Fizyopatolojisi	
2.1.4.	Alzheimer Hastalığının Gelişiminde Etkili Faktörler	
2.1.5.	Parkinson Hastalığı	
2.2.	Apolipoprotein E	
2.2.1	Apolipoprotein E'nin Tanımı	
2.2.2.	Apolipoprotein E'nin Sentez Yerleri	
2.2.3.	Apolipoprotein E'nin Beyindeki Metabolizması	
2.2.4.	Apolipoprotein E'nin İzoforma Özgü Etkileri	
2.2.5.	Apolipoprotein E'nin Alzheimer Hastalığının Patolojisindeki Rolü	
2.2.6.	Apolipoprotein E ve Alzheimer Hastalığı	
2.2.7.	Alzheimer Hastalığının Klinik Tanısında Apolipoprotein E'nin Yeri	
2.3.	Anjiyotensin Konverting Enzim	
3.	MATERYAL METOD.....	31- 45
3.1.	Seçilen Örneklerin Tanımı	
3.2.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	
3.3.	Kullanılan Gereçler	

3.4. Çözeltiler

3.4.1. DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

3.4.2. Agaroze Jel Elektroförezinde Kullanılan Çözeltiler

3.4.3. Lipid Profili Tayininde Kullanılan Çözeltiler

3.5. Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

3.5.2. DNA Saflık Tayini

3.5.3. DNA Konsantrasyonunun Hesaplanması

3.5.4. PCR Yöntemiyle Apolipoprotein E Gen Bölgesinin Çoğaltılması

3.5.5. PCR Yöntemiyle ACE Gen Bölgesinin Çoğaltılması

3.5.6. Agaroze Jel Elektroförez

3.5.7. Amplifikasyon Ürünlerinde Apo E Gen Polimorfizminin Tespiti

3.6. Lipid Profili Tayini

3.7. Apolipoprotein Tayinleri

3.8. Fosfolipid Tayini

3.9. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

4. BULGULAR46-85

5. TARTIŞMA.....86-98

6. ÖZET99-100

7. SUMMARY.....101-102

8. ÖZGEÇMİŞ.....103

9. KAYNAKLAR.....104-114

1 - GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde yaşlanma önlenemeyen, kronolojik, sosyal, biyolojik ve psikolojik boyutlu bir süreç olarak tanımlanmaktadır. 65 yaş üzerindeki nüfusun dünyada %15 dolayında, ülkemizde ise %9'a yakın olduğu ve bu oranın 21. yüzyılın ilk çeyreğinde %20'yi aşacağı düşünülürse, yaşlılık ve topluma getirdiği yük önemli sosyal sorunlardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yaşlılıkta en çok rastlanan hastalık grubunu oluşturan demanslar, çok değişik etmenlerle ortaya çıkmakta ve büyük bölümünü Alzheimer tipi senil demanslar oluşturmaktadır^{5,30,95,114}. Alzheimer hastalığının bilinen birçok sebebi olmakla birlikte apolipoprotein E (apo E) gen polimorfizmi günümüzdeki çalışmaların ilgi odağı haline gelmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda apo E ε4 alleli frekansının Alzheimer'da arttığı ve hastalığın gelişiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir^{4,19,24,25,38,64,71,75,79,82,91,93,101,102,119}. Ancak halen apo ε4 allelinin Alzheimer hastalığı ile olan ilişkisi kesinlik kazanmamıştır. Bu nedenle hastalıktan sorumlu olabilecek yeni genlerin araştırılması devam etmektedir.

Yukarıda bahsedilen bilgilerin ışığı altında, çalışmamızda Alzheimer tanısı konmuş bireylerde ve sağlıklı yaşlılarda apo E allellerinin Türk toplumundaki frekansının gösterilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca apo E polimorfizminin , Parkinson ve demans gibi hastalıklarda da dağılımları incelenerek konunun açıklığa kavuşturulması düşünülmüştür.

Çalışmada kullandığımız demans olgularının hayat hikayelerinin ve klinik bulgularının incelenmesi sonucunda hastaların bir kısmının yüksek tansiyona ve aterosklerotik oluşumlara sahip oldukları gözlenmiştir. Son yıllarda kardiyovasküler hastalıkların ve yüksek tansiyonun gelişiminden sorumlu olarak Anjiyotensin Konverting Enzim (ACE) genini gösteren çalışmalar bulunmaktadır
20, 61,62,83

Yaptığımız literatür çalışmasında Alzheimer hastalarında ACE ve apo E gen polimorfizminin birlikte incelendiği bir araştırmaya rastlanmamış ve bugüne kadar aralarında bir ilişki kurmak mümkün olmamıştır. Dolayısıyla Alzheimer hastalarında Apo E gen polimorfizminin yanında ACE gen polimorfizminin etkisi araştırılmaksızın konunun eksik kalacağı düşünülmüştür.

Bu çalışma Alzheimer , Parkinson ve demanstan oluşan hasta grubunda ve sağlıklı bireylerde apo E ve ACE gen polimorfizmlerinin demansın gelişimine ve biyokimyasal parametrelere olan etkileri ve birbirleriyle olan ilişkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

2 - GENEL BİLGİLER

2.1. DEMANSLAR:

Demans, yakın bellek bozukluğu ile beliren, entellektüel ve mental işlevlerin tümünde ilerleyici tarzdaki azalma ile karakterize edilen hastalıkların genel tanımlamasıdır. Yapılan çalışmalarında 65 yaş ve üstündekilerin yaklaşık %10'unda, 80 yaş ve üstündekilerin yaklaşık %20'sinde demans saptanmıştır^{7,30,81,89,95,114,126}. 65 yaşından önce ortaya çıkan demanslara presenil, 65 yaşın üzerinde oluşanlara ise senil demans adı verilmesine rağmen aralarında klinik ve patolojik olarak önemli bir fark bulunmamaktadır^{7,81,114}. Demansların bir çok türü olmakla birlikte en çok bilinenleri Parkinson ve Alzheimer tipi demanslardır.

2.1.1. ALZHEİMER HASTALIĞI:

Alzheimer hastalığı ilk olarak 1907'de Alois Alzheimer tarafından 51 yaşında bunayarak ölen bir kadında hastalığı karakterize eden nörofibriler demetlerin ve senil plakların gösterilmesiyle tanımlanmıştır^{10,33,95,114}. Klinik, genetik, patolojik ve nörokimyasal araştırmalar Alzheimer hastalığı'nın heterojen bir hastalık olduğunu göstermektedir¹⁰⁷. Hastalığın ailesel ve sporadik (aile hikayesi olmaksızın otozomal dominant karakter gösteren) şekilleri bulunmakla birlikte yapılan bir çok araştırmada aralarında klinik özellikler ve hastalığın seyri bakımından önemli bir fark olmadığı gösterilmiştir^{53,55}.

2.1.2.ALZHEİMER HASTALIĞININ KLİNİK ÖZELLİKLERİ :

Alzheimer hastalığının yaygın olarak hayatın orta ve ilerlemiş yaşlarında görüldüğü ve kesin tanısının ancak beyinde yapılan mikroskobik çalışma ile konulabileceği bildirilmiştir ^{7,10,81,114} . Tanıda genellikle “National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke - Alzheimer’s Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ARDA)”⁶⁶ veya “Consortium to Establish a Registry for Alzheimer’s Disease (CERAD)” in⁶⁸ kriterlerinin kullanılması birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir. Alzheimer hastalığının klinik tablosu dezoryantasyon , yakın bellek bozukluğu ve entellektüel işlemlerde azalma ile karakterize olan ilerleyici mental gerileme şeklinde olup ilk olarak yakın bellek bozukluğu oluşmaktadır ^{36,95} . Yersel dezoryantasyona bağlı olarak hastalar yollarını ve yerlerini kaybederler. Alzheimer’lı olgularda hastalığın seyri sırasında periodik ajitasyon, delirium ve akut konfüzyonel krizlerin görülebileceği belirtilmiştir ^{50,53,95} . Bazı olgularda bu bulguların yanında disfazi, agnozi vb. gibi nörolojik kortikal işlev bozuklukları gözlenebileceği bildirilmiştir. Nöropsikiyatrik semptom olarak olgularda depresyon, delüzyon, halüsinasyon, kişilik değişiklikleri ve davranış bozuklukları görülür. Ayrıca hastalık frontal loba yayıldığında yürüme bozukluğu, enkontinans, apati, sosyal inhibisyon ve otokritik yitiminde artış gözlemlendiği açıklanmıştır ^{10,36,95} . Son dönemlerinde ise ileri derecede bağımlı, bakıma muhtaç hale gelirler , kilo kaybederler ve yatalak olurlar. Alzheimer hastalığı ilerleyici olmakla birlikte şiddetinin olgudan olguya değişebileceği gösterilmiştir. Hastaların ortalama yaşam süresi başlangıç yaşından itibaren 8.1 yıl olarak bildirilmesine rağmen çoğunlukla 4-10 yıl içinde aspirasyon, pnömoni gibi sekonder hastalıklar nedeniyle öldükleri bildirilmiştir⁹⁵ .

2.1.3.ALZHEIMER HASTALIĞININ PATOLOJİK ÖZELLİKLERİ:

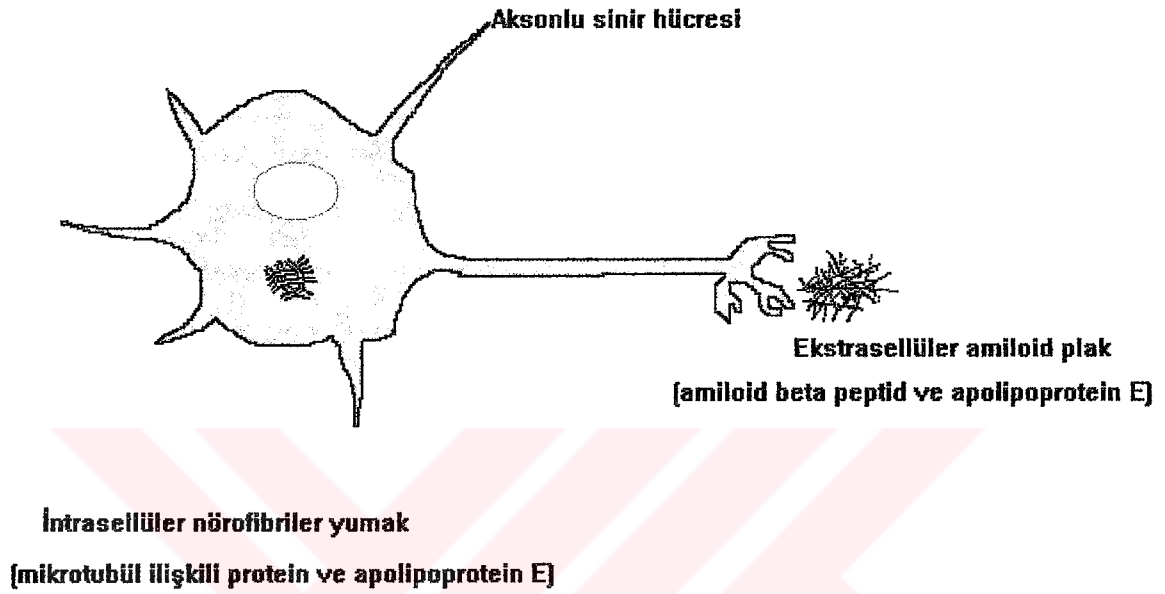
Alzheimer hastalığının başlıca patolojik özellikleri nöron kaybı ile oluşan beyin atrofisi, intrasellüler nörofibriler yumaklar, ekstrasellüler senil plaklar ve serebrovasküler amiloidler olarak bilinmektedir. ^{7,10, 36, 81,95,114}

Hücre kaybının, özellikle korteksin en dip tabakasında gözleendiği, büyük nöronları kapsadığı, genç hastalarda hastalık için tanı kriteri olarak kullanılabilirken ilerleyen yaşlarda bunun mümkün olmadığı gösterilmiştir ^{7,10,36}.

Nörofibriler yumaklar ise nöron sitoplazması içinde yoğun, bükümlenmiş, birbirine sarılmış nörotubulilerin oluşturduğu bir görünümdür^{36,95} (Şekil 1). Nörofibriler yumaklar özellikle allokorteks ve tempoparietal neokortekste yoğundur. Ancak bu özelliklerin sadece Alzheimer hastalığına özgü olmadığı, ayrıca Prion hastalığı, Kuff hastalığı, progresif supranuklear palsy, postensefalitik Parkinson Hastalığında, Guamlardaki Parkinsona benzer demansta ve Down Sendromunda da gözleendiği bildirilmiştir ^{33,36}.

Ayrıca Alzheimer hastalığında nörofibriler yumaklarda, β -tubuline bağlanarak mikrotubullerin stabilizasyonunu sağlayan "**tau**"⁹⁴ ve hücrelerdeki protein moleküllerinin degradasyonunda görev alan ubiquitin adlı proteinlerin bulunduğu bildirilmiştir ^{7,10}.

Çiftleşmiş helikal filamentler, tau proteininin aşırı derecede fosforilize olmasıyla meydana gelirler ve bünyelerinde MAP2 (Microtubul Associated Protein) ubiquitin ve amiloid beta peptid antijenlerini içerirler⁹⁴. Çiftleşmiş helikal filamentler senil plakların diğer bir şekli olan distrofik nöritlerde ve gri maddedeki aksonlarda da bulunmaktadır³⁶.



Şekil 1: Alzheimer Hastalığının nöropatolojik lezyonları⁵⁸

Senil (neuritik) plaklar, ortası amiloid amorf materyelle dolu, 20 ile 200 μm çapındaki oluşumlardır^{36,95}. Senil plakların etrafında nöronal ve glial hücre uzantıları, mitokondriler, reaktif astrositler, lipofuksin granülleri de yoğun olarak bulunur. Senil plak içinde amiloidden başka apolipoprotein E, immunglobulin G, $\alpha 1$ antikimotripsin, Amiloid Prekürsör Proteini (APP), çeşitli komplement proteinleri,

glikozaminoglikanların bulunduđu⁵⁶ ve merkezinde aluminoslikatların biriktiği gösterilmiştir^{12,21,41}. Beta amiloid, normalde artan yaşla birlikte serebral ve leptomeningeal damarlarda bulunmasına rağmen miktarı Alzheimer hastalığında oldukça artmaktadır^{33,36,95,109}. Plakların ve nörofibriler demetlerin sayısı ile hastalığın derecesi arasında bir orantı olduğu, fakat bu oluşumların demansın yokluğu da gözlendiği bildirilmiřtir¹¹⁸.

Granüllü vakuolar dejenerasyon, 4-5 nm çapında, berrak, dairesel sitoplazmik halkalardan oluřmakta⁹⁵ ve argrofilik granüller içermektedirler. Özellikle hipokampusta nörofibriler demetlerle birlikte yer aldıkları gösterilmiřtir³⁶. Hirano cisimcikleri ve eozinofilik inkluzyonlar ise, Alzheimer hastalığında başlıca hipokampusun piramidal tabakalarında bulunurlar^{36,95}.

Biyokimyasal olarak yapılan çalışmalarda ise Alzheimer olgularında akut faz proteinin, hematolojik, biyokimyasal ve immünolojik ölçümlerin normal olduğu saptanmıştır. Serebrospinal basınç, hücre sayısı, protein ve şeker düzeylerinin normal sınırlar içinde olduğu, beyin omurilik sıvısında (**BOS**), nörotransmitterlerin, aminoasitlerin ve eser elementlerin düzeylerinin ise tanıya esas olacak seviyeye ulaşmadığı bildirilmiştir. BOS'taki ubiquitin ve tau düzeylerinin Alzheimer hastalığında azaldığı gösterilmiş ancak diğer nörodejeneratif olgularda da benzer seviyede olduğundan dikkate değer olmadığı ileri sürülmüştür. BOS'taki APP derişiminin, serumdaki amiloid P komponenti ve nöronal lif protein düzeylerinin Alzheimer hastalığında kontrollere oranla azaldığı gösterilmiřtir⁹⁵.

2.1.4. ALZHEIMER HASTALIĞININ GELİŞİMİNDE ETKİLİ FAKTÖRLER:

Aile hikayesi hastalığın başlamasında başlıca risk faktörüdür^{17,52}. Diğer risk faktörleri ise kromozomal mutasyonlar^{35,37,105,122}, trizomi 21^{6,35}, apolipoprotein ε4 allelinin varlığı^{1,4,25,71,74,78,80,91,96,101,102,119} gibi genetik faktörler; kafa travması^{48,63,71,93}, depresyon, tiroid hastalığı⁵⁰, miyokard enfarktüsü^{5,52} hikayesi ve alüminyum^{12,21,41,50} olarak sayılabilir. Koruyucu faktörlerin ise sigara içimi¹⁸, eğitim^{71,126} ve apolipoprotein ε2 allelinin kalıtımı^{11,90,113,121} olduğunu gösteren çalışmalar ise güncelliğini korumaktadır.

Alüminyum: Alzheimer hastalığı tanısı konmuş bireylerde yapılan otopsi çalışmalarında beyinde alüminyumun düzeyinin artmış olduğu saptanmıştır. Bunun en önemli kanıtı ise senil plakların merkezinde ve nörofibriler yumakları oluşturan nöronların içinde alüminyum silikatların gösterilmesidir^{12,21,50}. Beyinde alüminyumun birikimi, ölen nöronların toplanmasına bağlı olabileceği gibi hastalığın seyri sırasında kan-beyin bariyerinin bozulmasından da kaynaklanabileceği savı çeşitli araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir. Yapılan çalışmalarda alüminyum düzeylerinin yüksek olduğu çevrelerde yaşayanlarda Alzheimer hastalığının sıklığında herhangi bir artış saptanmamıştır. Ayrıca diyalizat sıvısındaki alüminyum içeriği nedeniyle alüminyum düzeyleri normalden 12 kat daha yüksek olan kronik diyaliz hastalarında da Alzheimer hastalığına ilişkin değişiklikler tespit edilmemiştir⁴¹.

Aluminyum iyonlarının nötrofilde serbest radikal yenilenmesini ve demir bağlantılı peroksidatif hasarı arttırmak suretiyle, serbest radikal reaksiyonlarına katkıda bulunabileceği görüşü ileri sürülmektedir. Alzheimer hastalığında oksidatif stresin etkisini gösteren indirekt kanıtlar arasında; beyin glukoz 6 fosfat dehidrojenaz, eritrosit glutatyon peroksidaz aktivitelerinin artması ile alfa tokoferol ve A vitamini gibi antioksidan moleküllerin plazma düzeylerinin azalması bulunmaktadır. Ayrıca reaktif mikrogliya hücrelerinin kronik bir şekilde uyarılması sonucu fazla miktarda reaktif oksijen metabolitlerinin meydana geldiği de gösterilmiştir ³³. Aliminyumun aşırı derecede alınmasının Alzheimer hastalığına neden olması mümkün görünmemekle birlikte bu hastalıktaki rolünü ispatlamaya çalışan araştırmalar halen devam etmektedir ^{12,21,41,50}.

Down Sendromu: Down sendromlu hastaların beyinlerinde 35 yaşından sonra Alzheimer hastalığına benzer lezyonların gelişmesinden hareket edilerek, 21. kromozom hastalığın etyopatogenezesinden sorumlu tutulmuştur⁶. Bu kromozomun uzun kolu üzerinde erken başlangıçlı ailesel Alzheimer hastalığı ile ilişkili olduğu ileri sürülen bir gen bölgesinin varlığı ileri sürülmektedir. Ancak Alzheimer hastalığının ne erken başlangıçlı, ne geç başlangıçlı ailesel , ne de sporadik formlarının tümünde bu gen bölgesi ile ilgili bir etkileşim saptanamadığından 21 trizomisi ve Alzheimer hastalığı arasındaki ilişki hala tam olarak açıklanamamıştır ^{35,50,107}.

Mutasyonlar: Alzheimer hastalığının genetik mekanizması henüz tam olarak açıklığa kavuşmamış bir konudur. Hastalığın sorumlusu olarak birçok genden şüphelenilmekte ve en az üç mutasyon lokusu ileri sürülmektedir. Bunlar 21. kromozomda amiloid prekürsör proteininde³⁷, 14. kromozomda PS-1¹⁰⁶ ve 1. kromozomda PS-2⁹³ olarak tanımlanmıştır .

Bu genlerden ilk olarak tanımlananı 21. kromozomdaki **Amiloid Prekürsör Protein** (APP) genidir. Bu gendeki mutasyonun erken başlangıçlı otozomal dominant Alzheimer hastalığına neden olabileceği görüşü ileri sürülmektedir ^{37,39,50,107,108}. APP geninin 19 ekzondan oluştuğu , 16 ve 17. ekzonların bir parçasında, senil plakların önemli bir içeriği olan amiloid β proteinini (**A β protein**) kodladığı gösterilmiştir ^{39,95,107,108,122}. APP geninde oluşan bir mutasyon A β proteininin, senil plaklarda ve serebrovasküler damarlarda amiloid birikimler şeklinde yığılmasına neden olduğu bildirilmiştir. Yapılan araştırmalarda değişik aile gruplarında APP geninde birbirinden farklı birçok mutasyonun hastalığın gelişiminden sorumlu olduğu savı ileri sürülmüştür ^{95,105,107,108,122} (Tablo I). Son çalışmalarda ise 21. kromozomda APP'den başka Ailesel Alzheimer hastalığından sorumlu ikinci bir lokusun varlığı da tartışılmaktadır ^{107,108}.

Birçok erken başlangıçlı ailesel Alzheimer hastalığı olan ailelerde, APP mutasyonu görülmeksizin hastalığın otozomal dominant olarak 14. kromozomdaki bir lokusla kalıtıldığı da ileri sürülmektedir^{106,108}.

Volga-German aileleri (Rusya'nın Volga nehri civarından Amerika'ya göç etmiş Alman aileleri) ailesel Alzheimer hastalığında özel bir yer tutmaktadırlar.

Nitekim bu ailelerde hastalığın 1. kromozomdaki bir lokusla ilgili olduğu, ne APP mutasyonu ne de 14. kromozomla ilişkili olmadığı görüşü ileri sürülmektedir^{55,108}.

Alzheimer hastalığındaki genetik heterojeniteden sorumlu olduğu düşünülen genler Tablo I'de özetlenmiştir⁹⁵.

Tablo I: Ailesel Alzheimer Hastalığı'nda Moleküler genetik heterojenite:

Kromozom 1 ilişkili (STM-2, presenilin 2 geni)	Volga German ailelerinde Erken başlangıç (yaklaşık 50 yaş)
Kromozom 14 ilişkili (S-182, presenilin 1 geni)	Erken başlangıç (yaklaşık 40 yaş)
Kromozom 21 ilişkili APP Mutasyonları APP 670/671 _{lys-met} _{asn-leu} APP 717 _{val-ile} APP 717 _{val-gly} APP 717 _{val-phe}	Erken başlangıç (yaklaşık 50 yaş)
Apolipoprotein E4 genotipi	Geç başlangıç
Apolipoprotein E4 ile ilişkili olmayan	Geç başlangıç

2.1.5. PARKINSON HASTALIĞI:

İlk olarak James Parkinson tarafından 1817'de tarif edilmiştir. Genellikle substantiya nigra ve globus palidusun yaygın harabiyeti sonucu gelişmektedir. Hastalığın karakteristik özellikleri vücutta yaygın yada belirli alanlardaki **rijidite**, istirahat sırasında **tremor**, hareketleri başlatma yeteneğinin kaybı olan **akinezi**'dir^{10,36,95}. Hastalığın kesin sebebi bilinmemekle birlikte putamen ve nukleus kaudatusta nigrostriyal traktusun sinir uçlarından dopamin sekresyonunun kaybı ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir. Parkinson hastalarında heyecan belirtisi bulunmaz ve yüz maskeye benzer. Kas sertliği yüzünden hasta ileri doğru eğilmiş durumda bulunur ve hareketleri kesiklidir^{36,95}. Parkinson hastalarına verilen L-dopa hastaların yaklaşık üçte ikisinde belirtilerin birçoğunu özellikle rijidite ve akineziyi iyileştirir. Bunun nedeninin nukleus kaudatus ve putamendeki nigrostriyal liflerin salgıladığı dopaminin L-dopa derivativesi olmasından kaynaklandığı gösterilmiştir. Hastalara verilen L-dopanın haraplanan nöronlar tarafından artık salgılanamayan dopaminin yerini tuttuğu ileri sürülmektedir. Günümüzde hastalığın tedavisi için birtakım cerrahi yöntemler geliştirilse de halen kesin tedavisi bulunmamaktadır^{10,36}.

2.2. APOLİPOPROTEİN E

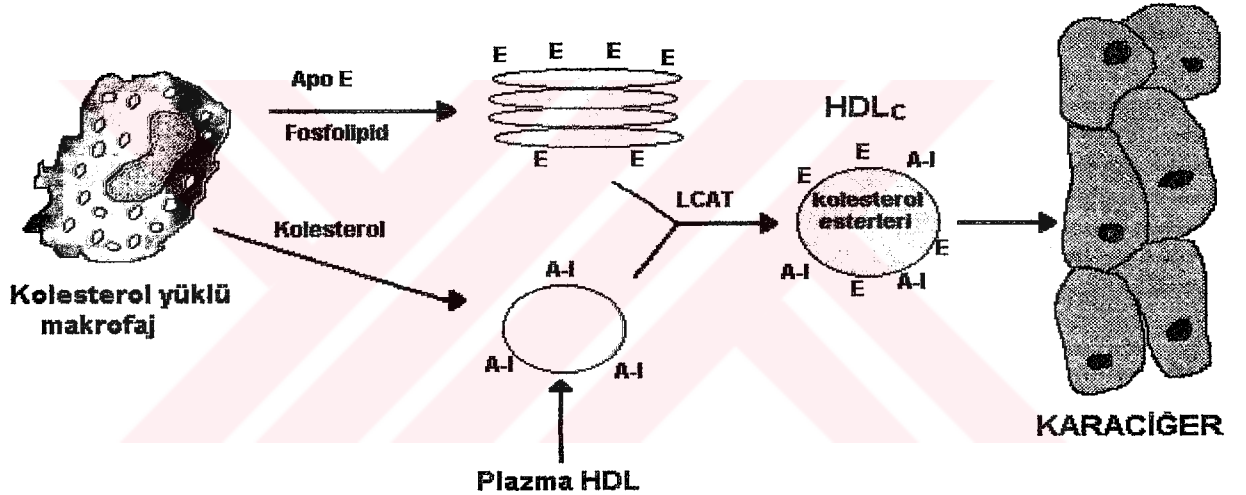
2.2.1.APOLİPOPROTEİN E’NİN TANIMI:

Apolipoprotein E (apo E), 299 amino asitten oluşan, molekül ağırlığı 34.000 dalton olan ve kolesterol, trigliserid metabolizmasında önemli rol oynayan bir plazma proteindir⁶⁰.

Apo E geni 19. kromozomda yer almakta, apo-CI ve apo-CII’nin içinde olduğu gen topluluğunun bir parçasını oluşturmaktadır. Apo E geni 3.6 kilobaz uzunluğundadır ve dört ekson ile üç introndan meydana gelmektedir. Apo E’nin 1163 nukleotidden oluşan bir mRNA’yı sentezlettirdiği ve oluşan primer translasyon ürününün 317 amino asit içerirken, plazmaya salınan olgunlaşmış proteinin 299 amino asit içerdiği gösterilmiştir⁷⁷. Genetik olarak saptanan, apo E2, apo E3 ve apo E4 adı verilen başlıca üç şekli mevcuttur. Bunların $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$ olarak tanımlanan üç gen çifti tarafından üretildiği , üç homozigot (E2/2, E3/3 ve E4/4) ve üç heterozigot (E2/3, E2/4 ve E3/4) fenotipi bulunduğu bildirilmiştir. En yaygın fenotip E3/3, en yaygın allel $\epsilon 3$ olup, apo E2 ile E3 arasındaki farkın 158. bölgede argininin yerine sisteinin geçmesinden kaynaklandığı açıklanmıştır^{57,60}. Bunun yanında E4 ile E3 arasındaki farkın ise 112. bölgede sisteinin yerine argininin geçmesiyle oluştuğu bildirilmiştir. Apo E’nin hücre yüzeyindeki özel reseptörler aracılığıyla kolesterol, trigliserid ve fosfolipid içeren lipoprotein partiküllerinin tanınması ve hücre içine alınmasını sağladığı kanıtlanmıştır^{44,60}.

2.2.2. APOLİPOPROTEİN E'NİN SENTEZ YERLERİ:

Apo E'nin başlıca sentez yeri karaciğerdir. Plazmadaki apo E'nin %75'inden fazlası karaciğerdeki hepatositler tarafından çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL)'in bir yapıtaşı olarak sentezlenmektedir. Apo E'nin VLDL'den bağımsız olarak fosfolipid içeren yaklaşık 1.08 g/ml yoğunlukta yüzen diskoidal partiküller şeklinde de karaciğer hücrelerinden salındığı bildirilmiştir⁶⁰ (Şekil 2).



Şekil 2. Apo E 'nin karaciğer,HDL-kolesterol, makrofaj, fosfolipid disklerindeki yerleşimi¹¹⁰.

İnsanda, maymunda, farede , Gunea domuzunda adrenal ve böbrekleri kapsayan bazı periferel dokularda da düşük seviyede apo E sentezlenebileceği gösterilmiştir²⁸. Makrofajların özellikle kolesterolle yüklü olduklarında, apo E'nin intertisyel sıvıdaki başlıca sentez bölgesi haline geldikleri ^{8,9,125}, ayrıca arterlerin düz kas hücrelerinden ve derideki keratinositlerden de sentezlendiği bildirilmiştir²⁸.

Apo E mRNA'sının karaciğerden sonra en yüksek seviyede beyinde bulunduğu gösterilmiştir^{14,28,60}. Apo E ekstrasellüler boşlukta ya serbest yada bir proteine bağlı olarak bulunmaktadır. Ayrıca bazı nöronlarda hem sitoplazmik aralıkta hem de endozom, lizozom ve peroksizomların intraveziküler aralıklarında bulunmaktadır. Bu değişik yerleşim bölgeleri apo E'nin Alzheimer hastalığı dışında da bir çok değişik metabolik olayda rol oynadığını kanıtlamaktadır ^{46,102,111,118}.

Elshourbagy ve arkadaşları²⁸, beyindeki apo EmRNA'sının karaciğerdeki ile aynı büyüklükte olduğunu ve apo EmRNA ürününün hücreden bağımsız olarak translasyona uğradığını tespit etmişlerdir²⁸. Bu bulgular apo E geninin her haploid genomda sadece bir kopyası olduğunu⁴⁴ beyin apo E'sinin karaciğer tarafından üretilen apo E ile aynı gen ürünü olduğunu ve karaciğer apo E'si gibi sekretuar bir protein olduğunu göstermektedir¹⁴.

Kültürde yapılan çalışmalarda makrofaj ve monositlerin de apo E üretip salgıladıkları gösterilmiştir^{8,9,125}. Beyinde az sayıda, küçük ve pasif şekilde bulunan monositik orijinli hücrelerin ve mikrogliya olarak isimlendirilen makrofaj benzeri karakter gösteren hücrelerin yaralanma ve diğer patolojik stimülasyonların

sonucunda normal makrofajlara benzeyerek beyindeki apo EmRNA'sının yüksek miktarlarının kaynağı haline geldikleri ileri sürülmektedir¹⁴.

Santral sinir sisteminde apo E'nin astrositik gliada yoğun bir şekilde bulunduğu gösterilmiştir^{28,14,118}. Ak maddenin fibröz astrositleri ve gri maddenin protoplazmik astrositlerin yanısıra özelleşmiş astrositik hücreler de (serebellumun Bergmann gliası, üçüncü ventrikülün tanisitleri, pituisitler ve retinanın Müller hücreleri) apoE yönünden zengindir. Oligodendroglia, nöronlar, mikroglialar, ependimal hücreler, koroid pleksus hücreleri ve araknoidin dural yüzey hücrelerinde apo E'nin varlığı gösterilmiştir. Ayrıca periferik sinir sisteminde nöron hücre cisimcikleri ile ilişkili glia hücreleri ve miyelinleşmemiş Schwann hücreleri de apo E içermektedirler^{14,15,118}.

Önceleri Apo E mRNA'sının nöronlarda bulunmadığı, sadece glial hücrelerde olduğu ileri sürülmekteydi. Ancak günümüzde immünohistolojik yöntemlerle yapılan analizlerde, apo E'nin Alzheimer hastalığı ve diğer dejeneratif hastalıklarda bazı nöronlarda bulunduğu gösterilmiştir^{40,46,93,102,119}. Apo E'nin ayrıca nöron sitoplazmasında da bulunduğu ve gliadan nöronlara transferinin intranöronal dağılımındaki kadar iyi olduğu görüşü ileri sürülmektedir⁹³.

2.2.3. APOLİPOPROTEİN E'NİN BEYİNDEKİ METABOLİZMASI :

Apo E'nin beyindeki metabolizması günümüzdeki çalışmaların ilgi odağı olmuştur^{14,15,44,93,94,109}. Apo E beyin omurilik sıvısının düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüne bağlanan tek apoproteinidir. Çünkü ne apo B nede apo AI/CIII beyinde sentez edilmemektedir^{15,28}. Apo E'nin sinir dokusunda kolesterol ve lipidleri taşıma görevinden başka, yapısal bir protein, nörotransmitter veya nörohormon prekürsörü gibi davranarak alternatif görevler üstlendiği de düşünülmektedir¹⁴.

Apo E sinir sisteminin gelişiminde, yaralanmasında veya rejenerasyonunda başlıca iki rolü üstlenmektedir. Birincisi, apo E dejenere olmuş aksondan kalan parçaları beyinden uzaklaştırır, ikincisi ise nonnöronal dokularda lipidlerin mobilizasyonuna yardım ederken kolesterolün periferik dokudan santral vasküler havuza taşınımına aracılık eder^{60,115}. Apo E'nin sinir büyümesinde reseptör aracılı endositoz ile gerekli lipidlerin sağlanmasında da görev aldığı bilinmektedir¹¹⁵.

Serebrospinal sıvıda apo E içeren lipoproteinlerin varlığı, apo E'nin lipid veya lipide çözünen bileşiklerin sinir sistemi hücrelerinin içine ve dışına taşınmasına veya hücreler arasında yeniden dağılımına katıldığını göstermektedir. Lipoprotein partikülleri kolesterolün beyinden plazmaya atılımında da aktiftirler. Kolesterol içeren lipoprotein partiküllerinin serebrospinal sıvı yoluyla araknoid granülasyonlar ve derin limfatiklerden geçerek beyinden ayrıldığı gösterilmiştir¹⁴.

Apo E'nin sinir sitemindeki görevlerini açıklamak amacıyla oluşturulan siyatik sinir yaralanma modelinde, hasar sonrası apo E üretiminin 250-350 kat arttığı gösterilmiştir^{15,43,60,112,115}. Apo E'nin hasar tamirindeki başlıca görevi, yaralanma sonrası kolesterolü mobilize eden bir lipid transport proteini olarak rol almasıdır. Kolesterol esterlerini içeren 0.5-2.0 µm'lik lipid damlacıkları hasarlı sinirin distal ucundaki birçok hücrede özellikle de makrofaj ve Schwann hücrelerinde birikirler^{44,112}. Bu sırada bazı lipid yüklü hücreler (muhtemelen makrofajlar) hasar bölgesinden ayrılırken, esterleşmiş lipid içeren birçok hücrelerin (bu lipidler rejenere olan aksonun remiyelinizasyonu boyunca yeniden kullanılabilirler) de sinirin kesilmiş ucunda kaldığı gösterilmiştir⁴⁴.

Yaralanma sonrası akson ölümünü takiben Schwann hücreleri myelin ve artıklarını reabsorbe eder. Monosit türevli makrofajlar ise hasarlı bölgenin distal ucunda büyük miktarlarda apo E sentezlerler^{14,44}. Birinci hafta içinde akson rejenere olur ve bölgede LDL reseptörünün miktarı artar. Akson rejenerasyonunu takiben apo E ve apo A1 hasar bölgesinin ucunda yığılmaya, makrofajlar ise hızla kolesterolle yüklenmeye başlarlar. Yaralanmanın ikinci ve üçüncü haftasında remiyelinizasyon başladığında Schwann hücreleri kolesterol depolarını boşaltırken artan LDL reseptörlerini de açığa çıkarırlar. Rejenerasyonun bu safhasında apo E'nin ekstrasellüler proteinlerin yaklaşık %2-3'ünü oluşturacak şekilde 2 yada 3 katına çıktığı¹¹⁵ ve apo A1 ile birlikte ekstrasellüler matrikste kolesterolden zengin lipoproteinlerin bir parçası olarak işlev gördüğü bildirilmiştir^{14,15,44}. Apo E partiküllerinin membran sentezi ve remiyelinizasyonu için kolesterol kaynağı olan LDL reseptörleri ve apo A1 ile bağlandıkları da gösterilmiştir^{15,43,44}.

Sonuç olarak apo E4 alleli ile ilişkili Alzheimer hastalığında apo E'nin öneminin, yaralanmadan sonra sinaptogenez için bir lipid transport proteini olarak görev almasından kaynaklandığı görüşü çeşitli araştırmacılar tarafından kabul edilmektedir^{14,15, 43,44, 107,115}.

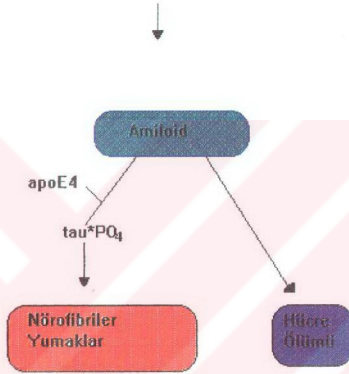
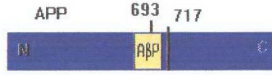
2.2.4. APOLİPOPROTEİN E'NİN İZOFORMA ÖZGÜ ETKİLERİ:

Apo E allelelerinin hastalığın gelişimindeki rolü henüz tam olarak açıklığa kavuşmamasına rağmen, ortaya atılan hipotezlerin birçoğu apo E'nin izoforma özgü etkilerini içermektedir. İzoforma özgü etkileşim, apo E'nin düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörü¹⁵, A β peptidi^{119,120}, mikrotübül bağımlı protein tau ve MAP2c¹¹⁷ ile bağlanmasını kapsayan bir tanımlamadır.

Apo E mRNA'sının sinir hücrelerinde eksprese edilmediği fakat içerdikleri LDL-ilişkili protein (LRP) aracılığı ile her üç apo E izoformunu bağlayabildikleri gösterilmiştir¹⁵. Apo E3 ve E4'ün, LDL reseptörüne (LDL-r) apo E2'den daha yüksek bir afinite ile bağlandığı⁹⁰, apo E2'nin , LRP'ye E3 ve E4'ten yaklaşık olarak %40 daha etkili bir şekilde, LDL-r'ye ise %1-2 oranında bağlandığı açıklanmıştır¹¹⁷. Buna bağlı olarak apo E'nin lipidlerle kompleks yapmış bir şekilde, LRP reseptörlerine bağlanarak endositoz yoluyla sinir hücrelerine girdiği ve oluşan endozomların daha sonra mikrotubüller aracılığı ile hücre gövdesine taşındıkları görüşü ileri sürülmüştür⁹⁰. Alzheimer hastalığında hücre ölümünün artışı takiben meydana gelen sinapsislerdeki geri çekilmenin, LRP'nin up-

regölasyonuna neden olduğu düşünölmektedir. Herhangi bir nedenle apo E'nin LRP ile bağlanmasının onun senil plaklardaki ölü nöritlerde birikmesine yol açtığı gösterilmiştir^{90,101}.

Apo E izoformları költüre edilmiş nöronlarda nörit uzamasını farklı şekillerde etkilemektedirler⁷³. Apo E'nin mikrotüböl bağımlı protein tau ve MAP-2 ile izoforma özgül etkileşimi, deneysel olarak kanıtlanabilen hipotezlere dayanmaktadır. Mikrotüböl bağımlı protein; nöronun sitoplazması , aksonu ve dendritlerindeki mikrotubullerin oluşumu ve devamına yardım etmektedir. İn vitro çalışmalarda apo E2 ve apo E3'ün tau ve MAP2c'nin mikrotüböl bağlama bölgesine bağlandığı ancak apo E4'ün bağlanmadığı gösterilmiştir^{90,93,117}. Apo E3 ve/veya E2'nin tau proteiniyle bağlanmasının koruyucu bir rol oynadığı düşünölmektedir. Bu birleşimin, tau fosforilasyonunun hızını azaltarak çiftleşmiş helikal filamentlerin oluşumunu azalttığı veya mikrotubul stabilizasyonunu kolaylaştırdığı düşünölmektedir⁹⁰(Şekil 3). Bu hipoteze göre apo E2 veya E3 allelini taşımayan E4/4 bireylerde çiftleşmiş helikal filamentlerin oluşumunun hızlandığı ve nöron ömrünün kısaldığı belirtilmiştir. Bunun sonucunda hafıza kaybının başladığı , beyin kütlelerinin azaldığı ve hastalığın erken yaşta oluştuğı gösterilmiştir⁹⁰.



Şekil 3: Amiloid ve nörofibriler yumakların oluşum mekanizması³⁹

Birçok çalışmada apo E4'ün amiloid β proteine apo E3'ten daha büyük ilgi ile bağlandığı gösterilmesine rağmen^{100,120}, Richey ve arkadaşları⁸⁵ apo E izoformları arasında bağlanma özelliği bakımından önemli bir fark olmadığı görüşünü ileri sürmüşlerdir. Bu bağlanma sonucu çiftleşmiş helikal filamentlerin

oluşumunda artış, normal taşınma fonksiyonunda kayıp, sinapsislerde azalma, nöronlarda ölüm, hasta hücrelerde nörofibriler yumakların ve distal dendritik atrofi alanlarında nöritik plakların oluşumunun geliştiği gösterilmiştir^{100,117,118}. Ancak bu olay Alzheimer hastalığında *invivo* olarak henüz saptanamamıştır¹⁰⁷.

Bir diğer hipotezde, apo E'nin A β ile etkileştiğini ve ona moleküler bir koruyucu olarak eşlik ederek amiloid oluşumunu arttırdığı ileri sürülmüştür¹⁰⁷. *In vitro* deneyler apo E'nin izoforma özgü etkiyle A β 'ya bağlandığını ve bu bağlanmada apo E4'ün E3'ten daha hızlı olduğunu^{100,119,120}, fakat apo E4'ün nörofibriler yumakların ana bileşiği olan tau proteinine bağlanamazken, apo E3'ün kuvvetli bir biçimde bağlanabildiğini göstermişlerdir⁷³.

Ayrıca Apo E'nin izoforma özgü bir mekanizma ile nöronal uzamayı uyardığı gösterilmiştir. Dorsal root nöron ganglion kültürleri ile yapılan deneylerde β VLDL varlığında (ne apo E3 ne de apo E4, β VLDL olmaksızın tek başlarına nöritlere etki edemezler) apo E3'ün nörit büyüme ve uzamasını uyardığı, oysa E4'ün hem büyümeyi hem de dallanmayı inhibe ettiği bildirilmiştir⁷³. Ayrıca apo E'nin spinal kord ve kortikal nöronlara etkilerini göstermek amacıyla fare ve murin santral sinir sisteminden türetilen murin nöroblastoma hücrelerinde yapılan deneylerde bu sonuçları desteklemiştir⁹⁴. Ortama β VLDL olmaksızın serbest apo E3 ve E4 eklendiğinde de nörit büyümesinde herhangi bir değişiklik saptanamamıştır⁹⁴. Bu sonuçlar apo E'nin nöronlar üzerinde etki gösterebilmesi için lipoprotein reseptör aracılı alınımına yada bir lipid kaynağı ile birleşmesine gerek duyduğunu göstermektedir. Lipidle bağlanmamış apo E ne LDL reseptörüne ne de LDL reseptörü ile ilişkili proteine bağlanamamaktadır⁹⁴.

Yine kültürde immunfloresans yöntemleri ile yapılan deneylerde, apo E3' n hücre içinde çekirdek etrafında ve nöritlerde biriktiği, direkt veya indirekt olarak hücre iskeletinin aktivitesini düzenlediği gösterilmiş ve bunun sonucunda nörit uzamasını kolaylaştırdığı g r    ileri s r lm   t r. Apo E4' n ise nöron içinde değil daha çok hücre yüzeyinde yerleşmesi sonucu nörit uzamasında herhangi bir etki göstermediği, daha çok iskeletin ve muhtemelen mikrotubullerin destabilizasyonundan sorumlu olduğu görüşüne varılmı tır⁹⁴.

Ma ve arkada ları⁵⁶, apo E-A  etkileşimini ölçmek için amiloid fibril oluşumunu elektron mikroskopunda g zlemlemi ler ve apo-E4' n fibril oluşumunu apo E3'e kıyasla daha çok arttırdığını belirtmişlerdir. Evans ve arkada ları³¹, apo E'nin fibril oluşumunu ilk kademedede inhibe etmesine rağmen büyümelerinde herhangi bir etkisi olmadığı görüşünü ileri s rm   lerdir. Strittmatter ve arkada ları¹¹⁹ ise invitro şartlarda serebrospinal sıvıda apo E'nin  A4 peptidine çok büyük bir ilgi ile bağlandığını ve geç başlangıçlı ailesel Alzheimer hastalığında apo-E  4 allelinin frekansının arttığını göstermişlerdir. Bu bilgilerin ışığı altında, invitro şartlarda apo E'nin A  proteine bağlandığı çok açıktır, ancak bu etkileşim henüz invivo olarak g sterilememi tir^{56,100,107,119}.

2.2.5. APOLİPOPROTEİN E’NİN ALZHEIMER HASTALIĞININ PATOLOJİSİNDEKİ ROLÜ:

Apo E bunamayla sonuçlanan birçok hastalığın patogenezi ve hücrel cevabından sorumlu tutulabilecek tek proteindir¹¹⁹. Apo E Alzheimer hastalığında nörofibriler yumakların başlıca protein bileşeni olan tau aracılığı ile yumaklara, senil plakların başlıca protein bileşeni olan amiloid β aracılığı ile senil plaklara kolayca bağlanmakta ve miktarlarının artmasına neden olmaktadır^{56,85,91,100,119}. İn vitro deneylerde apo E3’ün tersine apo E4’ün amiloid β peptidi ile oldukça stabil bir kompleks oluşturduğu gösterilmiştir^{100,119,120}.

Apo E’nin kongofilik anjiopati bölgelerinde, Creutzfeld-Jacop hastalığı ve scrapie gibi yavaş virüs enfeksiyonlarında da amiloid plaklarda bulunduğu gösterilmiştir^{119,123}.

Amiloid β peptid (A β) immünreaktif plaklarının çapı, sayısı ve yoğunluğunun hastanın apo E genotipi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir^{109,120}. İki apoE4 alleli taşıyan olgudaki A β immünreaktif plakların Apo E3/3 homozigot bireylere göre daha büyük ve daha yoğun olduğu bildirilmiştir.

2.2.6. APOLİPOPROTEİN E ve ALZHEIMER HASTALIĞI:

Alzheimer hastalığı ile apo E ϵ 4 alleli arasındaki ilk ilişki 1993 yılında Stttritmatter ve arkadaşları tarafından rapor edilmiştir¹¹⁹. Pek çok toplumda apo E allellerinin hastalığın dozuna ve başlangıç yaşına olan etkileri araştırılmış ve halen araştırılmaya devam edilmektedir.

Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda otopsi ile sporadik Alzheimer hastası olduğu gösterilen olguların yaklaşık %64'ünün bir ϵ 4 alleli taşıdığı saptanmıştır¹⁰¹. Ayrıca ϵ 4 allelinin Alzheimer hastalığının hem geç başlangıçlı ailesel, hem de sporadik şekilleri ile bağlantılı olduğu ve ϵ 4'ün gen dozunun hastalık için büyük bir risk oluşturduğu birçok çalışmada gösterilmiştir^{19,25,38,75,79,82,91,96,101,102,119}. Japonya gibi apo ϵ 4 allelinin normal popülasyondaki frekansının düşük olduğu toplumlarda bile, Alzheimer hastalığında görülen artış dikkati çekmektedir⁷⁵. Apo ϵ 4 alleli bakımından homozigot olan bireylerde yapılan otopsi çalışmalarında senil plak gelişiminin diğer Alzheimer hastalarına oranla daha fazla olduğu gözlenmiştir¹⁰⁹. Günümüzde yapılan genetik epidemiyolojik çalışmalarda ise Alzheimer hastalığından şüphelenilenlerin yarısından fazlasının apo E lokusu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir⁹³. Corder ve arkadaşları²⁴ tarafından yapılan çalışmada, hastalığın seyri ile apo E genotipi arasındaki bağlantı araştırılmış ve hastalığın seyrinin apo E genotipi ile değil başlangıç yaşı ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür.

İlk araştırmalar sadece başlangıç yaşı 60'tan büyük olan geç başlangıçlı ailelerde yapılmasına rağmen^{25,101,102,119}, son yıllarda başlangıç yaşı 60'tan küçük olan hastalarda da apoE4 allelinin etkili olduğu gösterilmiştir⁹¹.

Apo E4 allellerinden bir yada ikisinin varlığının Alzheimer hastalığına yakalanma riskini yaklaşık üç kat arttırdığı, başlangıç yaşını da doza bağımlı olarak düşürdüğü pek çok araştırmacı tarafından ileri sürülmüştür^{19,25,64}. Buna ek olarak apo E2 allelinin hastalığa yakalanma riskini düşürdüğü ve başlangıç yaşını arttırdığı gösterilmiştir^{11,90,113,121} (apo E4 homozigot bireylerde 70'den az, apo E2/3 bireylerde ise 90 'dan fazla²⁵). Bu bilgiler yaşı Alzheimer hastalığı için bir risk faktörü olduğunu^{84,91} ve apo E'nin spesifik allellerinin kalıtımının Alzheimer hastalığının ekspresyon hızını düzenlediğini düşündürmektedir⁹⁰. Alzheimer hastalarının akrabalarında apo E4 allelinin oranı oldukça arttığı saptanmıştır^{17,52,75}. Bu nedenle aile hikayesi Alzheimer hastalığı için apo E ile ilişkili diğer bir risk faktörüdür.

2.2.7.ALZHEIMER HASTALIĞININ KLİNİK TANISINDA APOLİPOPROTEİN E'NİN YERİ:

Apo E geni Alzheimer hastalığı için günümüze kadar tanımlanmış başlıca şüpheli gendir. Ayrıca toplumda sık olarak rastlanan bir çok hastalıkla da ilişkili olduğu düşünülmektedir⁹⁴. Apo E'nin genotiplemesinin tek başına hastalık riski için geçerli bir veri sayılamayacağı ileri sürülmektedir⁹². Ancak asemptomatik bireylerde riski belirlemek, gelecekte belkide Alzheimer hastalığından etkilenebileceklerini söylemek, önemli bir gelişme olarak kabul edilmektedir^{1,92,93,80}. Ulusal Yaşlanma Enstitüsü ve Alzheimer Araştırma Grubunun konferansında apo E genotiplemesinin tanıda yardımcı olabileceği görüşü ileri sürülmüştür⁷⁴. "Alzheimer hastalığının tanısında apolipoprotein E'nin kullanımı üzerine bir rapor"¹ adlı makalede araştırmacılar apo E'nin tanıda değil sadece bir haberci olarak kullanılabileceğini savını ileri sürmüşlerdir.

2.3. ANJİYOTENSİN KONVERTİNG ENZİM

Koroner kalp hastalıkları günümüzde sanayileşmiş toplumlarda başlıca problemlerden biridir. Hastalığın gelişiminde çevresel faktörlerin yanında birtakım genetik faktörlerin de rol oynadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu faktörler içinde apolipoprotein E allelelerinden başka renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) komponentlerini kodlayan genler de sorumlu tutulmaktadır⁶². Bu sistemin kan basıncı ve elektrolit metabolizmasını düzenlerken, kardiyovasküler gelişimden ve vasküler tonusun devamından sorumlu olduğu bilinmektedir⁶².

ACE renin-anjiyotensin ve kallikrein-kinin sistemlerinin anahtar enzimidir. Akciğerde, endotelial hücrelerde ve plazmada bulunur²⁰. Anjiyotensin I'i hidroliz ederek vazokonstriktör olarak kan basıncının ayarlanmasında görev alan anjiyotensin II'yi oluşturur^{20,62}(Şekil 4). Ayrıca kuvvetli bir vazodilatör olan bradikininin katabolizmasında rol oynar²⁰.

Anjiyotensin II trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), transforming büyüme faktörü (TGF- β) ve fibroblast büyüme faktörlerinin (FGF) ekspresyonunun artmasında rol oynayarak düz kas hücre bölünmesi ve büyümesini uyardığı ve aterogeneizde bu mekanizma ile etki gösterdiği bildirilmiştir¹³. Bununla birlikte akut miyokard infarktüsünü takiben bozulmuş kardiyak şekillenmeye sebep olan miyokardial hücrelerini besleyici etki göstermektedir⁸³. Yapılan çalışmalarda ACE inhibitörlerinin ateroskleroz riskini azalttığına gözlenmesi, ACE veya substratlarının aterom oluşumundaki potansiyel rollerini kanıtlamıştır^{2,13,20}.

ANJİOTENSİNOJEN

Renin

ANJİOTENSİN I

Anjiotensin I Konverting Enzim

ANJİOTENSİN II

Anjiotensin II Reseptörleri

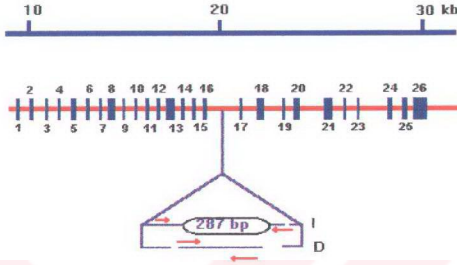
*SODYUM EMİLİMİ
MERKEZİNİN
UYARILMASI*

KAN BASINCI REGÜLASYONU

SUSUZLUK

Şekil 4: Renin-Anjiotensin sisteminin anahtar elementleri²³.

ACE geni 17. kromozomda (17q23) yerleşmiştir ve 16. intronda 287 bp alu tekrar bölgesinde insersiyon/delesyon (I/D) polimorfizmi göstermektedir^{62,116} (Şekil 5).



Şekil 5: Anjiyotensin Konverting Enzim (ACE) Geni D/I Polimorfizmi. Üst çizgi kilobazların skalası, alt çizgi ACE geni 26. ekzonunun yerleşimini göstermektedir¹¹⁰

ACE delesyon polimorfizminin (özellikle standart kriterlere göre düşük risk taşıyan kişilerde) miyokard infarktüsünün gelişiminden ve dolaşımdaki ACE'nin artmış konsantrasyonundan sorumlu olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır^{2,20,22,61,62,72,98}.

İnfarktüs sonrası uygulanacak ACE inhibisyonunun sadece kalp yetmezliğinin ilerlemesini azaltmakla kalmayıp, yeni bir infarktüs gelişimine karşı da koruyucu bir etki oluşturduğu gösterilmiştir ⁶². Yapılan son çalışmalarda DD genotipinin özellikle ani ölümlerde dilate⁸³ ve hipertrofik ⁶¹ kardiyomiyopati ile ilişkili olduğunun gösterilmesi kardiyovasküler hastalıkların oluşumunda ACE bağımlı bir mekanizmanın varlığını muhtemel kılmaktadır. Mattu ve arkadaşlarının⁶² yaptığı çalışmada, genotipe bağlı oluşan etkilerin hipertansiyondan bağımsız gelişimi, kardiyovasküler dokularda (aterom dahil) ACE'nin veya bir substratının direkt etkisi olduğunu düşündürmektedir. Hayvan modellerinde aterosklerozun bir anjiyotensin tip I reseptör antagonisti ile değilse, ACE inhibitörleri tarafından etkili bir şekilde azaldığının saptanması da bu görüşü desteklemektedir.

ACE D ile apo ε 4 allelinin birlikte olduğu olgularda kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riskinin (özellikle restenoz) ve hastalığın ciddiyetinin arttığı gösterilmiştir ^{13,97,103,124}.

3- MATERYAL METOD

3.1. SEÇİLEN ÖRNEKLERİN TANIMI

Bu çalışmadaki örnek grubu İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı tarafından takip edilen 55-93 yaşları arasındaki NINCS-ARDA⁶⁶ kriterlerine göre muhtemel Alzheimer hastalığı teşhisi konulmuş hastalardan oluşmaktadır.

Kontrol grubu normal popülasyonda herhangi bir rahatsızlığı bulunmayan 54-97 yaşları arasındaki kişilerden oluşturulmuştur.

Serum lipid profili (trigliserid, total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol ve VLDL-kolesterol), apolipoprotein (A1 ve B) ve fosfolipid tayinleri için kan örnekleri 16 saat açlık sonrası kuru tüpe alınmış ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Serum örnekleri analizleri yapılana kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Periferik kandan DNA saflaştırılması için steril EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınmış ve en geç bir gün içinde çalışmak üzere oda ısısında saklanmıştır.

3.2. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Agaroz(Promega MBG) ,Amonyum asetat(Sigma A-8920), Amonyum klorür(Sigma A-5666), Asetik asit(Merck K-04134156), Borik asit(Sigma B-6768), Hidroklorik asit (% 37 Merck K-13190114), Brom fenol mavisi(Sigma B-6896), dNTP seti(MBI Fermentas),Dietileter(Merck),EDTA(dihidrat)(Merck K-90602121), Elon(Sigma M-5251),Etanol (%99 Tekel), Etidyum bromür(Sigma E-8751), Hidrojen peroksit(%35 Merck K-22035097),Mineral yağ (Sigma M-5904),Potasyum bikarbonat(Merck K-126223552),Sodyumbisülfat (Sigma S-9631),Sodyum doedasil(lauryl) sulfat(Sigma L-5750), Sodyum hidroksit(Merck C754962),Potasyumdihidrojenfosfat(Merck A-741071), Sodyum klorür(Carlo Erba 368257),Sodyum molibdat(Sigma S-6646), Sülfirik asit(Sigma S-1526),Trizma baz(Sigma T-1503),Taq polimeraz(Promega), Metaphor agaroz(FMC 50182), Xylene cyanol(Sigma X-4126),Ficoll 400(Sigma F-9378), DNA marker(PBR322Mspl, Biolabs303-2S; ΦX174Hae), Proteinaz K (Stratagene300-141),Potasyum hidroksit(Sigma P 1767),Triton X-100(Sigma T9284),Civa klorür(Sigma M 1136),Sodyum azid(Sigma S 2002),Titanyum oksid (Sigma T 8141),Amonyum sülfat (Sigma A 5132),Xylene orange (Sigma X 0127), İzopropanol(Sigma 405-7),Kolesterol standartı(Sigma C-0284),Kolesterol oksidaz (Sigma C 1638), Apo E gen bölgesi için kullanılan primer dizileri: (5' TCG CGG GCC CCG GCC TGG TAC A 3') (5' ATG GAC GAG ACC ATG AAG GAG TTG AAG 3') (Stratagene) ; ACE gen bölgesi için kullanılan primer dizileri: (5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3'), (5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3'), (5' TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAT TAC 3'), (5' TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3') (Prizma)

3.3. KULLANILAN GEREÇLER

Elektroforez için güç kaynağı (Titan plus Helena Laboratories), Hassas terazi (Mettler), Polaroid kamera (DS34 Direct screen instant camera), Isıtıcıli manyetik karıştırıcı (Elektromag), Mikrodalga fırın (Philco), Mikrosantrifüj (TDX), PCR aleti (MJ Research Techne), pH metre (Hanna), Pipet takımı (Brand), Falkon santrifüj (Hereaus), Spektrofotometre (Shimadzu UV-1208), Su banyosu (Elektromag), UV transilluminator (Stratagene UV/White light Transilluminator), Vorteks (Nuve mix), Elektroforez Sistemi (LKB 2013 miniphor electrophoresis, LKB 2012 maxiphor electrophoresis).

3.4. ÇÖZELTİLER

3.4.1.DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler:

1. Eritrosit Parçalama Tamponu

8.74 gram Amonyum klorür, 1 gram Potasyum bikarbonat , 200 µl 0.5 molarlık Etilen diamine tetra asetat (EDTA)'nın tartımları yapılarak erlen içine alındı. 900 mililitre ddH₂O eklendi ve çözeltinin pH'sı bir normal sodyum hidroksit çözeltisi ile 7.4'e ayarlandı. Daha sonra balon joje içine alınarak bir litreye tamamlandı. Çözelti ısıya dayanıklı cam şişelere aktarılarak 120⁰C'de 15 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra +4⁰C'de saklanmıştır.

2. 0.5 M Disodium Etilen Diamin Tetra Asetat (EDTA) (pH:8.0)

186.1 gram Etilen diamin tetra asetat (EDTA) tartılarak beher içine alındı ve 800 ml ddH₂O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözündürüldü ve pH'sı sodyum hidroksid çözeltisi ile 8.0'e ayarlanarak ddH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

3. 4 Molar Sodyum Klorür (NaCl)

233.6 gram Sodyum klorür tartılarak erlene alındı. Üzerine 800 mililitre ddH₂O ilave edildikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi.

4. Lökositleri Parçalama Tamponu

25 mililitre 4 molar sodyum klorür ve 50 mililitre 0,5 molar 50 mililitre Etilen diamin tetra asetat (EDTA) direkt balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra oda ısısında saklandı.

5. 1 Molar Tris tamponu (stok)

121.1 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 42 mikrolitre hidroklorik asit ile yaklaşık 800 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla iyice çözündürüldü. Daha sonra balon jojeye aktarıldı ve 1 litreye

tamamlandı. Çözelti 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra kullanılmıştır.

6. 9,5 Molar Amonyum asetat

73.22 gram amonyum asetat tartılarak beher içine alındı. Üzerine 80 mililitre ddH₂O eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktarıldı ve ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve +4°C'de saklandı.

7. %10'luk Sodyum dodesil sülfat (SDS)

10 gr sodyum dodesil sülfat tartıldı. SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek beher içine alındı ve üzerine 80 mililitre ddH₂O eklendi. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürüldü ve pH'sı 7.2'ye ayarlandı. 0.22 mikronluk filtreden geçirilerek sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

8. Proteinaz K (20 mg/ml)

20 miligram proteinaz K tartılarak steril bir gode içinde steril ddH₂O ile 1 mililitreye tamamlandı. -20 °C'de saklandı.

3.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi'nde Kullanılan Çözeltiler

1. Etidyum Bromür(10 mg/ml)

10 gram etidyum bromür tartılarak steril ddH₂O ile 10 mililitreye tamamlandı.

2. Agaroz Jel Yükleme Tamponu (5x)

20 gram Ficoll 400, 1 gram SDS, 0.2 mililitre 0.5 molarlık Etilen diamin tetra asetat, 1 mililitre 1 molarlık Tris (pH 8.0), 200 miligram Brom fenol blue, 200

miligram Xylen cyanol tartılarak steril ddH₂O ile 100 mililitreye tamamlandı. Oda ısısında saklandı.

3. 50x Tris - Asetik asit - Etilen diamin tetra asetat (TAE) Tamponu

242 gram Tris baz tartılarak bir behere alındı. Üzerine 57,1 mililitre Glasiyal asetik asit ve 100 ml 0,5 molarlık Etilen diamin tetra asetat ve 800 mililitre ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı. 120°C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi ve oda ısısında saklandı.

4. 5x Tris-Borik asit-Etilen diamin tetra asetat (TBE) Tamponu

54 gram Tris baz ve 27,5 gram Borik asit tartılarak beher içine aktarıldı. Üzerine 20 mililitre 0.5 molarlık EDTA (pH'sı 8.0) ve 800 ml ddH₂O ilave edilerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. Çözelti balon jojeye aktararak 1 litreye tamamlandı ve 120 °C'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Hazırlanan çözelti oda ısısında saklandı.

3.4.3. Lipid Profili Tayininde Kullanılan Çözeltiler

1. Etanolik Potasyum Hidroksit Çözeltisi (1 mmol/L)

50 ml triton X-100, 600 ml etanol ile birleştirildikten sonra litresinde 1 mmol olacak şekilde potasyum hidroksit çözeltisi eklenerek balon jodede 1 litreye tamamlandı.

2. 10 mM Tris (hydroxymethyl)aminomethane phosphate Tamponu (pH 7,6)

Litrede 10 mmol olacak şekilde tris tartılarak pH'sı 7,6 oluncaya kadar potasyum dihidrojen orto fosfat (20 mmol/L) ile titre edildi. Daha sonra balon jode 1 litreye tamamlandı.

3. Nötrale Edici Çözelti (A)

16,6 ml hidroklorik asit (1mol/L), 100 ml tris_hydroxymethyl)aminomethyane phosphate (pH 7,6) çözeltisi ile seyreltilerek nötrale edici çözelti hazırlandı (Bu ayıraç her çalışmada taze olarak hazırlandı ve 37°C'de pH'ın 7.5 olup olmadığı kontrol edildi).

4. Okside Edici Çözelti (B)

14 mg merkürük klorür ve 1 gram sodium azid 100 ml saf suda çözülerek okside edici çözelti hazırlanmıştır.

5. Kolesterol Oksidaz Çözeltisi

Mililitre başına 1-5 ünite kolesterol oksidaz içeren fosfat tamponu (0.1 mol/L, pH 7.6)'nın her 1 litresine 20 ml triton X-100 eklenmiştir. Her bir deney için 0,25 ünite enzim kullanılmıştır.

6. Renk Çözeltisi

2,5 ml stok stok titanyum çözeltisi, 3 ml konsantre sülfirik asit ile karıştırıldıktan sonra üzerine 200 ml ddH₂O ilave edildi. Karışım daha sonra balon jode 250 ml'ye tamamlandı. Elde edilen titanyum çözeltisine eşit miktarda Xylene orange çözeltisi ilave edilerek karıştırıldı.

7. Kolesterol Standartının Hazırlanması

İsopropanol içindeki stok kolesterol çözeltisi 200 mg/dl'ye seyreltilerek standart olarak kullanılmıştır.

8. Triglicerid Tayininde Kullanılan Çözelti :

Triglicerid ayırıcı Tris-HCl (50 mmol/L) içinde litre başına 0,1 gram Triton X-100, 1 mmol 4-aminoantipirin, 1,5 mmol sodyum 2-hidroksi-3,5-diklorobenzen sulfonat, 5 mmol Magnezyum klorür, 0,5 mmol Adenosin trifosfat (ATP), 10 kU peroksidaz, 4 kU α -glisero fosfat oksidaz, 0,25 kU gliserol kinaz ve 100 kU lipaz içerecek şekilde hazırlandı. Ayıraç +4 °C'de saklandı.

9. Fosfat Tuz Tamponu (pH=7.4) :

1.36 gram potasyum dihidrojen fosfat ve 9 gram sodyum klorür tartılarak erlene alındı.Üzerine 800 mililitre distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda çözündürüldü. pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı. Tampon +4 °C'de saklandı.

10. Fosfolipid Tayininde Kullanılan Çözelti

Standart: 0.4393 gr KH_2PO_4 tartılarak 1000 ml distile suda çözüldü (ml başına 100 μg).Oksidize Edici Asit Çözeltisi, 10 ml %70 perklorik asit ve 90 ml 2,5 M Sülfirik asit karıştırıldı.Sodyum molibdat, 25 g sodyum molibdat tartılarak 142 ml 2,5 M sülfirik asit içinde çözündürüldü ve distile su ile 1 litre tamamlandı.Elon (p-metilaminofenol sülfat) = 1 g Elon ve 3 g sodyum bisülfid tartılarak 100 ml distile suda çözündürüldü.Ekstrakte Edici Çözelti, 1 hacim absölü

etanol 1 hacim dietil eter ile karıştırıldı. Çözelti çalışma öncesi taze olarak hazırlandı. Isıdan ve ışıktan korunması için koyu renk cam şişelerde saklandı.

3.5. KULLANILAN YÖNTEMLER

3.5.1. Periferik kandan DNA İzolasyonu

10 ml periferik kan örneği steril EDTA'lı tüplere alındıktan sonra çalışma için falkon tüpüne aktarıldı. Üzerine 1:3 oranında (30ml) eritrosit parçalama çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve +4°C'de 15 bekletildi. +4°C'den çıkarılan örneklerin 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları atıldı ve pelletleri tamamen süspanse edilerek üzerlerine tekrar 15-20 ml eritrosit parçalama çözeltisi eklendi. Örnekler +4°C'de 15 dakika bekletildikten sonra 1500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları atılarak pelletleri süspanse edildi. Süspanse olan pellet üzerine 500 µl %10'luk SDS 50µl proteinaz K (20 mg/ml) ve 9.4 ml lökosit parçalama çözeltisi eklenerek 56°C su banyosunda 1 gece inkübe edildi. Inkübasyon sonrası her 1 ml örnek başına 0.37 ml 9.5 M 'lık amonyum asetat çözeltisi eklendikten sonra yavaşça karıştırıldı ve 3000 rpm'de 25 dakika santrifüj edilerek proteinler çöktürüldü. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı temiz bir falkona aktarılacak üzerine 1:2 oranında %99'luk absolü alkol eklendi ve böylece DNA'nın presipitasyonu sağlandı. Yoğunlaşan DNA'nın alkol yüzeyine çıkması beklendi ve DNA steril bir mikropipet ucuyla alındı. DNA %70'lik

alkolde yıkanarak ve korunmak üzere Tris-EDTA çözeltisi içinde çözündürüldü. DNA örnekleri +4°C'de saklanmıştır⁶⁷.

3.5.2. DNA Saflık Tayini

DNA örnekleri Tris-EDTA çözeltisi ile 1/100 oranında sulandırıldı. 260 nm'de DNA'nın ve 280 nm'de RNA ve proteinin vermiş olduğu absorbans Tris EDTA çözeltisi ile spektrofotometre sıfırlanarak ölçüldü.

260 nm'de okunan absorbans / 280 nm'de okunan absorbans oranından DNA saflığı saptandı. O.D.₂₆₀ / O.D.₂₈₀ oranı 1,7-1,8 olan DNA'lar temiz olarak kabul edildi. Bu oranın altında bir değere sahip olan DNA'lara temizleme işlemi uygulandı.

3.5.3. DNA Düzeylerinin Hesaplanması

Çift iplikli DNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 absorbans 50 µg/ml (50ng/µl)' dir. Bu temel bilgiden faydalanarak DNA formülü aşağıdaki formüle göre hesaplandı⁹⁹.

DNA Konsantrasyonu (ng/µl): Sulandırma katsayısı (100) x A₂₆₀ x 50

3.5.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Apo E Gen Bölgesinin Çoğaltılması

Üç gruba ait DNA örneklerinden Apolipoprotein E gen bölgesinin çoğaltılması için 50 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. Karışım 32.625 µl

ddH₂O , 1.5 ünite Taq polimeraz enzimi , 5µl Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10 x Reaksiyon çözeltisi , Apo gen bölgesine özgü 50 pmol primer çifti, 200 mM deoksinükleotid trifosfat karışımı (dNTP) içermektedir. DNA örnekleri yaklaşık 500 ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklenmiştir.

Buharlaştırmanın engellenmesi için karışımın üzerine 50 µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Stratagene Mini Thermal Cycler'da aşağıda belirtilen koşullarda PCR'ları gerçekleştirilmiştir.

Apo E gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon protokolü:

96°C'de 1dakika denatürasyon; 67°C'de 2 dakika bağlanma; 72°C'de 2 dakika uzama olmak üzere 35 döngü yapıldı⁵¹.

3.5.5. PCR Yöntemiyle DNA'da ACE Gen Bölgesinin Çoğaltılması

DNA örneklerinden ACE gen bölgesinin çoğaltılması için 50 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. Karışım 31.9 µl ddH₂O , 0.1 ünite Taq polimeraz enzimi , 5µl Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10 x Reaksiyon çözeltisi , ACE gen bölgesine özgü 10 pmol primer çifti, 200 mM deoksinükleotid trifosfat karışımı (dNTP) içermektedir. DNA örnekleri yaklaşık 500 ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklenmiştir.

Buharlaştırmanın engellenmesi için karışımın üzerine 50 µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Stratagene Mini Thermal Cycler'da PCR'ları yapıldı.

ACE DD fenotipindeki örneklere ikinci kez PCR uygulandı. 20 µl' likPCR karışımında 9.05µl ddH₂O , 0.15 ünite Taq polimeraz enzimi , 2µl 10 x Reaksiyon

çözeltisi , ACE gen bölgesine özgü 10 pmol primer çifti, 200 mM deoksinükleotid trifosfat karışımı (dNTP) kullanarak PCR reaksiyon ortamı hazırlandı ve DNA örnekleri yaklaşık 500 ng olacak şekilde PCR karışımlarına eklenmiştir. Üzerlerine 50 µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Stratagene Mini Thermal Cycler'da birinci PCR koşullarında PCR'ları gerçekleştirildi.

ACE gen bölgesi için kullanılan amplifikasyon koşulu:

94°C'de 1 dakika denatürasyon, 56°C'de 1 dakika bağlanma, 72°C'de 2 dakika uzama olmak üzere 30 döngü olarak gerçekleştirilmiştir⁸⁸.

3.5.6. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR sonrası oluşan amplifikasyon ürünlerinin incelenmesi için %3'lük agaroz jel hazırlandı. Örnekler agaroz jel elektroforezinde hazırlanmış olan jele tatbik edilerek 100 volt'luk elektrik akımında yürütüldü.

%3'lük Agaroz Jelin Hazırlanması :

1.5 g agaroz tartılarak behere alındı. Üzerine 50 ml 1xTAE çözeltisi eklenerek mikrodalga fırında kaynatıldı. Daha sonra üzerine 1µl 10 mg/ml'lik etidyum bromür eklenerek karıştırıldı. Yaklaşık 70°C'ye soğutularak küvete döküldü. Tarak yerleştirildi ve jel soğumaya bırakıldı. Jel donduktan sonra tank 1xTAE çözeltisi ile dolduruldu. Alınan 15 µl PCR ürünleri son derişimi 1x olacak şekilde eklenen 5x'lık yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Kuyucuklardan birine apo E için PBR 322 Msp I DNA size marker ACE için ΦX 174 DNA Hae size marker yüklendi. Yükleme işlemi bittikten sonra

elektrotlar yerleştirilerek örnekler 80-100 V'ta yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve Poloroid kamera ile jelin fotoğrafı çekildi⁹⁹.

3.5.7. Amplifikasyon Ürünlerinde Apo E Gen Polimorfizminin Tespiti

Amplifiye olan PCR ürünleri Hha I Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile kesildi. Kesim işleminde bir örnek için 30 µl PCR amplifikasyon ürünü, 5 µl didistile su, 4 µl 10 x buffer, 1 µl Hha I Restriksiyon Endonükleaz enzimi kullanıldı^{3,51}.

Kesim işlemi için karışım hazırlandıktan sonra örnekler 37 °C su banyosunda en az 4 saat en çok bir gece inkübe edildi. Kesim ürünleri% 4'lük Metaphor agaroz'da 1xTBE çözeltisi içinde, 120 volt'luk elektrik akımında, 2 saat yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve Polaroid kamera ile fotoğrafı çekildi.

3.6. LİPİD PROFİLİ TAYİNİ

Kolesterol W. Richmond'un önerdiği (1973) serumda enzimatik total kolesterol tayin yöntemine göre çalışıldı⁸⁶. Triglicerid McGowan'ın önerdiği (1983) yöntemine göre çalışıldı⁶⁵. Serum örneklerindeki Düşük ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL,VLDL) , fosfotungustik asit ve magnezyum iyonları ile spesifik olarak çöktürüldü⁷⁶. Daha sonra santrifüj edilerek bu lipoproteinler çöktürüldü ve santrifüj sonrası üst sıvı fazda kolesterol tayin metodu uygulanarak HDL-

kolesterol seviyeleri tayin edildi. Çok düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol değerleri , serum trigliserid düzeyi 400 mg/dl'den az olmak koşuluyla , trigliserid değerlerinin 5'e bölümü ile hesaplandı⁷⁶.

Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol değerleri aşağıda gösterilen Friedewald formülüne göre hesaplandı⁷⁶.

$$\text{LDL-kolesterol} = \text{Total-kolesterol} - (\text{VLDL-kolesterol} + \text{HDL-kolesterol})$$

3.7. APOLİPOPROTEİN TAYİNLERİ

Apolipoprotein konsantrasyonları türbidimetrik olarak tayin edilmiştir⁸⁷.

3.8. FOSFOLİPİD TAYİNİ

Gomori Prosedürü'ne²⁷ göre çalışıldı. 400 µl serum örneğine 10 ml ekstraksiyon çözeltisi eklenerek 10 dakika bekletildi. Santrifüj edildi ve protein presipitatları çöktürüldü. 5 ml lipid ekstraktı tüpe transfer edildi. Tüp 100-110 °C 'lik ısıtıcıda ısıtıldı. Lipid kalıntısı için 400 µl oksidize edici asit eklendi ve tüp 240-250°C'de ısıtıcı içine alındı. 30 dakika sonra tüp ısıtıcıdan çıkarıldı ve soğutuldu. Asidik kalıntı tamamen temizlenmişse renksiz veya hafif sarı olmasına dikkat edildi. Eğer kalıntı içeriği koyu renkli ise oksidasyon prosedürü tekrar edildi. Asidik kalıntıya 7 ml distile su eklendi. Üzerine 2 ml sodyum molibdat solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Karışımın üzerine 0,5 ml Elon solüsyonu eklendi ve tekrar karıştırıldı. Reaksiyon karışımı bir küvete transfer edildi ve karıştırma işleminden sonra oluşan renk spektrofotometre ayıraç körüne karşı sıfırlandıktan sonra 700 nanometre dalga boyunda okundu. 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg standart içeren

örnekler kullanarak standart eğrisi çizildi. Standart eğrisinin 0-40 µg'a kadar doğrusal bir çizgi vermesine dikkat edildi.

3.9. Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatiksel analizleri SPSS paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ olarak alınmıştır.

Total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL, VLDL, Apo AI, Apo B, nonHDL, Apo AI / Apo B, LDL / Apo B, LDL / HDL ve total kolesterol / HDL düzeyleri açısından gruplararası farklılıkların değerlendirilmesinde Oneway ANOVA ve student t testi kullanılmıştır.

Apo E ve ACE allellerinin görülme sıklığının gruplararası farklılıklarının değerlendirilmesinde Ki kare testi kullanılmıştır.

Apo E ve ACE allellerinin serum total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL, VLDL, Apo AI, Apo B, nonHDL, Apo AI / Apo B, LDL / Apo B, LDL / HDL ve total kolesterol / HDL düzeylerine olan etkilerinin değerlendirilmesinde student t testi ve korelasyon testi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda kullanılan gruplara ait olguların genel olarak ve cinsiyete göre vücut kütle indeksleri ve yaş dağılımlarına ait sonuçlar Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmiştir. Tablodaki değerler istatistiksel açıdan karşılaştırıldığında gruplar arasında yaş ve vücut kütle indeksleri bakımından anlamlı fark bulunmadığı saptanmıştır ($p>0.05$).

Tablo 2: Deney gruplarına ait vücut kütle indeksi ve yaş ortalamalarının dağılımları

GRUP	Vücut Kütle İndeksi (kg/m^2)	Yaş (yıl)	
		ortalama	sınırlar
Alzheimer	22.71 ± 3.89 n= 37	73.91 ± 7.35	(55-86 yaş)
Demans	24.65 ± 4.33 n=47	74.92 ± 8.16	(58-93yaş)
Parkinson	23.60 ± 3.36 n=21	68.31 ± 6.16	(60-78 yaş)
Kontrol	24.50 ± 6.32 n=29	73.62 ± 13.63	(54-97 yaş)

Tablodaki değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir (n= Örnek sayısı) Gruplar arasındaki önemlilik derecesi student t testi ile incelenmiştir.

Tablo 3: Deney gruplarına ait vücut kütle indeksi ve yaş ortalamalarının cinsiyete göre dağılımları

	Kadın			Erkek		
GRUP	Vücut Kütle İndeksi (kg/m ²)	Yaş (yıl) ortalama	sınırlar	Vücut Kütle İndeksi (kg/m ²)	Yaş (yıl) ortalama	sınırlar
Alzheimer	22.42 ± 4.41 n= 28	74.46 ± 6.96	(59-86 yaş)	23.46 ± 2.09 n=9	72.22 ± 8.60	(55-82 yaş)
Demans	24.22 ± 5.14 n=26	73.77 ± 8.35	(58-90 yaş)	25.20 ± 3.16 n= 21	76.26 ± 7.90	(62-93 yaş)
Parkinson	24.44 ± 5.97 n=8	68.80 ± 5.8	(64-77 yaş)	23.26 ± 2.74 n= 13	68.05 ± 6.56	(60-78 yaş)
Kontrol	26.30 ± 6.71 n=9	72.00 ± 11.90	(57-90 yaş)	23.48 ± 6.07 n= 20	74.35 ± 14.38	(54-97 yaş)

Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n= Örnek sayısı)
Gruplar arasındaki önemlilik derecesi student t testi ile incelenmiştir.

Tablo 4'de Alzheimer, demans ve Parkinson tanısı konmuş olgularda ve kontrol grubunda lipid profili ve apolipoprotein değerleri verilmiştir. Tablo 4'nin incelenmesinde görüleceği gibi; apo A1 ($p<0.001$), kolesterol ($p<0.05$), LDL ($p<0.001$) düzeyi Parkinson tanısı konmuş olgularda diğer üç gruba göre istatistiki açıdan anlamlı olarak düşük bulundu. Apo B seviyesi kontrol grubunda diğer üç gruba göre istatistiki açıdan anlamlı olarak yüksek ($p<0.01$), ayrıca Parkinson'da demans grubuna oranla ($p<0.01$) istatistiki açıdan anlamlı olarak düşük olduğu saptanmıştır. LDL/apo B ($p<0.01$) ve LDL/HDL ($p<0.001$) seviyesi ise Parkinsonda diğer üç gruba göre istatistiki açıdan anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4: Çalışma gruplarına ait serum lipid profili ve apolipoprotein değerleri.

GRUP	ALZHEİMER n=37	DEMANS n=47	PARKİNSON n=21	KONTROL n=29
BAŞLANGIÇ YAŞI (YIL)	69.97 ± 8.2	69.56 ± 10.94	62.07 ± 6.61	-
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	209.35 ± 40.87	210.78 ± 50.72	174.28 ± 36.60	204.35 ± 35.53
TRİGLİSERİD (mg/dl)	138.47 ± 42.34	145.80 ± 52.8	154.33 ± 88.22	142.60 ± 55.64
HDL (mg/dl)	47.97 ± 14.75	44.42 ± 14.50	39.14 ± 15.33	43.45 ± 13.18
LDL (mg/dl)	133.11 ± 36.87	138.53 ± 44.21	101.85 ± 24.27	132.25 ± 33.23
VLDL (mg/dl)	27.55 ± 8.47	29.25 ± 11.13	27.80 ± 11.69	28.55 ± 11.34
APO A1 (mg/dl)	207.12 ± 66.48	213.91 ± 62.31	155.14 ± 48.12	234.94 ± 41.68
APO B (mg/dl)	153.37 ± 35.35	165.76 ± 55.37	139.38 ± 39.19	186.66 ± 52.03
FOSFOLİPİD (mg/dl)	230.50 ± 37.48	227.89 ± 33.70	218.23 ± 45.76	226.55 ± 24.85
KOL / HDL	5.18 ± 4.54	5.28 ± 2.40	5.56 ± 4.75	5.24 ± 2.38
LDL / HDL	0.75 ± 0.88	0.67 ± 0.73	1.82 ± 1.58	0.55 ± 0.75
LDL / APO B	0.20 ± 0.22	0.21 ± 0.28	0.46 ± 0.29	0.13 ± 0.20
APO A1 / B	1.37 ± 0.48	1.41 ± 0.65	1.19 ± 0.51	1.28 ± 0.42
NONHDL (mg/dl)	161.38 ± 39.20	166.34 ± 51.95	135.14 ± 36.66	160.90 ± 34.91

Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi Oneway ANOVA ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

Alzheimer tanısı konmuş olguların ve kontrol grubunun kadınları arasında lipid profilleri ve apolipoprotein düzeyleri karşılaştırıldığında (Tablo 5), Apo B seviyesi Alzheimer tanısı konmuş olgularda kontrollere göre istatistiki açıdan anlamlı olarak düşük ($p < 0.01$), LDL/ApoB seviyesi ise istatistiki açıdan anlamlı olarak yüksek ($p < 0.05$) olduğu saptanmıştır.

Tablo 5: Kadınlarda Alzheimer ve Kontrol gruplarının lipid profilleri açısından karşılaştırılması

GRUP	ALZHEİMER n=27	KONTROL n=9	t tablo	p
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	216.38 ± 37.22	202.85 ± 36.14	0.86	0.397
TRİGLİSERİD (mg/dl)	142.07 ± 46.65	147.00 ± 49.58	0.24	0.808
HDL (mg/dl)	48.23 ± 13.65	41.57 ± 10.96	1.19	0.244
LDL (mg/dl)	138.19 ± 36.82	131.71 ± 33.15	0.42	0.677
VLDL (mg/dl)	28.46 ± 9.30	29.57 ± 9.91	0.28	0.784
APO A1 (mg/dl)	251.70 ± 64.06	232.71 ± 33.24	0.67	0.508
APO B (mg/dl)	154.20 ± 34.62	206.14 ± 50.05	3.15	0.004
FOSFOLİPİD (mg/dl)	239.41 ± 37.76	239.85 ± 30.18	0.03	0.978
KOL / HDL	5.46 ± 5.11	5.70 ± 3.50	0.12	0.907 0.881#
LDL / HDL	0.69 ± 0.87	0.35 ± 0.22	1.02	0.316 0.321#
LDL / APO B	0.18 ± 0.19	0.15 ± 0.25	0.30	0.764 0.012#
APO A1 /B	1.43 ± 0.45	1.20 ± 0.42	1.21	0.236
NONHDL (mg/dl)	168.15 ± 37.86	161.28 ± 39.47	0.42	0.676

Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

Mann-Whitney U testine göre elde edilen p değeri.

Alzheimer tanısı konmuş olguların ve kontrol grubunun erkekleri lipid profilleri ve apolipoprotein düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında, fosfolipid seviyesinin Alzheimer tanısı konmuş olgularda istatistiki olarak anlamlılığa yakın olarak düştüğü, buna rağmen aynı grupta apo A1 seviyesindeki düşüklüğün istatistiki anlamlılığa ulaşmadığı gözlenmiştir(p>0.05) (Tablo 6).

Tablo 6 : Erkeklerde Alzheimer tanısı konmuş olguların kontrol grubu ile lipid profilleri açısından karşılaştırılması

GRUP	ALZHEİMER n=9	KONTROL n=20	t tablo	p
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	186.50 ± 46.33	205.15 ± 36.65	1.03	0.318
TRİGLİSERİD (mg/dl)	126.75 ± 21.79	140.23 ± 60.46	0.60	0.554
HDL (mg/dl)	47.12 ± 18.96	44.46 ± 14.55	0.36	0.720
LDL (mg/dl)	116.62 ± 34.04	132.53 ± 34.54	1.03	0.316
VLDL (mg/dl)	24.62 ± 4.06	28.00 ± 12.39	0.74	0.469
APO A1 (mg/dl)	181.37 ± 71.28	231.84 ± 45.15	2.00	0.060
APO B (mg/dl)	150.87 ± 39.86	186.46 ± 55.75	1.57	0.133
FOSFOLİPİD (mg/dl)	203.75 ± 21.07	224.15 ± 22.04	2.09	0.050
KOL / HDL	4.23 ± 1.28	4.99 ± 1.63	1.11	0.279 0.310#
LDL / HDL	0.95 ± 0.92	0.65 ± 0.911	0.73	0.477 0.514#
LDL / APO B	0.28 ± 0.30	0.20 ± 0.24	0.65	0.521 0.438#
APO A1 / B	1.20 ± 0.46	1.33 ± 0.42	0.64	0.529
NONHDL (mg/dl)	139.37 ± 37.45	160.69 ± 33.92	1.35	0.194

Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

Mann-Whitney U testine göre elde edilen p değeri.

Tablo 7’de görüldüğü gibi demans tanısı konmuş olguların ve kontrol grubunun kadınları arasında lipid profilleri ve apolipoprotein düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiki açıdan sadece LDL/Apo B seviyesinde demanslarda anlamlı bir düşüş gözlenirken ($p < 0.05$), nonHDL-kolesterol seviyesindeki artış istatistiki anlamlılığa ulaşamamıştır ($p > 0.05$).

Tablo 7 :Demans tanısı konmuş kadın olguların kontrol grubu ile lipid profilleri açısından karşılaştırılması

GRUP	DEMANS n=26	KONTROL n=9	t tablo	p
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	231.00 ± 49.34	202.85 ± 36.14	1.40	0.170
TRİGLİSERİD (mg/dl)	147.19 ± 65.72	147.00 ± 49.58	0.01	0.994
HDL (mg/dl)	44.80 ± 15.42	41.57 ± 10.96	0.52	0.608
LDL (mg/dl)	154.61 ± 41.55	131.71 ± 33.15	1.34	0.190
VLDL (mg/dl)	29.26 ± 13.20	29.57 ± 9.91	0.06	0.956
APO A1 (mg/dl)	222.42 ± 59.82	232.71 ± 33.24	0.43	0.667
APO B (mg/dl)	177.03 ± 53.66	206.14 ± 50.05	1.29	0.207
FOSFOLİPİD (mg/dl)	235.42 ± 31.59	239.85 ± 30.18	0.33	0.742
KOL / HDL	5.86 ± 2.77	5.70 ± 3.50	0.13	0.901 0.597#
LDL / HDL	0.46 ± 0.44	0.35 ± 0.22	0.63	0.534 0.401#
LDL / APO B	0.10 ± 0.08	0.15 ± 0.25	0.51	0.627 0.020#
APO A1 /B	1.33 ± 0.50	1.20 ± 0.42	0.65	0.524
NONHDL (mg/dl)	186.19 ± 52.36	161.28 ± 39.47	1.17	0.252

Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

Mann-Whitney U testine göre elde edilen p değeri.

Tablo 8’de görüleceği gibi demans tanısı konmuş olgularla kontrol grubunun erkekleri lipid profilleri ve apolipoprotein düzeyleri bakımından karşılaştırıldığında istatistiki olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır(p>0.05).

Tablo 8 : Erkeklerde demans tanısı konmuş olgularla kontrol grubunun lipid profilleri açısından karşılaştırılması

GRUP	DEMANS n=21	KONTROL n=20	t tablo	p
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	185.76 ± 41.05	205.15 ± 36.65	1.39	0.173
TRİGLİSERİD (mg/dl)	144.09 ± 31.91	140.23 ± 60.46	0.24	0.808
HDL (mg/dl)	43.95 ± 13.62	44.46 ± 14.55	0.10	0.918
LDL (mg/dl)	118.61 ± 39.82	132.53 ± 34.54	1.04	0.306
VLDL (mg/dl)	29.23 ± 8.19	28.00 ± 12.39	0.35	0.728
APO A1 (mg/dl)	203.38 ± 65.16	231.84 ± 45.15	1.38	0.177
APO B (mg/dl)	151.80 ± 55.52	186.46 ± 55.75	1.77	0.087
FOSFOLİPID (mg/dl)	218.57 ± 34.64	224.15 ± 22.04	0.52	0.608
KOL / HDL	4.55 ± 1.66	4.99 ± 1.63	0.75	0.458 0.446#
LDL / HDL	0.94 ± 0.92	0.65 ± 0.911	0.90	0.377 0.511#
LDL / APO B	0.34 ± 0.38	0.20 ± 0.24	1.13	0.267 0.284#
APO A1 /B	1.49 ± 0.810	1.33 ± 0.42	0.68	0.502
NONHDL (mg/dl)	141.76 ± 40.43	160.69 ± 33.92	1.41	0.169

Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

Mann-Whitney U testine göre elde edilen p değeri.

Parkinson tanısı konmuş olgularla kontrol grubunun kadınları arasında lipid profilleri ve apolipoprotein düzeyleri karşılaştırıldığında (Tablo 9), apo A1 ve LDL seviyeleri Parkinson tanısı konmuş olgularda kontrollere göre istatistiki açıdan anlamlı şekilde düşük, LDL/HDL oranı istatistiki açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur(p<0.05) .

Tablo 9 : Kadınlarda Parkinson tanısı konmuş olguların kontrol grubu ile lipid profilleri açısından karşılaştırılması

Grup	PARKİNSON n=8	KONTROL n=9	t tablo	p
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	185.12 ± 33.88	202.85 ± 36.14	0.98	0.345
TRİGLİSERİD (mg/dl)	204.12±115.76	147.00 ± 49.58	1.21	0.249
HDL (mg/dl)	41.37 ± 17.56	41.57 ± 10.96	0.03	0.980
LDL (mg/dl)	95.71 ± 23.81	131.71 ± 33.15	2.33	0.038
VLDL (mg/dl)	33.71 ± 13.26	29.57 ± 9.91	0.66	0.521
APO A1 (mg/dl)	175.62 ± 46.59	232.71 ± 33.24	2.69	0.018
APO B (mg/dl)	154.12 ± 43.65	206.14 ± 50.05	2.15	0.051
FOSFOLİPİD (mg/dl)	242.50 ± 60.03	239.85 ± 30.18	0.11	0.918
KOL / HDL	6.73 ± 7.60	5.70 ± 3.50	0.33	0.750 0.817#
LDL / HDL	1.04 ± 0.78	0.35 ± 0.22	2.23	0.046 0.047#
LDL / APO B	0.35 ± 0.26	0.15 ± 0.25	1.47	0.168 0.136#
APO A1 /B	1.23 ± 0.52	1.20 ± 0.42	0.13	0.896
NONHDL (mg/dl)	143.75 ± 46.99	161.28 ± 39.47	0.78	0.452

Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

Mann-Whitney U testine göre elde edilen p değeri.

Parkinson tanısı konmuş olgularla kontrol grubunun erkekleri arasında lipid profilleri ve apolipoprotein düzeyleri ile karşılaştırıldığında kolesterol (p<0.05), LDL (p<0.05), apo A1 (p<0.001), apo B (p<0.05), nonHDL (p<0.05) seviyelerinin Parkinsonlu grupta kontrollere göre istatistiki açıdan anlamlı olarak düşük olduğu , LDL/apo B (p<0.05) oranının ise anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 10).

Tablo 10 : Erkeklerde Parkinson tanısı konmuş olgularla kontrol grubunun lipid profilleri açısından karşılaştırılması

GRUP	PARKİNSON n=13	KONTROL n=20	t tablo	p
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	167.61 ± 37.90	205.15 ± 36.65	2.57	0.017
TRİGLİSERİD (mg/dl)	123.69 ± 49.84	140.23 ± 60.46	0.76	0.454
HDL (mg/dl)	37.76 ± 14.36	44.46 ± 14.55	1.18	0.250
LDL (mg/dl)	105.15 ± 24.81	132.53 ± 34.54	2.32	0.029
VLDL (mg/dl)	24.61 ± 9.85	28.00 ± 12.39	0.77	0.448
APO A1 (mg/dl)	142.53 ± 46.27	231.84 ± 45.15	4.98	0.000
APO B (mg/dl)	130.30 ± 34.84	186.46 ± 55.75	3.08	0.005
FOSFOLİPİD (mg/dl)	203.30 ± 27.46	224.15 ± 22.04	2.13	0.043
KOL / HDL	4.85 ± 1.57	4.99 ± 1.63	0.23	0.817 0.777#
LDL / HDL	2.24 ± 1.76	0.65 ± 0.911	2.88	0.010 0.057#
LDL / APO B	0.52 ± 0.30	0.20 ± 0.24	2.91	0.008 0.011#
APO A1 /B	1.16 ± 0.50	1.33 ± 0.42	0.90	0.377
NONHDL (mg/dl)	129.84 ± 29.53	160.69 ± 33.92	2.47	0.021

Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

Mann-Whitney U testine göre elde edilen p değeri.

Çalışma gruplarına ait lipid ve apolipoprotein düzeyleri arasındaki korelasyon ilişkisi Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11 : Hasta bulgularına ait korelasyon matrisi

j	1.00															
İ.	0.47 ***	1.00														
İl			1.00													
I	-0.01	0.03	1.00													
.	0.03	-0.04	-0.02	1.00												
.					1.00											
J.	-0.11	-0.09	-0.02	0.25 **	1.00											
L	0.06	-0.08	-0.06	0.20* ***	-0.33 ***	1.00										
.	0.05	0.01	0.02	0.91 ***	0.12	0.007	1.00									
DL	-0.08	-0.06	-0.02	0.23* ***	0.96 ***	-0.28 **	0.09	1.00								
ı	0.04	0.003	0.10	0.30 **	-0.08	0.39 ***	0.25 **	-0.06	1.00							
ı	-0.15	-0.07	0.01	0.55 ***	0.43 ***	-0.11	0.53 ***	0.41 ***	0.27 **	1.00						
ifo	-0.07	-0.07	-0.02	0.54 ***	0.51 ***	0.06	0.42 ***	0.37 ***	0.39 ***	0.54 ***	1.00					
.	-0.07	-0.04	-0.04	0.38 ***	0.46 ***	-0.60 ***	0.43 ***	0.28 **	-0.11	0.38 ***	0.38 ***	1.00				
/	-0.01	-0.04	-0.10	-0.48 ***	0.15	-0.41 ***	-0.46 ***	0.18 *	-0.42 ***	-0.20 *	-0.25 **	0.12	1.00			
ıB	0.11	0.04	-0.24* ***	-0.53 ***	0.06	-0.16	-0.57 ***	0.10	-0.30 **	-0.40 ***	-0.25 ***	-0.16 ***	0.78 ***	1.00		
3	0.17	0.068	0.15	-0.14 ***	-0.33 ***	0.35 ***	-0.19 *	-0.31 ***	0.58 ***	-0.51 ***	-0.04	-0.31 ***	-0.16	0.16	1.00	
ı	0.01	-0.02	-0.008	0.94 ***	0.37 ***	-0.12	0.93 ***	0.33 ***	0.18 *	0.60 ***	0.52 ***	0.55 ***	-0.35 ***	-0.49 ***	-0.26 **	1.00
.	Yaş	Baş. Yaşı	BMI	Tot. Kol.	Trig	HDL	LDL	VLDL	Apo A1	Apo B	Fos folip.	Kol/ HDL	LDL/ HDL	LDL/ Apo B	Apo A1/B	Non HDL

Tablodaki değerler r. Korelasyon katsayısı ; * : P<0.05 ; ** : P<0.01 ; *** : P<0.001

35 Alzheimer hastası, 45 Demans hastası, 21 Parkinson hastası ve 29 sağlıklı bireyde apo E fenotiplerinin ve allel frekanslarının total olarak ve cinsiyete göre dağılımı Tablo 12,13,14,15, 16,17’de verilmiştir .

Tablo 12 : Apo E fenotipinin gruplara göre dağılımı

APO E FENOTİPİ	2/2	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4	TOPLAM
Alzheimer	-	2 %5.7	1 %2.9	26 %74.3	5 %14.3	1 %2.9	35 %26.9
Demans	-	5 %11.1	2 %4.4	29 %64.4	8 %17.8	1 %4.8	45 %34.6
Parkinson	-	4 %19.0	1 %4.8	15 %71.4	1 %4.8	-	21 %16.2
Kontrol	-	1 %3.4	-	27 %93.1	1 %3.4	-	29 %22.3
Toplam	-	12 %9.2	4 %3.1	97 %74.6	15 %11.5	2 %1.5	130 %100

Tablo 13: Kadınlarda Apo E fenotipinin gruplara göre dağılımı

APO E FENOTİPİ	2/2	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4	TOPLAM
Alzheimer	-	1 %3.8	1 %3.8	18 %69.2	5 %19.2	1 %3.8	26 %38.2
Demans	-	2 %8.0	2 %5.0	15 %60.0	5 %20.0	1 %4.0	25 %36.8
Parkinson	-	1 %12.5	1 %12.5	6 %75.0	-	-	8 %11.8
Kontrol	-	-	-	9 %100	-	-	9 %13.2
Toplam	-	4 %5.9	4 %5.9	48 %70.6	10 %14.7	2 %2.9	68 %100

Tablo 14: Erkeklerde Apo E fenotipinin gruplara göre dağılımı

APO E FENOTİPİ	2/2	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4	TOPLAM
Alzheimer	-	1 %11.1	-	8 %88.9	-	-	9 %14.5
Demans	-	3 %15.0	-	14 %70.0	3 %15.0	-	20 %32.3
Parkinson	-	3 %23.1	-	9 %69.0	1 %7.7	-	13 %21.0
Kontrol	-	1 %5.0	-	18 %90.0	1 %5.0	-	20 %32.3
Toplam	-	8 %12.9	-	49 %79.0	5 %8.1	-	62 %100

Tablo 15: Apo E allellerinin gruplara göre dağılımı

APO E ALLEL	ε 2	ε 3	ε 4	TOPLAM
Alzheimer	3 %4.28	59 %84.28	8 %11.42	70
Demans	7 %7.77	71 %78.88	12 %13.33	90
Parkinson	5 %11.90	35 %83.33	2 %4.76	42
Kontrol	1 %1.66	56 %59.7	1 %1.72	58
Toplam	16 %6.1	221 %85	23 %8.8	260 %100

Tablo 16 : Kadınlarda apo E allellerinin dağılımı

APO E ALLEL	ε 2	ε 3	ε 4	TOPLAM
Alzheimer	2 %3.84	42 %80.7	8 %15.38	52
Demans	4 %8	37 %74	9 %18	50
Parkinson	2 %12.5	13 %81.25	1 %6.25	16
Kontrol	-	18 %100	-	18
Toplam	8 %5.88	110 %80.8	18 %13.23	136 %100

Tablo 17:Erkeklerde apo E allelinin dağılımı

APO E ALLEL	ε 2	ε 3	ε 4	TOPLAM
Alzheimer	1 %5.5	17 %94.4	-	18
Demans	3 %7.5	34 %85	3 %7.5	40
Parkinson	3 %11.5	22 %84.6	1 %3.84	26
Kontrol	1 %2.5	38 %95	1 %2.5	40
Toplam	8 %6.25	111 %89.5	5 %4.03	124 %100

Apo ε 4 alleli taşıma açısından kontrol grubu ile Alzheimer grubu karşılaştırıldığında apo ε 4 allelinin Alzheimer hastalarında daha sık olarak bulunduğunu gösteren anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 18). Genel demanslarla kontrol grubu karşılaştırıldığında ε 4 allelinin demanslarda da anlamlı olarak fazla olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$) (Tablo 19). Parkinson grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 20). Apo ε 4 alleli taşıma açısından kadınlar ve erkekler karşılaştırıldığında apo ε 4 allelinin kadınlarda daha sık olarak bulunduğunu gösteren anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 21).

Tablo 18: Apo ε 4 alleli taşıma açısından Alzheimer ve Kontrol Grubunun karşılaştırılması

	Alzheimer	Kontrol	Toplam
ε 4 alleli taşımayanlar	n=28 %80	n=28 %96	56 %87.5
ε 4 alleli taşıyanlar	n= 7 %20	n= 1 %3.4	n=8 %12.5
Toplam	35 %54.7	n=29 %45.3	64 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2 = 3.97$; $p< 0.05$; n=örnek sayısı)

Tablo 19: Apo ε 4 alleli taşıma açısından Demans ve Kontrol Grubunun karşılaştırılması

	Demans	Kontrol	Toplam
ε 4 alleli taşımayanlar	n=34 % 75.55	n=28 % 96.5	62 %83.8
ε 4 alleli taşıyanlar	n= 11 % 24.44	n= 1 % 3.44	n=12 %16.2
Toplam	45 %60.8	n=29 %39.2	74 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2 = 5.72$; $p < 0.05$; n=örnek sayısı)

Tablo 20: Apo ε 4 alleli taşıma açısından Parkinson ve Kontrol Grubunun karşılaştırılması

	Parkinson	Kontrol	Toplam
ε 4 alleli taşımayanlar	n=19 % 90.47	n=28 % 96.55	n=47 % 94.0
ε 4 alleli taşıyanlar	n= 2 % 9.52	n= 1 % 3.44	n= 3 % 6.0
Toplam	21 %42.0	n=29 % 58.0	50 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2 = 0.79$; $p > 0.05$; n=örnek sayısı)

Tablo 21: Apo ε 4 alleli taşıma açısından Kadın ve erkeklerin karşılaştırılması

	Kadın	Erkek	Toplam
ε 4 alleli taşımayanlar	n=28 % 50	n=28 %50	n=56 % 87.5
ε 4 alleli taşıyanlar	n= 7 %87.5	n= 1 %12.5	n= 8 % 12.5
Toplam	35 %54.7	n=29 % 45.3	64 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2 = 3.97$; $p < 0.05$; n=örnek sayısı)

Alzheimer ve kontrol grubunda hastalığın cinsiyete göre dağılımı incelendiğinde kadınlarda Alzheimer hastalığının daha yüksek olduğunu gösteren ileri derecede anlamlı fark gözlenmiştir ($p < 0.001$) (Tablo 22).

Tablo 22: Alzheimer ve Kontrollerde Kadın ve Erkeklerin Karşılaştırılması

	Alzheimer	Kontrol	Toplam
Kadın	n=28 % 75.67	n=9 % 30	n=37 % 55.2
Erkek	n= 9 % 24.32	n=21 % 70	n= 30 %44.8
Toplam	n=37 % 55.2	n=30 % 44.8	n= 67 %100

Gruplarası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2 = 13.97$; $p < 0.001$; n=örnek sayısı)

Apo ϵ 2 alleli taşıma açısından Parkinson ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ϵ 2 allelinin Parkinson hastalarında arttığını gösteren istatistiki anlamlılık elde edilmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 23).

Tablo 23: Apo ϵ 2 alleli taşıma açısından Parkinson ve Kontrol Grubunun karşılaştırılması

	Parkinson	Kontrol	Toplam
ϵ 2 alleli taşımayanlar	n=16 % 36.4	n=28 % 63.6	n=44 % 88
ϵ 2 alleli taşıyanlar	n= 5 % 83.3	n= 1 % 16.7	n= 6 % 12
Toplam	21 %42.0	n=29 % 58.0	50 %100

Gruplarası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2 = 4.78$; $p < 0.05$; n=örnek sayısı)

Apo E fenotipine göre lipid profili ve apolipoprotein seviyeleri incelendiğinde (Tablo 24) Apo A1/B düzeyi 2/3 fenotipinde 3/3,3/4 ve 4/4'e göre anlamlı olarak artmış bulundu (($p<0.05$). Apo B seviyesi 2/3 fenotipinde 3/3, 2/4 ve 4/4'e göre anlamlı olarak düşük , 4/4 fenotipinde 2/3,3/4 ve 3/3 fenotipine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Fosfolipid seviyesi 2/4 fenitipinde 3/3, 3/4 ve 2/3 fenotipine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). Kolesterol seviyesi 4/4 fenotipinde 2/3 ve 3/3 fenotiplerine oranla, ayrıca 3/4 fenotipi de 2/3 fenotipine oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Kolesterol / HDL oranı 2/4 fenotipinde 2/3, 3/3 ve 3/4 fenotipine göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). LDL seviyesi 3/4 fenotipinde 2/3'e göre 4/4 fenotipinde 2/3 ve 3/3'e göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). LDL/Apo B seviyesi 2/3 fenotipinde 2/4, 4/4, 3/4 ve 3/3'e göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). NonHDL seviyesi 2/3 fenotipinde 3/4, 2/4 ve 4/4 fenotipine göre anlamlı derecede düşük, 4/4 fenotipinde 2/3 ve 3/3 fenotipine göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). Triglicerid seviyesi 3/3 fenotipinde 4/4 ve 2/4'e göre anlamlı derecede düşük ,2/4 fenotipinde ise 3/3, 2/3 ve 3/4'e göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.01$). VLDL seviyesi 4/4 fenotipinde tüm fenotiplere göre yüksek bulunmuş fakat istatistiki anlamlılığa ulaşamamıştır ($p>0.05$). Apo A1/Apo B oranı 2/3 fenotipinde 4/4,3/3 ve 3/4 fenotipine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.01$). NonHDL seviyesi 2/3 fenotipinde 3/4, 2/4 ve 4/4 fenotiplerine göre anlamlı olarak düşük, 4/4 fenotipinde ise 2/4 ve 3/3 fenotiplerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu (($p<0.01$)

Tablo 24 :Tüm çalışma grubunda Apo E fenotipine göre başlangıç yaşı ve lipid profillerinin dağılımı

APO FENOTİPİ E	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4
BAŞLANGIÇ YAŞI(YIL)	69.55±10.47	71.00±10.02	67.94±9.85	68.07±9.26	66.00
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	180.16±44.31	226.00±21.90	200.58±44.26	221.26±43.73	272.00±7.07
TRİGLİSERİD (mg/dl)	154.33±30.56	226.75±148.8	136.52±50.48	158.26±4.27	219.00±73.53
HDL (mg/dl)	44.25±16.52	35.50±17.93	44.67±14.65	44.13±13.51	35.00±12.72
LDL (mg/dl)	106.75±29.73	141.66±12.50	128.45±39.49	148.40±34.84	193.00±4.24
VLDL (mg/dl)	30.33±6.41	30.66±7.02	27.30±10.44	31.53±12.85	43.50±14.84
APO A1 (mg/dl)	222.00±70.63	248.25±99.59	199.48±60.01	204.33±60.46	217.00±53.74
APO B (mg/dl)	130.75±40.25	187.00±32.25	161.55±48.60	158.60±44.68	256.50±92.63
FOSFOLİPİD (mg/dl)	232.00±40.50	283.00±69.48	222.59±31.87	225.93±34.08	263.00±24.04
KOL / HDL	4.54±1.75	10.08 ±10.22	5.09±3.29	5.76±2.86	8.35±3.24
LDL / HDL	1.71±1.72	0.31±0.04	0.81±0.95	0.63±0.77	0.58±0.21
LDL / APO B	0.50±0.50	0.08±0.02	0.23±0.25	0.16±0.18	0.08±0.02
APO A1 /B	1.88±1.01	1.35±0.52	1.28±0.43	1.34±0.45	0.86±0.99
NONHDL (mg/dl)	135.91±35.22	190.50±36.20	155.91±43.44	177.06±44.62	237.00±19.79

Tablodaki değerler grup ayrımı yapılmadan ortalama±SD olarak verilmiş ve gruplar arası karşılaştırma Oneway ANOVA testi ile yapılmıştır.

Apo E allellerinin dört grup genelinde serum lipid ve lipoprotein düzeylerine etkisi incelenmiştir. Apo ϵ 2 alleleline sahip olan bireylerde diğer fenotiplere göre (ϵ 2 alleleline sahip olmayan) trigliserid ($p<0.05$) ve fosfolipid ($p<0.05$) düzeylerinin istatistiki olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir. Diğer parametreler açısından apo ϵ 2 allelinin ϵ 3 ve ϵ 4 allellerinden farklı bir etki göstermediği saptanmıştır ($p>0.05$) (Tablo 25).

Apo ϵ 3 alleleline sahip bireylerde serum total kolesterol ($p<0.05$) , apo B ($p<0.05$), fosfolipid ($p<0.001$) ve nonHDL-kolesterol ($p<0.05$) düzeylerinin ϵ 2 ve ϵ 4 alleleline sahip bireylere göre istatistiki açıdan anlamlı olarak azaldığı, LDL/HDL ($p<0.05$) ve LDL/Apo B ($p<0.001$) düzeylerinin ise anlamlı olarak arttığı bulunmuştur (Tablo 26).

Apo ϵ 4 allelinin serum lipid profilleri ve apolipoproteinler üzerine etkisi incelendiğinde (Tablo 27), total kolesterol ($p<0.05$) , LDL-kolesterol ($p<0.01$), VLDL-kolesterol ($p<0.05$), fosfolipid ($p<0.05$), LDL/Apo B ($p<0.05$) ve nonHDL-kolesterol ($p<0.01$) düzeylerinin ϵ 4 allelini taşıyanlarda ϵ 4 allelini taşımayanlara oranla anlamlı olarak arttığı, LDL/HDL ($p<0.01$) oranının ise anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur.

Tablo 25: Tüm çalışma grubunda Apo ε 2 allelinin başlangıç yaşı ve lipid profili üzerine etkisi

APO FENOTİPİ ^E	ε 2 (+) n=16	ε 2 (-) n=102	t tablo	p
BAŞLAMA YAŞI (yıl)	70.00 ± 10.00	67.94 ± 9.61	0.71	0.483
BMI (kg/m ²)	25.16 ± 4.61	24.04 ± 4.88	0.50	0.621
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	191.62 ± 44.22	205.02 ± 45.16	1.11	0.271
TRİGLİSERİD (mg/dl)	172.43 ± 78.53	141.34 ± 54.10	2.00	0.048
HDL(mg/dl)	42.06 ± 16.72	44.40 ± 44.39	0.59	0.556
LDL(mg/dl)	113.73 ± 30.43	132.65 ± 39.86	1.76	0.081
VLDL(mg/dl)	30.40 ± 6.27	28.24 ± 11.07	0.73	0.464
APO A1(mg/dl)	228.56 ± 76.02	200.58 ± 59.47	1.68	0.097
APO B(mg/dl)	144.81 ± 45.05	163.04 ± 50.10	1.37	0.174
FOSFOLİPİD (mg/dl)	244.75 ± 51.85	223.92 ± 33.32	2.17	0.032
KOL / HDL	5.92 ± 5.41	5.25 ± 3.24	0.70	0.486
LDL / HDL	113.75 ± 30.43	132.65 ± 39.86	1.52	0.148
LDL / APO B	0.42 ± 0.41	0.21 ± 0.24	1.86	0.081
APO A1 /B	1.75 ± 0.93	1.28 ± 0.43	1.97	0.066
NONHDL(mg/dl)	149.56 ± 42.04	160.61 ± 44.99	0.92	0.359

Tablodaki değerler grup ayrımı yapılmadan ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

Tablo 26: Tüm çalışma grubunda Apo ε 3 allelinin başlangıç yaşı ve lipid profili üzerine etkisi

APO E FENOTİPİ	ε 3 (+) n=115	ε 3 (-) n=6	t tablo	p
BAŞLAMA YAŞI (yıl)	68.15 ± 9.71	70.00 ± 9,19	0.41	0.680
BMI (kg/m ²)	24.22 ± 4,88	21,42 ± 3,01	0,98	0.329
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	201.16 ± 44.95	241.33 ± 29.36	2.16	0.033
TRİGLİSERİD(mg/dl)	141.34 ± 51.15	224.16 ± 119.98	1.68	0.152
HDL(mg/dl)	44.55 ± 14.57	35.33 ± 15.01	1.51	0.134
LDL(mg/dl)	128.80 ± 30.05	162.20 ± 29.55	1.88	0.062
VLDL(mg/dl)	28.19 ± 10.49	35.80 ± 11.36	1.58	0.117
APO A1(mg/dl)	202.65 ± 61.11	237.83 ± 82.39	1.35	0.180
APO B(mg/dl)	157.72 ± 47.82	210.16 ± 60.23	2.58	0.011
FOSFOLİPID(mg/dl)	224.10 ± 33.00	276.33± 55.85	3.63	0.000
KOL / HDL	5.12 ± 3.10	9.50 ± 8.09	1.32	0.243
LDL / HDL	0.88 ± 1.06	0.41 ± 0/18	3.56	0.002
LDL / APO B	0.25 ± 0.28	0.08 ± 0.02	5.85	0.000
APO A1 /B	1.35 ± 0.55	1.19 ± 0,48	0.72	0.472
NONHDL(mg/dl)	156.60 ± 43.65	206.00 ± 37.96	2.71	0.008

Tablodaki değerler grup ayrımı yapılmadan ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

Tablo 27: Tüm çalışma grubunda Apo ε 4 allelinin başlangıç yaşı ve lipid profili üzerine etkisi

APO E FENOTİPİ	ε 4 (+) n=21	ε 4 (-) n=97	t tablo	p
BAŞLAMA YAŞI (yıl)	68.57 ± 9.03	68.16 ± 9.87	0.16	0,871
BMI (kg/m ²)	22.67 ± 2,96	24.43 ± 5.13	1.23	0.222
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	227.00 ±40.50	198.06 ± 44.55	2.74	0.007
TRİGLİSERİD(mg/dl)	177.09 ± 86.14	138.73 ± 48.70	1.97	0.061
HDL(mg/dl)	41.61 ± 14.16	44.61 ± 14.80	0.85	0.398
LDL(mg/dl)	151.85 ± 33.40	125.77 ± 38.95	2.79	0.006
VLDL(mg/dl)	32.60 ± 12.35	27.68 ± 10.05	1.91	0.058
APO A1(mg/dl)	213.90 ± 67.05	202.38 ± 61.53	0.76	0.448
APO B(mg/dl)	173.33 ± 53.61	157.58 ± 48.84	1.32	0.190
FOSFOLİPİD(mg/dl)	240.33 ± 46.23	223.80 ± 33.00	1.91	0.058
KOL / HDL	6.83 ± 5.01	5.02 ± 3.14	1.59	0.126
LDL / HDL	0.57 ± 0.67	0.92 ± 1.10	1.34	0.007
LDL / APO B	0.146 ± 0.16	0.26 ± 0.29	2.45	0.018
APO A1 /B	1.30 ± 0.45	1.35 ± 0.56	0.42	0.674
NONHDL(mg/dl)	185.33 ± 43.97	153.44 ± 42.87	3.08	0.003

Tablodaki değerler grup ayrımı yapılmadan ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

Apo ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 allellerinin serum lipid profiline olan etkisinin korelasyon testi ile karşılaştırılması yapılmıştır (Tablo 28). Apo ϵ 2 alleleline sahip bireylerde apo ϵ 3 ve ϵ 4 alleleline sahip olanlara göre trigliserid ($p<0.05$) fosfolipid ($p<0.05$), apo A1/apo B ($p<0.01$) ve LDL/apo B ($p<0.05$) düzeyleri anlamlı olarak yüksek, LDL/HDL ($p<0.05$) oranı anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Apo ϵ 3 alleleline sahip olan bireylerde apo ϵ 2 ve ϵ 4 alleleline sahip olanlara göre total kolesterol ($p<0.05$), trigliserid ($p<0.01$), apo B ($p<0.05$) , fosfolipid ($p<0.001$), kolesterol/HDL ($p<0.01$) ve nonHDL ($p<0.01$) seviyeleri anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Apo ϵ 4 alleleline sahip olan bireylerde apo ϵ 2 ve ϵ 3 alleleline sahip olanlara göre total kolesterol ($p<0.01$), trigliserid ($p<0.01$), LDL-kolesterol ($p<0.01$), kolesterol/HDL ($p<0.05$) ve nonHDL-kolesterol ($p<0.01$) seviyeleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Tablo 28 : Apo E allellerinin başlangıç yaşı ve serum lipid profili üzerine etkisi

	$\epsilon 2$		$\epsilon 3$		$\epsilon 4$	
	r	p	r	p	r	p
BAŞLAMA YAŞI (yıl)	-0.053	0.625	-0.058	0.590	0.071	0.510
BMI (kg/m ²)	0.058	0.611	0.110	0.338	-0.159	0.166
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	-0.102	0.271	-0.196	0.033	0.246	0.007
TRİGLİSERİD(mg/dl)	0.182	0.048	-0.311	0.001	0.251	0.006
HDL(mg/dl)	-0.054	0.556	0.138	0.134	-0.078	0.398
LDL(mg/dl)	-0.162	0.081	-0.173	0.062	0.251	0.006
VLDL(mg/dl)	0.068	0.464	-0.145	0.117	0.175	0.058
APO A1(mg/dl)	0.1558	0.095	-0.126	0.177	0.071	0.447
APO B(mg/dl)	-0.136	0.143	-0.222	0.016	0.104	0.263
FOSFOLİPİD(mg/dl)	0.193	0.038	-0.318	0.000	0.169	0.069
KOL / HDL	0.064	0.486	-0.268	0.003	0.193	0.035
LDL / HDL	0.210	0.023	0.090	0.335	-0.124	0.182
LDL / APO B	0.236	0.011	0.127	0.175	-0.167	0.075
APO A1 /B	0.295	0.001	0.067	0.472	-0.039	0.674
NONHDL(mg/dl)	-0.085	0.359	-0.244	0.008	0.274	0.003

Bulgular grup, yaş ve cinsiyet dikkate alınmadan ifade edilmiştir. r: regresyon katsayısı, p: anlamlılık değeri.

Apo $\epsilon 4$ varlığının hastalarda kardiyolojik bulguların varlığı ile karşılaştırılması yapıldığında $\epsilon 4$ alleleline sahip bireylerde kardiyolojik bulguların istatistiki olarak anlamlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 29) .

Apo $\epsilon 4$ alleli varlığının ailede kalp hastalığı varlığı ile ilişkisi karşılaştırıldığında ailede kalp hastalığı olan bireylerde $\epsilon 4$ allelinin istatistiki açıdan anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p < 0.05$) (Tablo 30) .

Tablo 29 : Apo E 4 alleli varlığının kardiyolojik bulgularla karşılaştırılması

	Kardiyolojik Bulgu Yok	Kardiyolojik Bulgu Var	Toplam
ε4 alleli taşımayanlar	48 %80.0	12 %20.0	60 %88.2
ε4 alleli taşıyanlar	3 %37.5	5 %62.5	8 %11.8
Toplam	51 %75.0	17 %25	68 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2=6.80$; $p < 0.05$; n=örnek sayısı)

Tablo 30 : Apo E 4 alleli varlığının ailede kalp hastalığı varlığı ile ilişkisi

	Ailede Kalp Hastalığı Yok	Ailede Kalp Hastalığı Var	Toplam
ε4 alleli taşımayanlar	42 %84.0	8 %16.0	50 %87.7
ε4 alleli taşıyanlar	3 %42.9	4 %57.1	7 %12.3
Toplam	45 %78.9	12 %21.1	57 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2=6.25$; $p < 0.05$; n=örnek sayısı)

Apo E 4 alleli varlığının ailede demans varlığı ile ilişkisi karşılaştırıldığında

ε4 alleleline sahip bireylerin %60'ında ailede demans olduğu saptanmış ve istatistiki anlamlılık kaydedilmiştir ($p<0.05$) (Tablo 31).

Tablo 31 : Apo E 4 alleli varlığının ailede demans varlığı ile ilişkisi

	Ailede Demans Yok	Ailede Demans Var	Toplam
ε4 alleli taşımayanlar	61 %69.3	27 %30.7	88 %85.4
ε4 alleli taşıyanlar	6 %40.0	9 %60.0	15 %14.6
Toplam	67 %65.0	36 %35.0	103 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2=4.84$; $p < 0.05$; n=örnek sayısı)

Alzheimer, Demans , Parkinson olgularında ve sağlıklı bireylerde ACE fenotiplerinin ve allellerinin dağılımları Tablo 32, 33, 34, 35’de gösterilmiştir.

Tablo 32: ACE fenotiplerinin gruplara göre dağılımı

ACE FENOTİPİ	DD	II	ID	TOPLAM
Alzheimer	8 %22.9	4 %11.4	23 %65.7	35 %26.9
Demans	12 %26.7	9 %20.0	24 %53.3	45 %34.6
Parkinson	7 %33.3	2 %9.5	12 %57.1	21 %16.2
Kontrol	9 %31.0	8 %27.6	12 %41.4	29 %22.30
Toplam	36 %27.7	23 %17.7	71 %54.6	130 %100

Tablo 33 :Kadınlarda ACE fenotipinin gruplara göre dağılımı

ACE FENOTİPİ	DD	II	ID	TOPLAM
Alzheimer	6 %23.3	3 %11.5	17 %65.4	26 %38.2
Demans	8 %32.0	5 %20.0	12 %48.0	25 %36.8
Parkinson	1 %12.5	1 %12.5	6 %75.0	8 %11.8
Kontrol	4 %44.4	1 %11.1	4 %44.4	9 %13.2
Toplam	19 %27.9	10 %14.7	39 %57.4	68 %100

Tablo 34 : Erkeklerde ACE fenotipinin gruplara göre dağılımı

ACE GENOTİPİ	DD	II	ID	TOPLAM
Alzheimer	2 %22.2	1 %11.1	6 %66.7	9 %14.5
Demans	4 %20.0	4 %20.0	12 %60.0	20 %32.3
Parkinson	6 %46.2	1 %7.7	6 %46.2	13 %21.0
Kontrol	5 %25.0	7 %35.0	8 %40.0	20 %32.3
Toplam	17 %27.4	13 %21.0	32 %51.6	62 %100

Tablo 35 : ACE allellerinin gruplara göre dağılımları

ACE Allelleri	D	I	TOPLAM
Alzheimer	39 %55.71	31 %44.28	70 %26.92
Demans	48 %53.33	42 %46.66	90 %34.61
Parkinson	26 %61.90	16 %38.09	42 %16.15
Kontrol	30 %51.72	28 %48.27	58 %22.30
Toplam	143 %55	117 %45	260 %100

ACE fenotiplerinin lipid profiline olan etkisi incelendiğinde apo A1 seviyesi II fenotipinde DD'ye göre , LDL/Apo B seviyesi ID fenotipinde DD ve II fenotiplerine göre ve LDL/HDL oranı ID fenotipinde II fenotipine göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$) (Tablo 36).

Tablo 36: Tüm çalışma grubunda ACE fenotiplerinin lipid profillerine etkisi

ACE FENOTİPİ	DD n=33	II n=21	ID n=62
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	205.50 ± 44.76	205.65 ± 39.48	201.23 ± 47.40
TRİGLİSERİD(mg/dl)	140.76 ± 52.78	152.50 ± 57.29	145.93 ± 62.41
HDL(mg/dl)	45.44 ± 15.59	46.25 ± 13.87	42.68 ± 14.51
LDL(mg/dl)	133.17 ± 35.51	132.45 ± 33.83	127.93 ± 42.89
VLDL(mg/dl)	28.08 ± 10.53	29.85 ± 11.56	28.33 ± 10.44
APO A1(mg/dl)	188.36 ± 54.95	233.38 ± 53.02	203.40 ± 65.49
APO B(mg/dl)	162.72 ± 56.35	178.00 ± 44.93	156.35 ± 48.95
FOSFOLİPID(mg/dl)	220.72 ± 27.26	240.33 ± 28.79	226.53 ± 41.35
KOL / HDL	5.15 ± 2.70	4.94 ± 1.91	5.56 ± 4.33
LDL / HDL	0.75 ± 1.10	0.39 ± 0.40	1.07 ± 1.11
LDL / APO B	0.18 ± 0.20	0.13 ± 0.14	0.32 ± 0.33
APO A1 / B	1.27 ± 0.54	1.36 ± 0.39	1.38 ± 0.59
NONHDL(mg/dl)	160.02 ± 43.68	159.40 ± 37.89	158.54 ± 47.53

Tablodaki değerler grup, yaş ve cinsiyet ayrımı yapılmadan ortalama ± standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar Oneway ANOVA testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı

ACE D allelinin serum lipid profilleri ve apolipoproteinler üzerine etkisi incelendiğinde (Tablo 37), Apo A1 seviyesinin ($p < 0.05$) D allelini taşıyanlarda D allelini taşımayanlara oranla anlamlı olarak azaldığı, LDL/HDL ($p < 0.001$), LDL/Apo B ($p < 0.05$) oranının ise anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir.

Tablo 37: ACE D fenotipinin serum lipid profilleri ve apolipoprotein üzerine etkisi.

ACE FENOTİPİ	D (+) n=98	D (-) n=21	t tablo	p
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	202.71 ± 46.31	205.65 ± 39.48	0.26	0.792
TRİGLİSERİD(mg/dl)	144.14 ± 59.03	152.50 ± 57.29	0.58	0.563
HDL(mg/dl)	43.64 ± 14.86	46.25 ± 13.87	0.72	0.471
LDL(mg/dl)	129.77 ± 40.34	132.45 ± 33.83	0.28	0.782
VLDL(mg/dl)	28.24 ± 10.42	29.85 ± 11.56	0.61	0.540
APO A1(mg/dl)	198.17 ± 62.16	233.38 ± 53.02	2.41	0.018
APO B(mg/dl)	158.56 ± 51.43	178.00 ± 44.93	1.60	0.112
FOSFOLİPİD(mg/dl)	224.51 ± 37.02	240.33 ± 28.79	1.84	0.069
KOL / HDL	5.42 ± 3.84	4.94 ± 1.91	0.54	0.589
LDL / HDL	0.96 ± 1.11	0.39 ± 0.40	3.92	0.000
LDL / APO B ...	0.27 ± 0.3	0.13 ± 0.14	3.04	0.003
APO A1 /B	1.34 ± 0.58	1.36 ± 0.39	0.16	0.877
NONHDL(mg/dl)	159.06 ± 46.01	159.40 ± 37.89	0.03	0.975

Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

ACE I allelinin serum lipid profilleri ve apolipoproteinler üzerine etkisi incelendiğinde (Tablo 38), Apo A1 ve LDL/apo B seviyelerinin I allelini taşıyanlarda I allelini taşımayanlara oranla arttığı fakat istatistiki anlamlılığa ulaşmadığı görüldü ($p>0.05$).

Tablo 38: ACE I fenotipinin serum lipid profilleri ve apolipoprotein üzerine etkisi.

ACE FENOTİPİ	I (+) n=83	I (-) n=33	t tablo	p
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	202.28 ± 45.45	205.50 ± 44.76	0.35	0.727
TRİGLİSERİD(mg/dl)	147.50 ± 60.96	140.76 ± 52.78	0.56	0.574
HDL(mg/dl)	43.53 ± 14.36	45.44 ± 15.59	0.64	0.525
LDL(mg/dl)	129.02 ± 40.74	133.17 ± 35.51	0.52	0.605
VLDL(mg/dl)	28.69 ± 10.67	28.08 ± 10.53	0.28	0.778
APO A1(mg/dl)	210.98 ± 63.32	188.36 ± 54.95	1.79	0.076
APO B(mg/dl)	161.83 ± 48.62	161.72 ± 56.35	0.09	0.936
FOSFOLİPİD(mg/dl)	230.02 ± 38.87	220.72 ± 27.26	1.26	0.212
KOL / HDL	5.42 ± 3.90	5.15 ± 2.70	0.37	0.711
LDL / HDL	0.90 ± 1.03	0.75 ± 1.10	0.72	0.473
LDL / APO B	0.27 ± 0.30	0.18 ± 0.20	1.87	0.065
APO A1 /B	1.37 ± 0.55	1.27 ± 0.54	0.93	0.355
NONHDL(mg/dl)	158.75 ± 45.20	160.02 ± 43.68	0.14	0.888

Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma (X ± SD) olarak verilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalar student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

ACE allellerinin lipid profili ile ilişkisi korelasyon testi ile incelendiğinde D allelini taşıyan bireylerde taşımayanlara göre istatistiki açıdan anlamlı olarak Apo A1 düzeyinin düştüğü ($p<0.05$), LDL/HDL oranının ise arttığı ($p<0.05$) gözlenmiştir. I allelini taşıyan bireylerde lipid profili ile herhangi bir ilişki saptanamamıştır($p>0.05$) (Tablo 39).

Tablo 39 : ACE allellerinin lipid profili üzerine etkisi

ACE ALLELLERİ	D		I	
	r	p	r	p
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	-0.02	0.792	-0.03	0.727
TRİGLİSERİD(mg/dl)	-0.053	0.563	0.052	0.574
HDL(mg/dl)	-0.06	0.471	-0.05	0.525
LDL(mg/dl)	-0.02	0.782	-0.04	0.605
VLDL(mg/dl)	-0.057	0.540	0.026	0.778
APO A1(mg/dl)	-0.21	0.018	0.165	0.076
APO B(mg/dl)	-0.14	0.112	-0.008	0.932
FOSFOLİPİD(mg/dl)	-0.169	0.069	0.116	0.212
KOL / HDL	0.050	0.589	0.034	0.711
LDL / HDL	0.204	0.027	0.067	0.473
LDL / APO B	0.182	0.051	0.147	0.117
APO A1 /B	-0.01	0.877	0.08	0.355
NONHDL(mg/dl)	-0.002	0.975	-0.013	0.888

Bulgular yaş ve cinsiyet dikkate alınmadan ifade edilmiştir. r: korelasyon katsayısı, p: anlamlılık değeri.

Apo E fenotipinin ACE fenotipine etkisini göstermek amacıyla birbirleri içindeki dağılımları tablo 40, 41, 42'de gösterilmiştir.

Tablo 40 : Apo E genotipinin ACE genotipine göre dağılımı

	APO E GENOTİPİ					
ACE GENOTİPİ	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4	TOPLAM
DD	4 %33.3	-	25 %25.8	6 %40	1 %50	36 %27.7
II	-	1 %25	21 %21.6	1 %6.6	-	23 %17.7
ID	8 %66.7	3 %75	51 %52.6	8 %53.3	1 %50	71 %54.6
TOPLAM	12 %9.2	4 %3.1	97 %74.6	15 %11.5	2 %1.5	130 %100

Tablo 41:Kadınlarda Apo E fenotipinin ACE fenotipine göre dağılımı

	APO E GENOTİPİ					
ACE GENOTİPİ	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4	TOPLAM
DD	2 %10.5	-	14 %73.7	2 %10.5	1 %5.3	19 %27.9
II	-	1 %10	8 %80	1 %10	-	10 %14.7
ID	2 %5.1	3 %7.7	26 %66.7	7 %17.9	1 %2.6	39 %57.4
TOPLAM	4 %5.9	4 %5.9	48 %70.6	10 %14.7	2 %2.9	68 %100

Tablo 42 :Erkeklerde Apo E fenotipinin ACE fenotipine göre dağılımı

	APO E GENOTİPİ					
ACE GENOTİPİ	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4	TOPLAM
DD	2 %11.8	-	11 %64.7	4 %23.5	-	17 %27.4
II	-	-	13 %100	-	-	13 %21.8
ID	6 %18.8	-	25 %78.1	1 %3.1	-	32 %51.6
TOPLAM	8 %12.9	-	49 %79.0	5 %8.1	-	62 %100

D alleli taşıma açısından Alzheimer, Demans ve Parkinson hasta grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında hasta gruplarında D allelinin frekansının arttığı fakat istatistiksel anlamlılık sınırına ulaşmadığı gözlemlendi ($p > 0.05$) (Tablo 43, 44, 45).

Tablo 43 : D alleli taşıma açısından Alzheimer ve Kontrol grubunun karşılaştırılması

Grup	Alzheimer	Kontrol	Toplam
D alleli taşımayanlar	4 %11.4	8 %27.6	12 %18.8
D alleli taşıyanlar	31 %88.6	21 %72.4	52 %81.3
Toplam	35 %54.7	29 %45.3	64 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2 = 2.71$; $p > 0.05$ ($p=0.09$) ; n =örnek sayısı)

Tablo 44 : D alleli taşıma açısından Demans ve Kontrol grubunun karşılaştırılması

Grup	Demans	Kontrol	Toplam
D alleli taşımayanlar	9 %20.0	8 %27.6	17 %23.0
D alleli taşıyanlar	36 %80.0	21 %72.4	57 %77.0
Toplam	45 %60.8	29 %39.2	74 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2 = 0.57$; $p > 0.05$ ($p=0.44$) ; n =örnek sayısı)

Tablo 45 : D alleli taşıma açısından Parkinson ve Kontrol grubunun karşılaştırılması

Grup	Parkinson	Kontrol	Toplam
D alleli taşımayanlar	2 %9.5	8 %27.6	10 %20.0
D alleli taşıyanlar	19 %90.5	21 %72.4	40 %80.0
Toplam	21 %42.0	29 %58.0	50 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2 = 2.48$; $p > 0.05$ ($p=0.11$) ; n=örnek sayısı)

Alzheimer hastalarında apo ϵ 4 ve ACE D alleli ilişkisi incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı olmasada ϵ 4 alleleline sahip tüm olguların ACE D alleli taşıdıkları tespit edilmiştir ($p>0.05$) (Tablo 46).

Tablo 46: Alzheimer hastalarında Apo ϵ 4 ve ACE D alleli ilişkisi

Grup	ϵ 4 alleli taşımayanlar	ϵ 4 alleli taşıyanlar	Toplam
D alleli taşımayanlar	4 %14.3	-	4 %11.4
D alleli taşıyanlar	24 %85.7	7 %100	31 %88.6
Toplam	28 %80	7 %20.0	35 %100

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2 = 1.12$; $p > 0.05$ ($p=0.28$); n=örnek sayısı)

Apo ϵ 4 ve ACE D allellerinin herikisine birden sahip olanlarla olmayanlar lipid profili açısından karşılaştırıldığında bu allellere sahip bireylerde VLDL ($p<0.05$), trigliserid ($p<0.05$), nonHDL-kolesterol ($p<0.001$), LDL ($p<0.05$), total

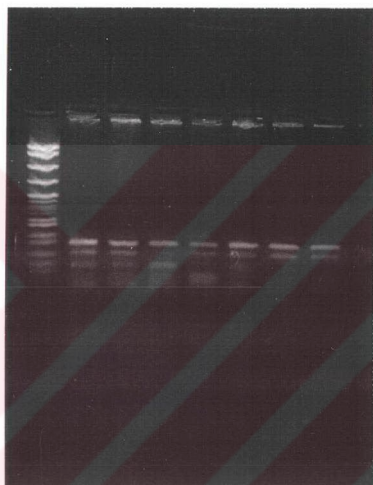
kolesterol/HDL ($p<0.01$), total kolesterol ($p<0.05$) düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (Tablo 47).

Tablo 47: Apo ε 4 ve ACE D alleleline sahip olanlarla olmayanların lipid profili açısından karşılaştırılması

	APO ε 4 ACE D TAŞIYANLAR	APO ε 4 ACE D TAŞIMAYANLAR	t tablo	p
TOTAL KOLESTEROL (mg/dl)	224.36 ± 41.14	199.15 ± 44.86	2.27	0.025
TRİGLİSERİD(mg/dl)	184.31 ± 87.46	132.12 ± 48.42	2.24	0.037
HDL(mg/dl)	39.89 ± 13.44	44.88 ± 14.82	1.36	0.175
LDL(mg/dl)	149.61 ± 34.11	126.70 ± 39.17	2.32	0.022
VLDL(mg/dl)	33.83 ± 12.39	27.55 ± 9.9	2.36	0.02
APO A1(mg/dl)	208.94 ± 68.57	203.69 ± 60.86	0.34	0.737
APO B(mg/dl)	174.57 ± 56.29	159.63 ± 49.47	1.18	0.242
FOSFOLİPID(mg/dl)	237.57 ± 47.54	225.38 ± 33.33	1.35	0.179
KOL / HDL	7.09 ± 5.21	5.01 ± 3.11	1.68	0.107 0.009*
LDL / HDL	0.61 ± 0.70	0.90 ± 1.09	1.50	0.142 0.61*
LDL / APO B	0.15 ± 0.17	0.26 ± 0.29	2.30	0.027 0.54*
APO A1 / B	1.26 ± 0.47	1.36 ± 0.56	0.68	0.499
NONHDL(mg/dl)	184.42 ± 46.04	154.56 ± 42.85	2.78	0.006

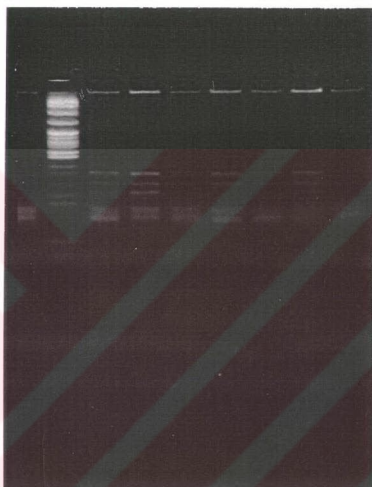
Tablodaki değerler ortalama ± standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. Gruplar arası önemlilik derecesi student t testi ile yapılmıştır, n: örnek sayısı.

* Mann-Whitney U testine göre elde edilen p değeri.



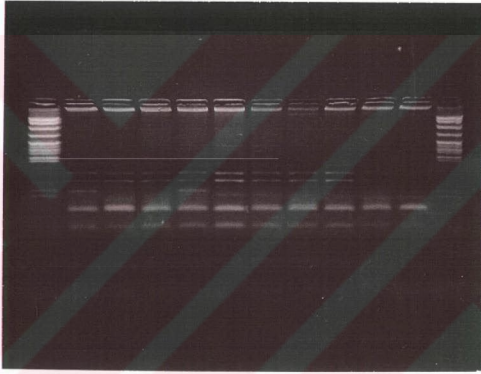
Marker 3/4 3/4 4/4 3/3 3/4 3/3 3/3

Fotoğraf 1: Alzheimer hastalarına ait bir apo E fenotiplemesi örneği.



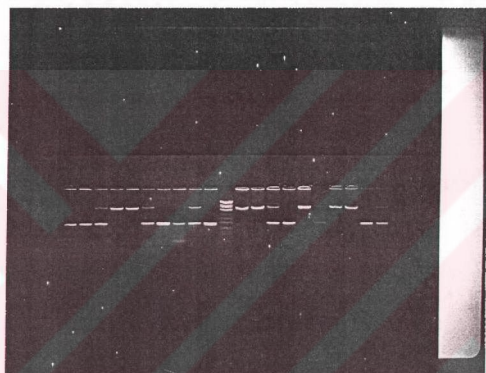
Marker 2/3 2/3 3/3 3/3 2/3 Kontrol(-)

Fotoğraf 2: Parkinson hastalarına ait bir apo E fenotiplemesi örneği.



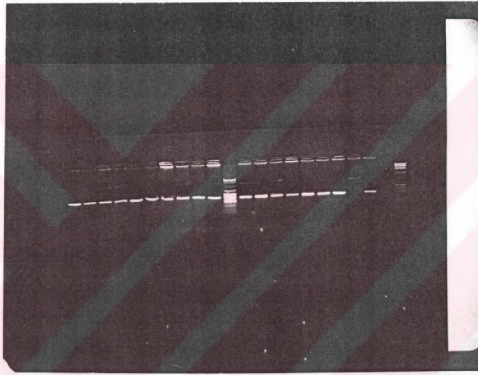
Marker 3/4 3/3 3/3 3/4 3/3 3/3 3/3 3/3 3/3 3/3 Marker

Fotoğraf 3: Demans hastalarına ait bir apo E fenotiplemesi örneği.



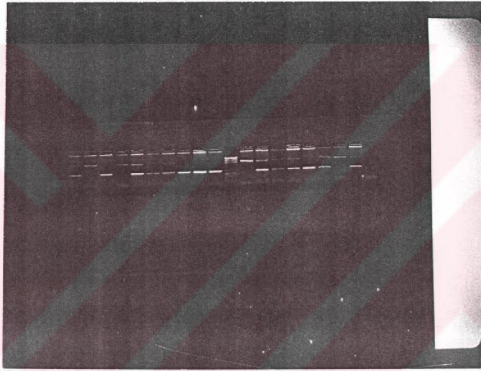
DD DD ID II II ID DD DD ID DD Marker II II ID DD II ID II II DD ID

Fotoğraf 4 : Alzheimer hastalarına ait bir ACE fenotipleme örneği.



DD ID ID ID DD DD DD ID DD ID Marker ID II ID ID DD DD DD II ID Kontrol (-) Marker

Fotoğraf 5 : Parkinson hastalarına ait bir ACE fenotipleme örneği.



ID II DD II ID ID ID DD DD DD Marker II ID ID ID DD ID II ID Kontrol (-)

Fotoğraf 6: Demans hastalarına ait bir ACE fenotipleme örneği.

5 - TARTIŞMA VE SONUÇ

Alzheimer ve Parkinson gibi demansiyel hastalıkların etki mekanizmasının tam olarak açıklığa kavuşmamasının başlıca nedeni insan beyinde araştırma yapma zorluğudur. Kesin tanının ancak postmortem çalışmalarla konulabilmesi araştırmacıları yaşam sürecinde hastalık öncesi tanıya götürecek sorumlu faktörleri aramaya yöneltmiştir. Son zamanlarda bu faktörler içerisinde en çok araştırılan konu apolipoprotein E gen polimorfizmidir.

Bu tez çalışmasında sinir sistemindeki önemli görevlerinden dolayı apolipoprotein E gen polimorfizmi, lipid profili ve ayrıca apo E ile sinerjetik etkisi olduğu düşünülen ACE gen polimorfizmi Alzheimer, Parkinson ve Demans tanısı konmuş olgularda ve sağlıklı yaşlılarda saptanarak bu hastalıkların gelişimlerindeki etkileri araştırılmıştır.

Çalışmamıza katılan Alzheimer ($22.71 \pm 3.89 \text{ kg/m}^2$), Parkinson ($23.60 \pm 3.36 \text{ kg/m}^2$), ve demans ($24.65 \pm 4.33 \text{ kg/m}^2$) tanısı konmuş olgularımızın ve kontrol grubumuzun ($24.50 \pm 6.32 \text{ kg/m}^2$) vücut kütle indekslerinin (Body Mass Index, BMI) cinsiyet ve yaş farkı gözetmeksizin incelendiğinde (Tablo 2) Brad'in kriterlerine göre normal oldukları saptanmıştır (25 kg/m^2 'nin altı normal, $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$ arası normalden fazla kilolu ve 30 kg/m^2 'nin üstü şişman olarak sayılmaktadır). Hasta

grubunda vücut kütle indekslerinde görülen düşüklüğün demansa bağlı olarak yetersiz beslenmeden kaynaklandığı izlenimi elde edilmiştir.

Kardiyovasküler bozuklukların ve Alzheimer gibi bazı demansiyel hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynayan apolipoprotein E 19. kromozomda yer alan 34.000 dalton moleköl ağırlıklı bir lipoprotein bileşenidir. Üç yaygın izoform olan apo E2, E3 ve E4 arasında 112 ve 158. pozisyonda yer alan tek bir aminoasit kalıntısında farklılık vardır⁶⁰. Yapılan çalışmalarda apo ε4 allel frekansının Alzheimer hastalarında anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir^{4,19,64,75,79,82,101,102,119}. Apo E4 immunokimyasal olarak senil plaklarda ve nörofibriler yumaklarda bulunmakta ve β amilod peptide çok büyük bir afinite ile bağlanarak senil plakların başlıca bileşenini oluşturmaktadır^{117,119,120}. İn vitro çalışmalarda apo E2 ve E3'ün nörofibriler yumaklarda bulunan ve mikrotubul stabilizasyonunda görev alan tau proteiniyle bağlanarak çiftleşmiş helikal filamentlerin oluşumunu azalttığı, bu nedenle Alzheimer hastalığında koruyucu bir faktör olduğu gösterilmiştir. Tersine apo E4'ün tau proteinine bağlanma yeteneğine sahip olmadığından hastalık için bir risk oluşturduğu aynı çalışmalarda saptanmıştır^{90,117}. Apo E3'ün izoforma özgü bir mekanizma ile nörit büyümesi ve uzamasını uyarırken E4'ün hem büyümeyi hem de dallanmayı inhibe ettiği bildirilmiştir^{73,94}. Apo E4 allelerinden biri yada ikisinin varlığının Alzheimer hastalığına yakalanma riskini yaklaşık üç kat artırdığı, başlangıç yaşını doza bağımlı olarak düşürdüğü^{19,25,64}, apo E2 allelinin riski düşürerek başlangıç yaşını artırdığı gösterilmiştir^{11,34,113,121}. Jarvik ve arkadaşlarının⁴⁵, Alzheimer hastalarında yapmış oldukları çalışmada başlangıç yaşı artışının apo E fenotiplerine göre ε2 allele

sahip hastalarda en yüksek ve $\epsilon 4$ alleleline sahip hastalarda en düşük olarak sıralandığını göstermişlerdir.

Bulgularımızın $\epsilon 2$ alleleline sahip hastaların başlangıç yaşlarının yüksek, $\epsilon 4$ alleleline sahip olanların ise düşük olmasıyla literatürle uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir.

Mahley ve arkadaşları⁵⁹ genel Türk popülasyonunda yaklaşık 9000 kişide yaptıkları çalışmada apolipoprotein E fenotip ve allel frekanslarını ($E4/4$ %1.1, $E3/4$ %12.9, $E3/3$ %74.2, $E2/3$ %10.6, $E2/2$ %0.4, $E2/4$ % 0.8, $\epsilon 4$ %7.9, $\epsilon 3$ %86, $\epsilon 2$ %6.1) şeklinde tespit etmişlerdir.

Biz de çalışmamızda apolipoprotein E fenotip ve allel frekanslarını ($E4/4$ %1.5, $E3/4$ %11.5, $E3/3$ %74.6, $E2/3$ %9.2, $E2/2$ %0, $E2/4$ %3.1, $\epsilon 4$ %8.8, $\epsilon 3$ %85, $\epsilon 2$ %6.1) Mahley ve arkadaşlarına yakın olarak saptadık.

Pek çok çalışmada apo $\epsilon 4$ allel frekansının Alzheimer hastalığında anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. İngiltere’de Mowat ve arkadaşlarının⁶⁹ yaptığı çalışmada apo $\epsilon 4$ allel frekansının Alzheimer hastalığında kontrollere göre yaklaşık üç kat; Amerika’da Jarvik ve arkadaşları⁴⁵ yaklaşık iki kat, Saunders ve arkadaşları^{101,102} yaklaşık üç kat, Kalaria ve arkadaşları⁴⁶ yaklaşık üç kat, Mayeux ve arkadaşları⁶⁴ yaklaşık üç kat, Strittmatter ve arkadaşları¹¹⁹ yaklaşık üç kat, Schneider ve arkadaşları¹¹⁴ , yaklaşık üç kat; Japonya’da Kawano ve arkadaşları⁴⁹ yaklaşık iki kat, Noguchi ve arkadaşları⁷⁵ yaklaşık üç kat; Kanada’da Poirier ve arkadaşları⁸² üç kat arttığını bildirilmişlerdir.

Apo E allellerinin gruplara göre dağılımları incelendiğinde (Tablo 18,19) $\epsilon 4$ allelinin frekansının Alzheimer’da (%11) ve Demans olgularında (%13) kontrole (%1.7) göre istatistiki olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$).

Parkinson grubunda ise $\epsilon 4$ allel frekansının (%4.7) kontrole göre anlamlı fark göstermediği ($p>0.05$) fakat $\epsilon 2$ allelinin (Tablo 23) (%11.9) kontrollere (%1.66) göre istatistiki açıdan anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$).

Harrington ve arkadaşları ⁴⁰, Parkinsonda $\epsilon 4$ ve alleli açısından anlamlı fark olmadığını göstermişlerdir. Bulgularımız apo $\epsilon 4$ alleli açısından Harrington ve arkadaşları ⁴⁰ 'nın yaptığı araştırma ile uyum içindedir. Fakat $\epsilon 2$ alleli artışı bakımından elde ettiğimiz bulgu ile ilgili bir literatüre rastlamadığımızdan aralarında ilişki kurmamız mümkün olmamıştır.

Yaptığımız literatür çalışmasında Alzheimer hastalığı ve diğer demansların görülme olasılığının genellikle kadınlarda arttığı saptanmasına rağmen ^{5,89,126} bazı toplumlarda ise bunun tam aksi de rapor edilmiştir. ³².

Alzheimer hastalığının cinsiyete göre dağılımı kontrollerle karşılaştırıldığında (Tablo 22), Alzheimer hastalığının kadınlarda (%75) erkeklere (%24) göre istatistiki olarak ileri derecede anlamlı şekilde arttığı belirlendi ($p<0.001$). Apo $\epsilon 4$ alleli taşıyan kadın ve erkekler karşılaştırıldığında (Tablo 21), $\epsilon 4$ allel frekansının kadınlarda (%87.5) erkeklere (%12.5) göre istatistiki olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$). Biz de çalışmamızda kadınlarda Alzheimer hastalığının görülme olasılığının erkeklere göre daha fazla olduğunu saptadık. Bulgumuz literatürle uyum içerisinde olmasına rağmen değerlerin rastlantısal olabileceğini de düşünmekteyiz.

Apo E ve apo A1'in birlikte sinir yaralanması sonrası aksonal rejenerasyon ve remiyelinizasyon süresince lipid metabolizması ile alakalı oldukları bildirilmiştir ¹⁵. Bu araştırmaya göre sinir tamiri sırasında apo E'nin sinir sistemi tarafından

üretimi artarken, apo A1'in de plazma lipoproteinleri ile hasar bölgesine taşınımının arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle plazmada apo A1 seviyesindeki azalma, sinir dokusundaki düzeyinin düşmesine ve Alzheimer için ek bir risk teşkil etmesine sebep olmaktadır ^{15,49}.

Total kolesterol her ikisinde aterojenik olan LDL-kolesterol ve apolipoprotein B ile ilişkili etki göstermektedir. Apo E genotipinin LDL-kolesterol ve apo B seviyeleri üzerine etkisi total kolesterole olan etkisi ile paraleldir. Alzheimerlilerin beyinlerindeki amiloid birikimlerinde ve nörofibriler yumaklarda apo E gibi apo B'nin de immunreaktivite gösterdiği bildirilmiştir ^{45,120}.

Apo E'nin başlıca üç izoformunun plazma lipidlerinin ve lipoproteinlerinin normal türevleri üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Apo ε4 yüksek plazma total kolesterol ve LDL-kolesterol ve düşük apo E düzeyleri ile bağlantılıdır. Apo ε2 ise düşük total kolesterol ve LDL -kolesterol ve yüksek trigliserid, VLDL-kolesterol ve apoE düzeyleri ile ilişkilidir⁵⁷. Bu açıdan bakıldığında apo ε2 ve ε4'ün resiprokal etkisi ortaya çıkmaktadır²⁹. Apoε4'ün plazmada özellikle trigliserid yönünden zengin lipoproteinlerle (VLDL) ilişkili olduğu gösterilmiştir ⁵⁷. Apoε3 ve apo ε2 ise öncelikle HDL ile ilişkili olduğu bildirilmiştir⁶⁰. ε 4 alleli yüksek total kolesterole sahip genç bireylerde daha çok bulunurken, bu sayı yüksek total kolesterol / ilerlemiş yaşlarda azalmakta en düşük seviyesine düşük kolesterole sahip yaşlı bayanlarda ulaşmaktadır ⁴⁵. Bunun sebebinin birçok araştırmada da bildirildiği gibi ilerleyen yaşa bağlı olarak ε 4 allel frekansının azalması gösterilmiştir ^{84,103}. Apo ε4'te VLDL-kolesterol miktarındaki artış, VLDL kolesterolünün karaciğere etkin olarak götürülmesiyle sonuçlanacağından, apo ε4'ün LDL-kolesterol'de artışa neden olabileceği ileri sürülmektedir. Apo ε4 içeren VLDL , apo ε3 içeren

partiküllere göre plazmadan daha hızlı temizlemektedir. Apo $\epsilon 4$ içeren lipoprotein miktarındaki artış , LDL reseptörlerinin azalması dolayısıyla LDL alımında azalma ve plazma LDL-kolesterol düzeylerinde artış ile sonuçlandığı sanılmaktadır⁶⁰. Apo $\epsilon 2$, LDL-kolesterol düzeylerinin azalmasına, dolayısıyla LDL reseptörlerinin artmasına yol açmaktadır. Apo $\epsilon 2$ gen çifti apo $\epsilon 4$ 'ün tersine plazma trigliserid düzeylerinin yükselmesine neden olduğu açıklanmıştır⁶⁰.

Çeşitli toplumlarda yapılan çalışmalarda, apo $\epsilon 4$ 'ün yüksek plazma trigliserid, total ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü ve koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir^{16,26,42,47,54,70,104}.

Deney gruplarında Apo E allellerinin lipid profillerine etkisi incelendiğinde (Tablo 25), apo $\epsilon 2$ alleleline sahip olgularda trigliserid %22 ve fosfolipid düzeylerinin %9 oranında istatistiki olarak anlamlı şekilde arttığı gözlemlendi ($p<0.05$). Total kolesterol seviyesi %6, LDL-kolesterol %14, apo B %11 ve nonHDL-kolesterol'ün %6.8 oranında düştüğü, VLDL-kolesterol %7 ve apo A1 seviyesinin ise %14 oranında $\epsilon 2$ alleleline sahip olgularda $\epsilon 2$ alleleline sahip olmayanlara göre arttığı fakat istatistiki anlamlılığa ulaşmadığı saptanmıştır($p>0.05$). Burada $\epsilon 2$ allelinin hipertrigliseridemik ve hipokolesterolemik etkisi gözlenmektedir. Ayrıca apo $\epsilon 2$ Alzheimer hastalarında β amiloidlere daha düşük afinite ile bağlandığı , ilerleyen yaşla frekansının arttığı ve uzun ömür ile pozitif ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{103,121}. Bu sonuçlara göre $\epsilon 2$ allelinin ateroskleroz ve demans gelişiminde koruyucu etkisinin olduğunu söylemek mümkündür. Bu açıdan sonuçlarımız literatürle uyum içindedir.

Apo ε3 allelinin lipid profillerine etkisi incelendiğinde (Tablo 26), total kolesterol %20, apo B %33, fosfolipid %23, nonHDL-kolesterol %31 oranında ε3 alleleline sahip olmayan olgularda ε3 alleleline sahip olanlara göre istatistiki açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Aynı olgularda trigliserid %59, LDL-kolesterol %26 VLDL-kolesterol %29, apo A1 %17 oranında artmış , HDL-kolesterol ise %22 oranında düşmüş fakat istatistiki olarak anlamlılık sınırına ulaşmamıştır ($p>0.05$) .

Apo ε4 allelinin lipid profillerine etkisi incelendiğinde (Tablo 27), total kolesterol %15, LDL-kolesterol %18, VLDL-kolesterol %15, apo B %9, fosfolipid %7, ve nonHDL-kolesterol %17 oranında ε4 alleleline sahip olgularda ε4 alleleline sahip olmayanlara göre istatistiki açıdan anlamlı olarak yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Aynı olgularda trigliserid %27 ve apo A1 %5.6 oranında artmış fakat istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Burada ε4 allelinin ε2 alleleline zıt olarak hiperkolesterolemik ve hipertrigliseridemik etkisi ortaya çıkmaktadır. Bunun nedeni ise ε4 allelinin VLDL'nin katabolizmasını arttırmasından kaynaklandığı düşünülebilir. Bulgularımız apo ε4'ün aterogenik etkisini de bir noktada kanıtlamaktadır.

Apo E'nin karaciğerden fosfolipidlerle disk yapmış bir şekilde salınabildiği ve apo E düzeyinin apo ε2 alleleline sahip olanlarda yüksek, apo ε4 alleleline sahip olanlarda ise düşük olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{60,110}. Biz de bu bilgilerden hareket ederek apo E fenotipleri ile serum fosfolipid seviyeleri arasında bir ilişkinin varlığını araştırdık. Ancak yaptığımız araştırma sonucu apo E fenotipleri ile fosfolipid düzeyleri arasında direkt bir etkileşim olmadığı kanısına vardık. Bu düşüncemizin başlıca nedeni ise, apo E allelleri ile serum fosfolipid

düzeylerinin beklediğimiz sonuçların dışında bir değişim göstermesidir. Apo ε3 alleli taşıyan olgularda fosfolipid düzeyleri ileri derecede anlamlı olarak düşük ($p<0.001$), ε2 ve ε4 alleli taşıyanlarda ise anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Dolayısı ile apo E allelleri ile serum fosfolipid düzeyleri arasında bir ilişki kurulamamış, yapılan literatür çalışmasında da bu konuda bir bilgiye rastlanmamıştır.

Çalışmamızda apo ε4 alleleline sahip olanlarda kardiyolojik bulguların istatistiki olarak anlamlı şekilde arttığı gözlenmiştir (Tablo 30) . Aynı olgularda ailede kalp hastalığı ve demans hikayesinin anlamlı olarak arttığı saptanmıştır. Bu bulgular bizi ε4 allelinin kalıtımının hem kardiyovasküler hastalıklara hem de demansiyel hastalıklara yatkınlıkta çok önemli bir rol oynadığı kanısını uyandırmaktadır. Bu bulgumuz literatütle uyum içindedir⁵² .

Lipid profillerinin çalışma gruplarına göre dağılımlarını incelediğimizde; Alzheimer ve kontrol grubunun **kadınları** karşılaştırıldığında (Tablo 5) Alzheimer'lı kadınlarda kontrollere göre total kolesterol %6, apo A1 seviyesi %9 oranında artmış fakat istatistiki anlamlılığa ulaşmamıştır. Apo B seviyesi Alzheimer'lı kadınlarda kontrollere göre %25 oranında istatistiki olarak anlamlı şekilde düşmüştür ($p<0.01$). Tablo 5'de verilen diğer parametrelerde istatistiki açıdan anlamlı fark elde edilmemiştir ($p>0.05$). Alzheimer ve kontrol grubunun **erkekleri** karşılaştırıldığında (Tablo 6) Alzheimer'lı erkeklerde kontrollere göre total kolesterol %9, apo A1 %22, Apo B %19 ve fosfolipid seviyesi %9 oranında istatistiki açıdan anlamlı olmayan bir düşüklük saptanmıştır ($p>0.05$). Alzheimer hastası **kadın ve erkek** olgular karşılaştırıldığında (Tablo 5 ve 6) fosfolipid seviyesinin %17 oranında kadınlarda erkeklere göre istatistiki açıdan anlamlı

olarak ($p<0.05$), total kolesterol %16 ve nonHDL-kolesterol seviyesinin %21 oranında istatistiki anlamlılığa yakın olarak arttığı saptanmıştır . Triglicerid %16, LDL-kolesterol %18, VLDL-kolesterol %12, apo A1 %39, apo B %2 oranında kadınlarda erkeklere göre artmış, fakat istatistiki anlamlılığa ulaşmamıştır. Bunun nedeninin ise Alzheimer'lı kadınlarda apo ε4 allelinin erkeklerden fazla olmasından kaynaklandığı kanısı elde edilmiştir.

Demans ve kontrol grubunun **kadınları** karşılaştırıldığında (Tablo 7), total kolesterol %14, LDL -kolesterol %17 ve nonHDL-kolesterol seviyeleri %16 oranında demans grubunda düşmüş, fakat istatistiki anlamlılığa ulaşmamıştır. Demans ve kontrol grubunun **erkekleri** karşılaştırıldığında (Tablo 8) total kolesterol %9, LDL-kolesterol %11, apo A1 %12, apo B %18 ve nonHDL-kolesterol %12 oranında demanslarda azalmış, fakat bu değişim istatistiki anlamlılığa ulaşmamıştır. Demans grubunun **kadın ve erkekleri** karşılaştırıldığında (Tablo 7 ve 8), total kolesterol %7, LDL-kolesterol %31 ve nonHDL-kolesterol %31 oranında kadınlarda istatistiki olarak anlamlı şekilde erkeklere göre artmıştır ($p<0.05$). Kadınlarda fosfolipid %24 ve apo B seviyesinde %17 oranında görülen artış istatistiki anlamlılığa ulaşmamıştır ($p>0.05$). LDL/apo B %71 ve LDL/HDL %51 oranında kadınlarda erkeklere göre istatistiki açıdan anlamlı şekilde düşüş göstermişlerdir ($p<0.05$) . Demanslarda kadınlarda total kolesterol ve LDL-kolesterol seviyelerindeki artışın apo ε4 allel frekansının erkeklerden daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği izlenimi elde edilmiştir.

Parkinson ve kontrol grubunun **kadınları** karşılaştırıldığında (Tablo 9), LDL-kolesterol %27, apo A1 %24, apo B %25 oranında Parkinsonlu olgularda istatistiki olarak anlamlı şekilde düşüş göstermiştir($p<0.05$). Total kolesterol'de

%9 oranındaki düşüklük ve trigliserid düzeyinde %39'luk artış istatistiki anlamlılığa ulaşmamıştır ($p>0.05$) . Parkinson ve kontrol grubunun **erkekleri** karşılaştırıldığında (Tablo 10), total kolesterol %18, LDL-kolesterol %21, apo A1 %39, apo B %30, fosfolipid %9, nonHDL-kolesterol %19 oranında Parkinson grubunda istatistiki olarak anlamlı şekilde düşük bulundu ($p<0.05$). Trigliserid seviyesinde %11, HDL-kolesterolde %14, VLDL-kolesterolde %1'lik düşüş istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Parkinson grubunun **kadın ve erkekleri** karşılaştırıldığında (Tablo 9-10), fosfolipid seviyesi %20 oranında istatistiki olarak anlamlı şekilde kadınlarda erkeklere göre yüksek bulunmuş($p<0.05$), fakat trigliserid seviyesinde %65 ve VLDL-kolesterol'de %36 oranında gözlenen yükselmenin istatistiki açıdan anlamlı olmadığı saptanmıştır($p>0.05$). Parkinson hastalarında lipid profillerinde özellikle total kolesterol ve LDL-kolesterol seviyelerindeki azalmalar bu hasta grubunda $\epsilon 2$ allel frekansının yüksek olmasından kaynaklandığı izlenimi elde edilmiştir (Tablo 15). Parkinsonda kadınlarda $\epsilon 2$ ve $\epsilon 4$ alleli frekansları yüksek olduğundan VLDL-kolesterol ve trigliserid yüksek, total ve LDL-kolesterol seviyeleri ise düşük bulunmuştur (Tablo 16). Burada apo $\epsilon 2$ ve $\epsilon 4$ allellerinin resiprokal etkisinin söz konusu olduğu kanısına varılmıştır. Bulgularımızın literatürle uyum içinde olduğu gözlenmiştir¹⁸¹.

Yaptığımız literatür çalışmasında lipid profillerinin demansiyel hastalıklarda kontrollere göre anlamlı fark göstermediklerini saptadık^{20,118}. Çalışma gruplarımızda elde ettiğimiz istatistiki anlamlılığa ulaşmayan farklılıkların apo E allellerinin farklı dağılımlarından kaynaklandığı sonucuna vardık.

Yapılan populasyon çalışmalarında kardiyovasküler hastalıklarla ACE D allelinin ilişkisi gösterilmiş fakat anlamlılık derecesinin çalışılan topluma göre değiştiği bildirilmiştir^{2,20,22,61,62,72,83}. Ayrıca ACE D allelinin apo ε 4 alleli ile birlikte olduğunda kardiyovasküler hastalıkların ciddiyetini arttırdığı son çalışmalarda gösterilmiştir^{13,103,124}. Çalışmamızda apo ε 4 allelinin kardiyovasküler hastalıklarda olduğu gibi Alzheimer hastalığında da ACE D alleli ile ilişkili olup olmadığını araştırdık. Yaptığımız istatistiksel çalışma sonucunda Alzheimer, Demans ve Parkinsonlu olgularda ACE D allelinin frekansının kontrol grubuna göre yüksek olduğu fakat istatistiksel anlamlılığa ulaşmadığını gözledik (Tablo 43,44,45).

ACE D allelinin demansiyel hastalıklardaki lipid profili üzerindeki etkisini daha iyi anlayabilmek için apo ε 4 ve ACE D allelini birlikte taşıyan hastaları bu allellere sahip olmayanlarla karşılaştırdığımızda (Tablo 27,37,47), lipid profillerindeki değişimin ACE D allelinden değil apo ε 4 allelinin bir etkisi olarak geliştiği izlenimi elde edilmiştir.

Yaptığımız literatür araştırması sonucu ACE gen polimorfizminin kardiyovasküler hastalıklar üzerindeki etkisinin lipid profilleri üzerinden değil özellikle ACE enzim düzeylerindeki artışla oluşan düz kas hücre proliferasyonu ile yaptığını gözlemledik. Biz de ACE fenotiplerine göre lipid dağılımını incelediğimizde fenotipler arasında önemli bir değişim saptamadık. Bulgularımızın literatür ile uyum içinde olduğunu tespit ettik¹²⁴. Bu bulgularımıza dayanarak ACE gen polimorfizminin lipid profilleri üzerindeki etkisinin Alzheimer hastalığında da değişmediği kanısı elde edilmiştir (Tablo 36).

Yaptığımız literatür taramasında demansiyel hastalıklarda apo ε4 ile ACE D geninin ortak ilişkisini açıklayan bir bilgiye rastlamadık. Fakat çalışmamızda Alzheimer hastalarında apo ε 4 allelini taşıyan bütün olgularımızın ACE D alleleline de sahip olduklarını gözlemledik (Tablo 46). Bu nedenle henüz mekanizmasını tam açıklayamasak da kardiyovasküler hastalıkların gelişimde gözlenen apo ε 4 ile ACE D allelerinin sinerjetik etkisinin Alzheimer hastalığında da var olduğu kanısındayız.

Sonuç olarak diyebiliriz ki;

1- Türk toplumunda apo ε 4 allelinin diğer pek çok populasyon çalışmasında da gösterildiği gibi Alzheimer ve diğer demansiyel hastalıklarının gelişiminde ve başlangıç yaşının düşmesinde önemli bir genetik faktör olabileceği gözlenmiştir.

2- Türk toplumunda kadınlarda apo ε 4 allel frekansı ve Alzheimer hastalığı insidansının yüksek olabileceği saptanmıştır.

3- Alzheimer hastalarında apo ε 2 allelinin başlangıç yaşının yükselmesinde etkili olduğu ve dolayısıyla Alzheimer hastalığı için koruyucu fonksiyona sahip olduğu gözlenmiştir.

4- Apo ε 2 allel frekansı Parkinson hastalarında yüksek bulunmuştur. Bu durum literatürle desteklenememiştir.

5- Alzheimer, Parkinson ve demans grupları kontrol grubuna göre lipid profilleri açısından çok anlamlı farklılık göstermemektedir.

6- Serum fosfolipid düzeylerinin apo E allelleri ile ilişkili olmadığı gözlenmiştir.

7-Genel olarak tüm çalışma gruplarında apo ϵ 2 allellerinin lipid profilleri üzerindeki etkisi araştırıldığında diğer çalışmalarla benzer sonuçlar elde edilmiştir (apo ϵ 4 alleleline sahip olanlarda total kolesterol ve LDL-kolesterol yüksek; apo ϵ 2 alleleline sahip olanlarda ise düşük bulunmuştur).

8- Apo ϵ 4 allelinin özellikle ACE D alleli ile birlikte olduğu ve D allel frekansının Alzheimer ve diğer demansiyel hastalıklarda arttığı gözlenmiştir.

9- Apo ϵ 4 ile ACE D allellerini lipid profiline etkisi karşılaştırıldığında ise, ACE D allelinin lipid profilinde etkili olmadığı, bu değişimlerde özellikle apo ϵ 4'ün etkili olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızın sonuçlarını daha anlamlı kılabilmek için çalışma gruplarımızın sayısını arttırmayı, serum apo E ve ACE enzim düzeylerini ölçmeyi amaçlamaktayız. Bu şekilde apo E ve ACE allellerinin ekspresyon ürünlerinin serum apo E ve ACE enzim düzeyleri üzerindeki etkilerini inceleyerek bu hastalıkların gelişimlerdeki fonksiyonlarını açıklığa kavuşturabileceğimiz kanısındayız.

6.ÖZET

Bu çalışmada 37 Alzheimer, 47 Demans, 21 Parkinson tanısı konmuş olguda ve 29 sağlıklı kişide lipid profilleri, apolipoprotein E ve ACE gen polimorfizmi saptanmış ve serum profilleri dağılımına etkileri incelenmiştir.

Serum lipid düzeyleri enzimatik yöntemlerle tayin edilmiştir. Serum apolipoprotein A1 ve apolipoprotein B düzeyleri ise türbidimetrik yöntemle çalışılmıştır. Toplam 130 örnekten elde edilen DNA'lardan apo E ve ACE gen polimorfizmi saptamak için Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (Polimerase Chain Reaction, PCR), Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) agaroz jel elektroforez yöntemleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda Alzheimer ve Demans hastalarında apo ϵ 4 allelinin, Parkinson hastalarında ise apo ϵ 2 allelinin anlamlı olarak arttığını saptadık. Çalışma sonucunda lipid düzeyleri incelendiğinde hasta gruplarında sağlıklı bireylere göre anlamlı değişiklik tespit edilmemiştir. Ancak apo E allellerinin lipid düzeyleri üzerine etkisi araştırıldığında ϵ 2 allelinin düşük , ϵ 4 allelinin yüksek total kolesterol ve LDL-kolesterol seviyelerinden sorumlu olduğu gözlenmiştir.

Alzheimer ve demans olgularında $\epsilon 4$ allelinin demans açısından pozitif aile hikayesi ve kardiyolojik bulguların varlığı ile paralel olarak arttığı saptanmıştır. ACE allel frekanslarının demansiyel hastalıklarda sağlıklı bireylere göre anlamlı fark göstermedikleri aynı zamanda ACE allellerinin serum lipid profilleri üzerinde etkili olmadığı gözlenmiştir. Kardiyolojik hastalıklarda olduğu gibi demansiyel hastalıklarda da apo $\epsilon 4$ allelinin daha çok ACE D alleli ile birlikte bulunduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre apo $\epsilon 4$ allelinin Türk toplumunda da Alzheimer hastalığının gelişiminde önemli bir rol oynadığı izlenimi elde edilmiştir.



7.SUMMARY

In this study, lipid profiles of sera, apolipoprotein E (apo E) and Angiotensin Converting Enzyme (ACE) gene polymorphism and also the effect of these polymorphisms on the lipid profiles were investigated in patients with 37 Alzheimer's disease, 21 Parkinson's disease, 47 other type of Dementia and 29 healthy people.

Lipid levels of sera have been determined by the enzymatic methods. Serum apolipoprotein A1 (apo A1) and apolipoprotein B (apo B) levels of sera were measured using turbidimetric methods. Apolipoprotein E and ACE gene polymorphisms have been determined by Polymerase Chain Reaction (PCR), and Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and agarose gel electrophoresis techniques.

In patients with Alzheimer and dementia apo ϵ 4 allele increased significantly, whereas apo ϵ 2 allele increased patients with Parkinson disease.

No considerable changes have been observed at lipid profiles in the patient groups as compared to the healthy group.

When the effects of the apo E isoform on lipid profiles were evaluated, we have found allele of apo ϵ 4 associated with the higher total cholesterol of serum, whereas allele of apo ϵ 2 associated with the lower total cholesterol of serum.

In Alzheimer and Dementia cases, apo ϵ 4 allele has been found to increase in correlation with positive family history and cardiologic findings regarding Dementia. ACE allele frequencies have not shown any considerable difference between patients with Dementia and healthy individuals. In addition, ACE alleles have been found out not to effective on serum lipid profiles.

We have found that, like cardiographical diseases, in dementia diseases allele of apo ϵ 4 is associated with allele of ACE D.

In the light of these results, apo ϵ 4 allele seems to play an important role to cause development the Alzheimer's disease in Turkish population.



8.ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Tekirdağ'da doğdum. İlk öğrenimimi İstanbul Yedikule İlkokulunda, orta öğrenimimi Yedikule Lisesinde, Lise Öğrenimimi Şehremini Lisesi'nde tamamladım. 1993 yılı haziran döneminde İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümünden mezun oldum. 1995 güz yarılılında İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde Moleküler Tıp Yüksek Lisans öğrenimime başladım. Halen İ.Ü. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım.

Tıb.Biy. Bedia Ağaçhan

9. KAYNAKLAR

1. American College of Medical Genetics / American Society of Human Genetics Working group on Apo E and Alzheimer Disease: Statement on use of apolipoprotein E testing for Alzheimer disease. JAMA, 274; 1627-1629, 1995.
2. Anderson B., Sylven C.: The genotype of the angiotensin-converting enzyme gene is associated with increased mortality in idiopathic heart failure. J. Am Coll. Cardiol., 28:162-7, 1996.
3. Appel E., Eisenberg S., Roitelman J.: Improved PCR amplification / HhaI restriction for unambiguous determination of apolipoprotein E alleles. Clin Chem, 41/2; 187-190, 1995.
4. Arendt T., Schindler C., Brückner M.K., Eschrich K., Bigl V., Zedlick D., Marcova L.: Plastic neuronal remodeling is impaired in patients with Alzheimer's disease carrying apolipoprotein ϵ 4 allele. J Neurosci, 17(2); 516-529, 1997.
5. Aronson M.K., Ooi W.L., Morgenstern H., Hafner A., Masur D., Crystal H.: Women, myocardial infarction, and dementia in the very old. Neurology, 40; 1102-1106, 1990.
6. Avramopoulos D., Mikkelsen M., Vassilopoulos D., Grigoriadou M., Petersen M.B.: Apolipoprotein E allele distribution in parents of Down's syndrome children. Lancet, 347; 862-865, 1996.
7. Bannister R.: Dementia and higher cerebral function. In: Brain and Bannister's Clinical Neurology, Oxford University Press, Part 10, 7th edition, 283-295, 1992.
8. Basu S.K., Brown M.S., Ho Y.K., Havel R.J., Golstein J.L.: Mouse macrophages synthesize and secrete a protein resembling apolipoprotein E. Proc Natl Acad Sci USA, 78;7545-7549, 1981.
9. Basu S.K., Ho Y.K., Brown M.S., Bilheimer D.W., Anderson R.G.W., Golstein J.L.: Biochemical and genetic studies of apolipoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. J Biol Chem, 257; 9788-9795, 1982.
10. Beal M.F., Richardson E.P., Martin J.B.: Degenerative disease of the nervous system. In : Harrison's Principles of Internal Medicine, 12th edition, 2060-2064, 1992.
11. Benjamin R., Leake A., McArthur F.K., Ince P.G., Candy J.M., Edwardson J.A., Morris C.M., Bjertness E.: Protective effect of apo E ϵ 2 in Alzheimer's disease. Lancet, 344; 473, 1994.

12. Birchall J.D., Chappel J.S.: The chemistry of aluminum and silicon in relation to Alzheimer's disease. *Clin. Chem.* 34/2; 265-267, 1988.
13. Bockxmeer F.M., Mamotte C.D.S., Gibbons F.A., Burke V., Taylor R.R.: Angiotensin-Converting Enzyme and apolipoprotein E genotypes and restenosis after Coronary Angioplasty. *Circulation*, 92; 2066-2077, 1995.
14. Boyles J.K., Pitas R.E., Wilson E., Mahley R.W., Taylor J.M.: Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J.Clin. Invest.* 76; 1501-1513, 1985.
15. Boyles J.K., Zoellner C.D., Anderson L.J., Kosik L.M., Pitas R.E., Weisgraber K.H., Hui D.Y., Mahley R.W., Gebicke-Haerter P.J., Ignatus M.J., Shooter E.M.: A role for apolipoprotein E, Apolipoprotein A-I, and low density lipoprotein receptors in cholesterol transport during regeneration and myelination of the rat sciatic nerve. *J.Clin. Invest.* 83; 1015-1031, 1989.
16. Braeckman L., Bacquer D.D., Rosseneu M., Backer G.D: Apolipoprotein E polymorphism in middle-aged Belgian men: phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins. *Atherosclerosis*, 120; 67-63, 1996.
17. Breitner C.S., Silvermen J.M., Mohs R.C., Davis K.L.: Familial aggregation in Alzheimer's disease: Comparison of risk among relatives of early-and late-onset cases, and among male and female relatives generations. *Neurology*, 38; 207-212, 1988.
18. Brenner D.E., Kukull W.A., Van Belle G., Bowen J.D., McCormick W.C., Teri L., Larson E.B.: Relationship between cigarette smoking and Alzheimer's disease in a population-based case-control study. *Neurology*, 42; 1322, 1992.
19. Brousseau T., Legrain S., Berr C., Gourlet V., Vidal O., Amouyel P.: Conformation of the e4 allele of the apolipoprotein E gene as a risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*, 44; 342-344, 1994.
20. Cambien F., Poirier O., Lecerf L., Evans A., Cambou J-P., Arveiler D., Luc G., Bard J-M., Bara I., Ricard S., Tiret L., Amouyel P., Alhenc-Gelas F., Soubrier F.: Deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*, 359:641-4, 1992.
21. Candy J.M., Oakley A.E., Klinowski J., Carpenter T.A., Perry R.H., Blessed G., Fairbairn A., Edwardson J.A.: Aluminosilicates and senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Lancet*, feb 15,; 354-356, 1986.
22. Castellano M., Muiesan M.L., Rizzoni D., Beschi M., Pasini G., Cinelli A., Salvetti M., Porteri E., Bettoni G., Kreutz R., Lindpaintner K., Rosei E.A.: Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population. *Circulation*. 91: 2721-4, 1995.

23. Clark A.F., Sharp M.G.F., Mullins J.J.: Gene targeting and its application to basic hypertension research. *Clinical Science*, 90: 435- 46, 1996.
24. Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Rimmler J.B., Locke P.A., Conneally P.M.: Apolipoprotein E, survival in Alzheimer's disease patients, and the competing risks of death and Alzheimer's disease. *Neurology*, 45; 1323-1328, 1995.
25. Corder E.H., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D.E., Gaskell P.C., Small G.W., Roses A.D., Haines J.L., Pericak-vance M.A.: Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and risk of Alzheimer's disease in late-onset families. *Science*, 261; 921-923, 1993.
26. Davignon J., Greg R.E., Sing C.F.: Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis . *Atherosclerosis* 8: 1-21, 1988.
27. Ellefson R.D., Caraway W.Y.: Lipids and lipoproteins . In: *Fundamentals of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company, P: 474-541, 1976.
28. Elshourbagy N.A., Liao W.S., Mahley R.W., Taylor J.M.: Apolipoprotein E mRNA is most abundant in the brains and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82; 203-207, 1985.
29. Eto M, Watanabe K., Ishii K.: Reciprocal effects of apolipoprotein E alleles (ϵ 2 and ϵ 4) on plasma lipid levels in normolipidemic subjects. *Clinical Genetics*, 29; 477-484, 1986.
30. Evans D.A., Funkenstein H.H., Albert M.S., Scherr P.A., Cook N.R., Chown M.J., Hebert L.E., Hennekens C.H., Taylor J.O.: Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons higher than previously reported. *JAMA*, 262; 2551-2556, 1989.
31. Evans K.C., Berger E.P., Cho C.G., Weisgraber K.H., Lansbury P.T. Jr.: Apolipoprotein E is a kinetic but not a thermodynamic inhibitor of amyloid formation: Implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92; 763-767, 1995.
32. Fratiglioni L., Grut M., Forsell Y., Viitanen M., Grafström M., Holmen K., Ericson K., Backman L., Ahlbom A., Winblad B.: Prevalence of Alzheimer's disease and other dementias in an elderly urban population: Relationship with age, sex, and education. *Neurology*, 41; 1886-1892, 1991.
33. Free Radicals and Toxicology. In : *Free Radicals in Biology and Medicine*. Halliwell B., Gutteridge J. Oxford University Press, Part 6, Second Edition, 350-466, 19
34. Gearing M., Schneider J.A., Rebeck G.W., Hyman B.T., Mirra S.S.: Alzheimer's Disease with and without coexisting Parkinson's Disease changes:

- Apolipoprotein E genotype and neuropathologic correlates. *Neurology*, 45; 1985-1990, 1995.
35. George-Hyslop St P.H., Tanzi R.E., Polinsky R.J., Haines J.L., Nee L., Watkins P.C., Myers R.H., Feldman R.G., Pollen D.: The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*, 235; 885-890, 1987.
 36. Girolami V., Frosch M.P., Anthony D.C.: The Central Nervous System. In : *Pathologic Basis of Disease*. Cotran, Kumar, Robbins. 5th edition. W.B. Saunders Company, 1329-1356, 1994
 37. Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., Mant R., Newton P., Rooke K., Roques P., Talbot C., Pericak-Vance M., Roses A.D., Williamson R., Rossor M., Owen M., Hardy J.: Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349; 704-706, 1991.
 38. Goedert M., Strittmatter W.J., Roses A.D.: Risky apolipoprotein in brain. *Nature*, 372; 45-46, 1994.
 39. Hardy J.A., Higgins G.: Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256; 184-185, 1992.
 40. Harrington C.R., Louwagie J., Rossau R., Vanmechelen E., Perry R.H., Perry E.K., Xuereb J.H., Roth M., Wischik C.M.: Influence of Apolipoprotein E genotype on senile dementia of the Alzheimer and Lewy body types. *Am.J.Pathol.*, 145; 1472-1484, 1994
 41. Harrington C.R., Wischik C.M., Taylor G.A., Edwardson J.A., Candy J.M.: Alzheimer's-disease-like changes in tau protein processing: association with aluminium accumulation in brains of renal dialysis patients. *Lancet*, 343; 993-997, 1994.
 42. Hixson J.E. and the Pathological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group: Apolipoprotein E polymorphism affect atherosclerosis in young males. *Arterioscler Thromb* 11 : 1237-44, 1991.
 43. Ignatius M.J., Shooter E.M., Pitas R.E., Mahley R.W.: Lipoprotein uptake by neuronal growth cones in vitro. *Science*, 236; 959-962, 1987.
 44. Ignatius M.J., Gebicke-Harter P., Pate Skene J.H., Schilling J.W., Weisgraber K.H., Mahley R.W., Shooter E.M.: Expression of apolipoprotein E during nerve degeneration and regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83; 1125-1129, 1986.
 45. Jarvik G.P., Wijsman E.M., Kukull W.A., Schellenberg G.D., Yu C., Larson E.B.: Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: A case control study. *Neurology*, 45; 1092-1096, 1995.

- 46.Kalaria R.N., Premkumar D.R.D.: Apolipoprotein E genotype and cerebral amyloid angiopathy. *Lancet*, 346;1424,1995.
- 47.Kao J-T., Tsai K-S., Chang C-J., Huang P-C.: The effects of apolipoprotein E polymorphism on distribution of lipids and lipoproteins in the Chinese population. *Atherosclerosis* 114 : 55-9, 1995.
- 48.Katzman R., Galasko D.R., Saitoh T., Chen X., Pay M.M., Booth A., Thomas R.: Apolipoprotein e4 and head trauma: Synergistic or additive risks? *Neurology*, 46; 889-891, 1996.
- 49.Kawano M., Kawakami M., Otsuka M., Yashima H., Yaginuma T., Ueki A.: Marked decrease of plasma apolipoprotein AI and AII in Japanese patients with late-onset non-familial Alzheimer's disease. *Clinica Chimica Acta*, 239; 209-211, 1995.
- 50.Keefover R.W.: The clinical epidemiology of Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology*, 14; 337-351, 1996.
- 51.Kontula K., Aalto-Setälä K., Kuusi T., Hamalainen L., Syvanen A.C.: Apolipoprotein E polymorphism determined by restriction enzyme analysis of DNA amplified by polymerase chain reaction: Convenient alternative to phenotyping by isoelectric focusing. *Clin. Chem.* 36/12; 2087-2092, 1990.
- 52.Kosunen O., Talasniemi S., Lehtovirta M., Heinonen O., Helisalmi S., Mannermaa A.: Relation of coronary atherosclerosis and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer patients. *Stroke*, 26; 743-748, 1995.
- 53.Lehtovirta M., Soininen H., Helisalmi S., Mannermaa A., Helkala E.-L., Hartikainen P.: Clinical and neuropsychological characteristics in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 46; 413-419, 1996.
- 54.Lenzen H.J., Assman G., Buckwalsky R., Schulte H.: Association of apolipoprotein E polymorphism , low density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease. *Clin Chem* 32 / 5 : 778-81, 1986.
- 55.Lippa C.F.,Saunders A.M., Smith T.W., Swearer J.M., Drachman D.A., Ghetti B., Nee L.: Familial and sporadic Alzheimer's Disease: Neuropathology cannot exclude a final common pathway. *Neurology*, 46; 406-412, 1996.
- 56.Ma J., Yee A., Brewer H.B., Das S., Potter H.: Amyloid-associated proteins α 1-antichymotrypsin and apolipoprotein E promote assembly of Alzheimer β -protein into filaments. *Nature*, 372; 92-94, 1994.
- 57.Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall Jr S.C., Weisgraber K.H. and Taylor J.M.: Apolipoprotein E : genetic variants provide insights into its structure and function. *Curr Opin Lipidol* 1 : 87-95, 1990.

58. Mahley R.W., Nathan B.P., Bellosta S., Pitas R.E.: Apolipoprotein E : impact of cytoskeletal stability in neurons and the relationship to Alzheimer's disease. *Current Opinion in Lipidology*, 6; 86-91, 1995.
59. Mahley R.W., Paloğlu K.H., Atak Z., Dawson-Pepin J., Langlois A.m., Cheung V., Onat H., Fulks P., Mahley L.L., Vakar F., Özbayrakçı S., Gökdemir O., Winkler W.: Turkish Heart Study: Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J. Lipid Res.* 36; 839-59, 1995.
60. Mahley R.W.: Apolipoprotein E : cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240; 622-630, 1988.
61. Marian A.J., Yu Q.T., Workman R., Greve G., Roberts R.: Angiotensin-converting enzyme polymorphism in hypertrophic cardiomyopathy and sudden cardiac death. *Lancet*, 342; 1085-1086, 1993.
62. Mattu R.K., Needham E.W.A., Galton D.J., Frangos E., Clark A.J.L., Caulfield M.: A DNA variant at the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the caerphilly heart study. *Circulation*, 91: 270-4, 1995.
63. Mayeux R., Ottman R., Maestre G., Ngai B.S., Tang M-X., Gingsberg H.: Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein e4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology*, 45; 555-557, 1995.
64. Mayeux R., Stern Y., Ottman R., Tatemichi T.K., Tang M., Maestre G., Ngai C., Tycko B., Ginsberg H.: The apolipoprotein ε4 allele in patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol.*, 34; 752-754, 1993.
65. McGowan M.W., Artiss J.D., Stranbergh D.R., Zak B.: A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem*, 29 / 3 : 538-42, 1983.
66. McKhann G., Drachman D., Folstein M., Katzman R., Price D., Stadlan M.: Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: Report of the NINCDS-ARDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's disease. *Neurology*, 34; 939-944, 1984.
67. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.S.: Simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 16 / 3 : 1215., 1988.
68. Mirra S.S., Heyman A., McKeel D., Sumi S.M., Crain B.J., Brownlee L.M., Vogel F.S., Hughes J.P.: The consortium to establish a registry for Alzheimer's disease (CERAD). *Neurology*, 41; 479-486, 1991.
69. Movat B.F., Skinner E.R., Watt C., Corrigan F.M., Rhijn A.g., Cousland G., Horrobin D.F.: Lipoprotein profiles in Alzheimer's disease : lack of an effect of apolipoprotein E4 phenotype on the distribution of high density lipoprotein subfractions. *Alzheimer's Research*, 2; 89-94, 1996.

70. Muros M., Rodriguez-Ferrer C.: Apolipoprotein E polymorphism influence on lipids, apolipoproteins and Lp (a) in a Spanish population underexpressing apo E4. *Atherosclerosis* 121 : 13-21, 1996.
71. Myers R.H., Schaefer E.J., Wilson P.W.F., D'Agostino R., Ordovas J.M., Espino A., Au R., White R.F.: Apolipoprotein E e4 association with dementia in a population-based study: The Framingham study. *Neurology*, 46; 673-677, 1996.
72. Nakai K., Itoh C., Miura Y., Hotta K., Musha T., Itoh T., Miyakawa T., Iwasaki R., Hiramori K.: Deletion polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation*, 90: 2199-2202, 1994.
73. Nathan B.P., Bellosta S., Sanan D.A., Weisgraber K.H., Mahley R.W., Pitas R.E.: Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science*, 264; 850-852, 1994.
74. National Institute on Aging / Alzheimer's Association Working Group: Apolipoprotein E genotyping in Alzheimer's disease. *Lancet*, 347; 1091-1095, 1996.
75. Noguchi S., Murakami K.: Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's Disease. *Lancet*, 342; 737-738, 1993.
76. Onaka L. I.: Lipids. In: *Clinical Chemistry Concepts and Applications*. Anderson S.C., Cockayne S. Saunders London, 1993.
77. Paik Y.K., Chang D.J., Reardon C.A., Davies G.E., Mahley R.W., Taylor J.M.: Nucleotide sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82; 3445-3449, 1985.
78. Payami H., Montee K.R., Kaye J.A., Bird T.D., Yu C.E., Wijsman E.M., Schellenberg G.D.: Alzheimer's disease, apolipoprotein E4, and gender. *JAMA*, 271; 1316-1317, 1994.
79. Peacock M.L., Fink J.K.: Apo E e4 allelic association with Alzheimer's disease: Independent confirmation using denaturing gradient gel electrophoresis. *Neurology*, 44; 339-341, 1994.
80. Petersen R.C., Smith G.E., Ivnik R.J., Tangalos E.G., Schaid D.J., Thibodeau S.N., Kokmen E., Waring S.C., Kurland L.T.: Apolipoprotein E status as a predictor of the development of Alzheimer's disease in memory-impaired individuals. *JAMA*, 273; 1274-1278, 1995.
81. Plum F.: The Dementias. In: *Textbook of Medicine*. Wyngaarden J.B., Smith L.H. 18th edition, W.B. Saunders Company, 2087-2091, 1988.

82. Pourier J., Davignon J., Bouthillier D., Kogan S., Bertrand P., Gauthier S.: Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*, 342; 697-699, 1993.
83. Raynolds M.V., Bristow M.R., Bush E.W., Abraham W.T., Lowes B.D., Zisman L.S., Taft C.S., Perryman M.J.: Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with ischaemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet*, 342: 1073-5, 1993.
84. Rebeck G.W., Perls T.T., West H.L., Sodhi P., Lipsitz L.A., Hyman B.T.: Reduced apolipoprotein e4 allele frequency in the oldest old Alzheimer's patients and cognitively normal individuals. *Neurology*, 44; 1515-1516, 1994.
85. Richey P.L., Siedlak S.L., Smith M.A., Perry G.: Apolipoprotein E interaction with the neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer disease: Implications for disease pathogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 208; 657-663, 1995.
86. Richmond W.: Preparation and properties of a cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin Chem* 19 / 2 : 1350-6, 1973.
87. Rifai N., King M.E.: Immunoturbidimetric assays of apolipoproteins A, AI, AII, and B in serum. *Clin Chem* 32 / 6 : 957-61, 1986.
88. Rigat B., Hubert C., Corvol P., Soubrier F.: PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene. *Nucl. Acids Res.*, 20; 1433, 1992.
89. Rocca W.A., Bonaiuto S., Lippi A., Luciani P., Turtu' F., Cavarzeran F., Amaducci L.: Prevalence of clinically diagnosed Alzheimer's disease and other dementing disorders: A door-to-door survey in Appignano, Macerata Ptovince, Italy. *Neurology*, 40; 626-631, 1990.
90. Roses A.D., Saunders A.M., Corder E.H., Pericak-Vance M.A., Han S.S., Einstein G., Hulette C., Schmechel D.E., Holsti M., Huang D., Risch N.J., Haines J.L., Goedert M., Jakes R., Dong L.M., Weisgraber K.H., Strittmatter W.J.: Influence of the susceptibility genes apolipoprotein E- ϵ 2 on the rate of disease expressivity of late-onset Alzheimer's disease. *Arzneim-Frog/Drug Res.* 45(1); 413-417, 1995.
91. Roses A.D., Saunders A.M.: ApoE is a major susceptibility gene for Alzheimer's disease. *Current Opinion in Biotechnology*, 5; 663-667, 1994.
92. Roses A.D.: Apolipoprotein E genotyping in the differential diagnosis, not prediction, of Alzheimer's disease. *Ann Neurology*, 38; 6-14, 1995.
93. Roses A.D.: Apolipoprotein E in neurology. *Current Opinion in Neurology*, 9; 265-270, 1996.

94. Roses A.D.: Perspective on the metabolism of Apolipoprotein E and Alzheimer's diseases. *Experimental Neurology*, 132; 149-156, 1995.
95. Rossor M.N.: The Demantias. In : *Neurology in Clinical Practice*. Bradley, Daroff, Fenichel, Marsden. Second edition, 1583-1599, 1996.
96. Sakoda S., Kuriyama M., Osame M., Takahashi K., Yamano T. : Apolipoprotein E e4. *Neurology*, 44; 2420-2421, 1994.
97. Samani N.J., Martin D.S., Brack M., Cullen J., Wallis R., Lodwick D., Cauhan A., Harley A., Thomson J.R., Gerslick A.H., Bono D.P.: Apolipoprotein E polymorphism does not predict risk of restenosis after coroner angioplasty. *Atherosclerosis*, 125; 209-216, 1996.
98. Samani N.J., O'toole L., Matrin D., Rai H., Fletcher S., Lodwick D., Thompson J.R., Morice A.H., Channer K., woods K.L.: Insertion / Deletion polymorphism in the angiotensin-converting enzyme and risk of and prognosis after myocardial infarction. *J. Am. Coll Cardiol*, 28: 338-44, 1996.
99. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning : A laboratory manual*, 2nd edition, New York Cold Spring Harbor Laboratory Press 9.19, 1989.
100. Sanan D.A., Weisgraber K.H., Russel S.J., Mahley R.W., Huang D., Saunders A., Schmechel D., Wisniewski T., Frangione B., Roses A.D., Strittmatter W.J.: Apolipoprotein E associates with β amyloid peptide of Alzheimer's disease to form novel monofibrils. *J.Clin. Invest.* 94; 860-869, 1994.
101. Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D., St. George-Hyslop P.H., Pericak-Vance M.A., Joo S.H., Rosi B.L., Gusella J.F.: Association of apolipoprotein E allele e4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43; 1467-1472, 1993.
102. Saunders A.M., Schmechel D., Breitner JCS., Benson M. D., Brown WT., Goldfarb L., Goldgaber D., Manwaaring MG., Szymanski MH., McCown N., Schmechel DE. Strittmatter WJ., Pericak-Vance MA., Roses AD: Apolipoprotein E e4 allele distributions in late-onset Alzheimer's disease and in other amyloid-forming disease. *Lancet*, 342; 710-711, 1993.
103. Schachter F., Faure-Delanef L., Guenot F., Rouger H., Froguel P., Lesueur-Ginot, Cohen D.: Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci. *Nature Genetics*, 6; 29-32, 1994.
104. Scheer W.D., Boudreau D.A., Malcom G.T., Middaugh J.P.: Apolipoprotein E and atherosclerosis in Alaska Natives. *Atherosclerosis* 114 : 197-202, 1995.
105. Schellenberg G.D., Bird T.D., Wisjman E.M., Moore D.K., Boehnke M., Bryant E.M., Lampe T.H., Nochlin D., Sumi S.M.: Absence of linkage of chromosome 21q21 markers to familial Alzheimer's disease. *Science*, 241; 1507-1510, 1988.

106. Schellenberg G.D., Bird T.D., Wisjman E.M., Orr H.T., Anderson L., Nemens E., White J.A., Bonnycastle L., Weber J.L., Alonso M.E.: Genetic linkage evidence for a familial Alzheimer's disease locus on chromosome 14. *Science*, 258; 668-671, 1992.
107. Schellenberg G.D.: Genetic dissection of Alzheimer disease, a heterogeneous disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92; 8552-8559, 1995.
108. Schellenberg G.D.: Molecular genetics of familial Alzheimer's disease. *Arzneim-Frog/Drug Res.* 45(1); 418-424, 1995.
109. Schmechel D.E., Saunders A.M., Strittmatter W.J., Crain B.J., Hulette C.M., Joo S.H., Pericak-Vance M.A., Goldgeber D., Roses A.D.: Increased amyloid B-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90; 9649-9653, 1993.
110. Schmidt S.B., Wasseman A.G., Muesing R.A., Schlesselman S.E., Larosa J.C., Ross A.M.: Lipoprotein and apolipoprotein levels in angiographically defined coronary atherosclerosis. *Am. J. Cardiol.* 55; 1459-1462, 1985.
111. Schneider J.A., Gearing M., Robbins R.S., l'Aune W., Mirra S.S.: Apolipoprotein E genotype in diverse neurodegenerative disorders. *Ann Neurol*, 38; 131-135, 1995.
112. Skene J.H.P. and Shooter E.M.: Denervated sheatcells secrete a new protein after nerve injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80; 4169-4173, 1983.
113. Smith A.D., Sim E., Nagy Z., Jobst K.A., Hindley N., King E.: Protective effect of apo E ϵ 2 in Alzheimer's disease. *Lancet*, 344; 473-474, 1994.
114. Smith C.M.: Alzheimer's Disease. In : *Neurotransmitters, Drugs and Disease*. Webster R.A. 428-445, 1989.
115. Snipes G.J., McGuire C.B., Norden J.J., Freeman J.A.: Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by nonneuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83; 1130-1134, 1986.
116. Soubrier F., Alhenc-Gelas F., Hubert C., Allegrini J., John M., Tregear G., Corvol P.: Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85; 9386-9390, 1988.
117. Strittmatter W.J., Saunders A.M., Goedert M., Weisgraber K.H., Dong L.M., Jakes R., Huang D.Y., Pericak-Vance M., Schmechel D., Roses A.D.: Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule -associated protein tau: Implications for Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91; 11183-11186, 1994.

118. Strittmatter W.J., Roses A.D.: Apolipoprotein E and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92; 4725-4727, 1995.
119. Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G.S., Roses A.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*, 90; 1977-1981, 1993.
120. Strittmatter W.J., Weisgraber K.H., Huang D.Y., Dong L.M., Salvesen G.S., Pericak-Vance M.A., Schmechel D.E., Saunders A.M., Goldberger D., Roses A.D.: Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid β peptide: Isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90; 8098-8102, 1993.
121. Talbot C., Lendon C., Craddock N., Shantia S., Morris J.C., Goate A.: Protection against Alzheimer's disease with apoE ϵ 2. *Lancet*, 343; 1432-1433, 1994.
122. Tanzi R.E., St George-Hyslop P.H., Haines J.I., Polinsky R.J., Nee L., Foncin J.F., Neve R.L., McClatchey A.I., Conneally P.M., Gusella J.F.: The genetic defect in familial Alzheimer's disease is not tightly linked to the amyloid β -protein gene. *Nature*, 329; 156-157, 1987.
123. Tatzelt J., Maeda N., Pekny M., Yang S.L., Betsholtz C., Eliasson C., Cayetano J.: Scrapie in mice deficient in apolipoprotein E or glial fibrillary acidic protein. *Neurology*, 47; 449-453, 1996.
124. Ward A.J., Kane M.O., Nicholls D.P., Young I.S., Nevin N.C., Graham C.A.: A novel single base deletion in the LDLR gene (211 delG): Effect on serum lipid profiles and influence of other genetic polymorphism in the ACE, APOE and APOB genes. *Atherosclerosis*, 120; 83-91, 1991.
125. Werb Z. and Chin J.R.: Apoprotein E is synthesized and secreted by resident and thioglycollate-elicited macrophages but not by pyran copolymer- or bacillus Calmette Guerin-activated macrophages. *J Exp Med*, 158; 1272-1293, 1983.
126. Zhang M., Katzman R., Salmon D., Jin H., Cai G., Wang Z., Qu G., Grant I., Yu E., Levy P., Klauber M., Liu W.T.: The prevalence of dementia and Alzheimer's disease in Shanghai, China: Impact of age, gender, and education. *Ann Neurol*, 27; 428-437, 1990.