

**T. C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE APO E POLİMORFİZMİNİN KAN
LİPİT PARAMETRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**TEZ YÖNETİCİSİ
Prof. Güneş T. Yüregir**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. H. Gülçin Eskandari**

ADANA - 1997

Ateroskleroz, genetik ve çevresel faktörlerin etyopatogenezinde rol aldığı multifaktöryel hastalıklardandır. Özellikle gelişmiş batı toplumlarında, yüksek mortaliteyle seyretmesi nedeniyle bir halk sağlığı sorunu olarak ele alınmaktadır. Ülkemizde de, çevresel risk faktörlerine yönelik çalışmalar bulunmasına karşın, hastalığın genetik temeline yönelik veriler son derece sınırlıdır. Ateroskleroz patogenezinde rol oynadığı düşünülen genetik faktörlerden olan apolipoprotein E polimorfizmini yöremizde çalışarak, bu alandaki araştırmalara katkıda bulunduğumuz inancındayım.

Çalışmalarım süresince, bilgi ve birikimleriyle beni destekleyen ve bilimsel çalışmalar için beni özendiren tez danışmanım ve sevgili hocam Prof. Güneş T. Yüregir'e teşekkürü bir borç bilirim.

Uzmanlık eğitimim boyunca gerek bilimsel, gerek sosyal katkılarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma ve bölüm çalışanlarına ayrı ayrı teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TF.95-U.53 nolu proje ile destekleyen Ç. Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu'na ayrıca teşekkür ederim.

Dr. H. Gülçin Eskandari

Adana/1997

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----|
| Şekil Listesi..... | iv |
| Tablo Listesi..... | v |
| Özet..... | vi |
| Abstract..... | vii |
| I. Giriş ve Amaç..... | 1 |
| II. Genel Bilgiler..... | 3 |
| 1. Lipitler..... | 3 |
| 2. Plazma Lipoproteinleri..... | 3 |
| 3. Lipoprotein Metabolizması..... | 7 |
| 3.1. Apo B İçeren Lipoproteinlerin Sentez ve Katabolizması..... | 7 |
| 3.2. HDL sentez ve Katabolizması..... | 17 |
| 4. Apolipoprotein E..... | 19 |
| 4.1. Vücutta Dağılımı..... | 19 |
| 4.2. Yapısal Özellikleri..... | 20 |
| 4.3. Gen Yapısı..... | 20 |
| 4.4. Katıldığı Metabolik Olaylar..... | 23 |
| 4.4.1. Farklı organların hücreleri arasında lipitlerin dağılımı..... | 23 |
| 4.4.2. Bir organ ya da dokuda hücreler arasında lipitlerin dağılımı..... | 24 |
| 4.4.3. Lipit transportu ile ilgili olmayan fonksiyonları..... | 24 |
| 4.5. Polimorfizmi..... | 24 |
| 4.6. Kardiyovasküler Hastalıklarda Apo E Polimorfizmi..... | 26 |
| 4.7. Apo E Polimorfizmi ve Alzheimer Hastalığı..... | 29 |
| III. Gereç ve Yöntemler..... | 31 |
| 1. Araç ve Gereçler..... | 31 |
| 1.1. Cihazlar..... | 31 |
| 1.2. Kimyasal Maddeler..... | 31 |
| 1.3. Kitler..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 2. Örnek Toplama..... | 32 |
| 3. Analiz Yöntemleri..... | 33 |
| 3.1. Lipoprotein Elektroforezi..... | 33 |
| 3.2. Total Kolesterol Tayini..... | 33 |
| 3.3. LDL Kolesterol Tayini..... | 35 |
| 3.4. HDL Kolesterol Tayini..... | 35 |
| 3.5. Trigliserit Tayini..... | 36 |
| 3.6. Apolipoprotein AI Tayini..... | 38 |
| 3.7. Apolipoprotein B Tayini..... | 39 |
| 3.8. Lipoprotein (a) Tayini..... | 40 |
| 3.9. Tam Kandan DNA Eldesi..... | 43 |
| 3.10. PCR ile Apo E Geninin Amplifikasyonu..... | 45 |
| 3.10.1. Amplifikasyon koşulları..... | 46 |
| 3.10.2. PCR programı..... | 48 |
| 3.10.3. Amplifikasyon kontrolü..... | 48 |
| 3.11. RFLP ile Apo E Genotipinin Saptanması..... | 48 |
| 3.12. Elektroforez..... | 49 |
| 4. İstatistiksel Analiz..... | 50 |
| IV. Bulgular..... | 51 |
| V. Tartışma..... | 68 |
| VI. Sonuç..... | 79 |
| VII. Kaynaklar..... | 80 |

ŞEKİL LİSTESİ

| Şekiller | Sayfa Numarası |
|----------|----------------|
| Şekil 1 | 4, 5 |
| Şekil 2 | 9 |
| Şekil 3 | 10 |
| Şekil 4 | 11 |
| Şekil 5 | 12 |
| Şekil 6 | 14 |
| Şekil 7 | 16 |
| Şekil 8 | 18 |
| Şekil 9 | 21 |
| Şekil 10 | 22 |
| Şekil 11 | 22 |
| Şekil 12 | 27 |
| Şekil 13 | 28 |
| Şekil 14 | 47 |
| Şekil 15 | 53 |
| Şekil 16 | 54 |
| Şekil 17 | 55 |
| Şekil 18 | 55 |
| Şekil 19 | 56 |
| Şekil 20 | 57 |
| Şekil 21 | 57 |
| Şekil 22 | 58 |
| Şekil 23 | 61 |
| Şekil 24 | 62 |
| Şekil 25 | 62 |
| Şekil 26 | 63 |
| Şekil 27 | 63 |
| Şekil 28 | 64 |

TABLO LİSTESİ

| Tablolar | Sayfa Numarası |
|-----------------|-----------------------|
| Tablo I | 6 |
| Tablo II | 7 |
| Tablo III | 13 |
| Tablo IV | 25 |
| Tablo V | 25 |
| Tablo VI | 28 |
| Tablo VII | 34 |
| Tablo VIII | 35 |
| Tablo IX | 36 |
| Tablo X | 37 |
| Tablo XI | 38 |
| Tablo XII | 40 |
| Tablo XIII | 41 |
| Tablo XIV | 46 |
| Tablo XV | 49 |
| Tablo XVI | 51 |
| Tablo XVII | 52 |
| Tablo XVIII | 52 |
| Tablo XIX | 53 |
| Tablo XX | 58 |
| Tablo XXI | 59, 60 |
| Tablo XXII | 65 |
| Tablo XXIII | 66 |
| Tablo XXIV | 67 |
| Tablo XXV | 67 |
| Tablo XXVI | 67 |
| Tablo XXVII | 68 |
| Tablo XXVIII | 69 |
| Tablo XXIX | 72 |
| Tablo XXX | 74 |

ÖZET

Çukurova Bölgesinde Apo E Polimorfizminin Kan Lipit Parametreleri Üzerine Etkisi

Apolipoprotein E lipoprotein metabolizmasında esansiyel öneme sahip, özellikle trigliseritten zengin lipoprotein kalıntılarının düşük dansiteli lipoprotein (B,E) reseptörü ve hepatik kalıntı (E) reseptörüne bağlanmalarında ligant olarak fonksiyon gören bir glikoproteindir. Apo E geninin polimorfik doğasından kaynaklanan sık görülen üç apo E alleli tanımlanmıştır. Bu alleller üç apo E izoformunun oluşumundan sorumludur. Üç izoformun 112. ve 158. amino asit dizisinde farklılık vardır. Farklı apo E izoformları lipoprotein seviyeleri üzerinde bireyler arası varyasyonda önem kazanmaktadır.

Adana ili Yemişli köyü ve hastaneye başvuran, sağlıklı görünen 75 olgudan alınan kan örneklerinde lipit parametreleri yanında, DNA'ları elde edilip, amplifiye edildikten sonra restriksiyon tipleme yöntemi (RFLP) ile apo E genotipleri saptandı. Ateroskleroz açısından risk faktörleri olarak kabul edilen total kolesterol, LDL kolesterol, apolipoprotein B ve lipoprotein (a) yüksekliği ile HDL kolesterol ve apolipoprotein AI düşüklüğü özellikle erkek popülasyonu tehdit etmektedir. Apo E genotipleri sıklığı 2/2 %0, 2/3 %10.7, 2/4 %2.7, 3/3 %68.0, 3/4 %17.3 ve 4/4 %1.3 olarak saptandı. Apo E genotipleri sıklığı Yemişli köyü ile hastaneye başvuran olgular arasında farklılık taşımaktaydı. İstatistiksel değerlendirmeye alınan üç apo E genotipinin (2/3, 3/3 ve 3/4) HDL kolesterol dışında lipit parametreleri üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığı saptandı. Olgu sayısının artırılmasıyla tüm genotipleri kapsayacak şekilde çalışmanın genişletilmesi gerektiği düşünüldü.

Anahtar Sözcükler: apolipoprotein E, lipit parametreleri, ateroskleroz, RFLP, apo E genotip sıklığı

ABSTRACT

The Effect of Apo E Polymorphism on Blood Lipid Parameters in Çukurova Region

Apolipoprotein E plays a central role in lipoprotein metabolism. It serves as a ligand for the binding of triglyceride rich lipoprotein remnants to the LDL and the hepatic remnant receptors. Apo E gene is polymorphic, that codes for three apo E isoforms. The isoforms differ by amino acid substitutions at one or both 112. and 158. position. The genetic variation in apo E have significant impact on interindividual-variation of lipoprotein levels in normal subjects.

Samples were obtained from a village of Adana and the people who administered to Biochemistry Department to search their lipid profiles. Apo E genotypes according to the restriction fragment length polymorphism (RFLP) method and lipid parameters of 75 blood samples were analyzed. High levels of total-LDL cholesterol, apolipoprotein B, and lipoprotein (a), and low levels of HDL cholesterol and apolipoprotein AI, were encountered as risk factors of atherosclerosis in male population. The frequency of apo E genotypes of the population were found as 2/2 %0, 2/3 %10.7, 2/4 %2.7, 3/3 %68.0, 3/4 %17.3 and 4/4 %1.3. The frequency of apo E genotypes were different between the village and city populations. Impact of apo E genotypes on lipid parameters of 2/2, 3/3 and 3/4 groups were analyzed statistically. It is observed that only the HDL cholesterol levels were affected by apo E polymorphism.

Key Words: apolipoprotein E, lipid parameters, atherosclerosis, RFLP, frequency of apo E genotype

GİRİŞ VE AMAÇ

Ateroskleroz, yunanca lapa + kitle + katı anlamlarına gelen 'athero' + 'oma' + 'scleros' kelimelerinden türetilmiş, damar duvarında dejeneratif değişiklikler sonucunda gelişen bir hastalık sürecidir. Temel patoloji damar lümenindeki daralmadır. Bunun sonucunda hücrelere oksijen ve besin maddelerinin yeterli ya da hiç ulaşmaması ve artıkların uzaklaştırılmaması ile iskemi ya da infarktüs tablosu ortaya çıkmaktadır. (82)

Gelişmiş batı toplumlarında ateroskleroza bağlı olarak gelişen kardiyovasküler hastalıklar ölüm nedenlerinin %35-40'ını oluşturmaktadır. Bizim toplumumuzda da, yeterli istatistiksel veri bulunmamakla beraber, yağ ve kalori içeriği yüksek besinlerin aşırı tüketimi, sigara içimi, obezite ve sedanter yaşam biçimi gibi çevresel faktörlerin varlığı göz önünde bulundurulduğunda, ateroskleroza bağlı mortalitenin hiç de düşük olmayacağı tahmin edilebilmektedir. Ateroskleroz patogenezinde çevresel faktörler yanında, genetik faktörlerin de rol alması, hastalığı diabetes mellitus, gut ve esansiyel hipertansiyonun da yer aldığı multifaktöryel hastalıklar grubuna dahil etmektedir. (4, 48)

Apolipoprotein E (apo E) polimorfizmi ateroskleroz patogenezinde rol oynayan genetik faktörlerdendir. İlk olarak 1973 yılında Shore ve arkadaşları tarafından çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) bir komponenti ve 'argininden zengin apolipoprotein' olarak tanımlanmıştır. Esas olarak karaciğerde sentezlenmekle beraber birçok dokuda, değişik hücrelerce de sentezlenebildiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Apo E'nin reseptörlerle olan ilişkisinden dolayı lipoprotein metabolizmasında belirleyici bir rol oynadığı bilinmektedir. Trigliseritten zengin lipoproteinler olarak bilinen şilomikron ve VLDL artıklarının plazmadan uzaklaştırılmasında apo E aracılık etmektedir. (47, 74)

Erken koroner kalp hastalığının görüldüğü tip III hiperlipoproteinemili hastalarda farklı bir apo E izoformunun saptanması sonucunda bu konuya olan ilgi artmıştır. Moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmelere paralel olarak da, apo E geninin çoklu allellerden oluştuğu ve polimorfik bir doğasının bulunduğu saptanmıştır. ϵ_2 , ϵ_3 ve ϵ_4 olarak adlandırılan üç sık görülen allel, sırasıyla E2, E3 ve E4 izoformlarını kodlamaktadır. Diğer çevresel ve genetik faktörler göz önünde

bulundurulmadığında, apo E3 izoformunu taşıyan bireylerde normal bir lipit metabolizması gözlenirken, diğer apo E izoformları farklılıklara neden olmaktadır. (29, 74)

Üç majör apo E alleli ve bunların protein ürünlerinin, plazma lipit parametreleri üzerine önemli etkilerinin bulunmasından yola çıkılarak, apo E polimorfizminin ateroskleroza yatkınlığı belirlemede majör bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Aterosklerozun özellikle gelişmiş toplumlarda önemli bir halk sağlığı sorunu olması, apo E üzerinde çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. Değişik populasyonlarda tarama çalışmalarıyla, apo E izoformlarının görülme sıklığı ve ateroskleroz gelişiminde etkili olan plazma lipit parametreleri ile olan ilişkisi saptanmıştır. (19)

Biz de bu çalışmamızda ateroskleroz ve koroner arter hastalığının sık görüldüğü Çukurova Bölgesi'nde majör apo E izoformlarının görülme sıklığını ve bunların plazma lipit parametreleri ile olan ilişkisini, bunun yanında, henüz yayınlanmamış olan tarama sonuçlarına göre plazma lipit parametrelerinin normalden sapma gösterdiği Adana ili Yemişli köyü ile hastaneye başvuran, sağlıklı görünen kişiler arasında apo E genotipleri dağılımı açısından farklılık olup olmadığını saptamayı amaçladık .

GENEL BİLGİLER

1. Lipitler

Lipitler, kloroform, eter, benzen gibi nonpolar çözücülerde çözünen, organik bileşiklerden oluşan heterojen bir gruptur. Yağ asitleri, kolesterol, fosfolipitler ve glikosfingolipitler majör polar lipitler olup, hidrofobik ve hidrofilik yapıları birlikte içermelerinden dolayı suda çözünürlükleri sınırlıdır. Nonpolar lipitler ise trigliseritler ve kolesteril esterleridir. Lipitler:

- ısı yalıtımında,
- enerji deposu olarak,
- membran komponenti olarak,
- steroid hormonlar ve vitamin D metabolitlerinin sentezinde,
- prostanooidler ve lökotrienlerin prekürsörü olarak,
- A, D, E ve K vitaminlerinin emiliminde,
- ekspirasyonda alveoler duvarların yüzey gerilimini azaltan surfaktan oluşumunda ve
- kendi sindirim ve emilimlerinde emülsifiye edici ajan olarak fonksiyon görürler. (6, 51)

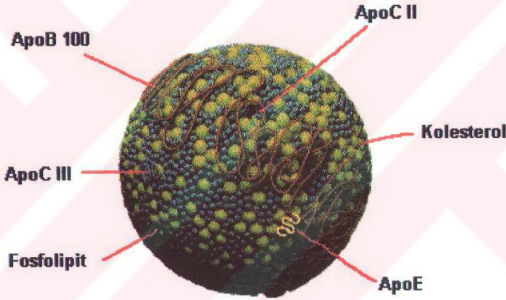
2. Plazma Lipoproteinleri

Suda çözünmeyen lipitlerin, plazmada çözünebilir lipit ve protein kompleksleri halinde taşınması için oluşturulan makromoleküllere lipoproteinler denir. Lipoproteinler, trigliserit ve kolesteril esterlerinden oluşan hidrofobik bir çekirdek ile serbest kolesterol, fosfolipit ve spesifik proteinlerin kapladığı yüzey tabakasından meydana gelen küresel partiküller şeklindedirler (Şekil 1). İçerdikleri spesifik proteinlere apolipoproteinler denir. Apolipoproteinler, lipoprotein metabolizmasında :

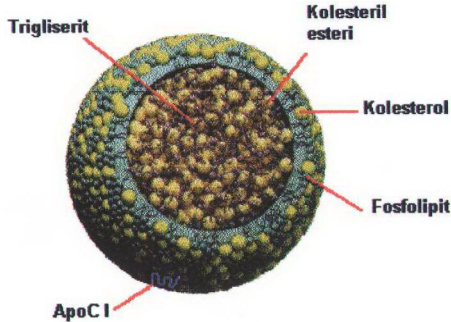
- enzim kofaktörü olarak,
- lipit transfer proteinleri gibi davranarak ve
- dokularda lipoprotein reseptörleri ile ilişkide ligant olarak önemli fonksiyonlar görürler (Tablo I). (33, 50, 73, 80)

Lipoproteinler dansite gradyent ultrasantrifügasyonu ile izole edilerek sınıflandırılmışlardır. Lipoproteinlerin dansitesi boyutları ile ters bir ilişki göstermektedir; düşük dansite nonpolar kor lipitlerinin, yüksek dansite ise yüzey proteinlerinin fazlalığını yansıtmaktadır. Dansiteleri, yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre lipoproteinler şilomikron, VLDL, IDL, LDL, HDL ve Lp (a) olmak üzere altı sınıfa ayrılmaktadır (Tablo II). Ayrıca HDL kendi içinde HDL₂ ve HDL₃ olarak ayrılır. Elektroforetik özelliklerine göre şilomikron, α , pre- β ve β lipoproteinler olarak da ayrımı yapılabilmektedir. Yapısal olarak; en büyük iki sınıfı temel içerikleri trigliserit olan VLDL ve şilomikron oluştururken, kolesterol ve fosfolipitleri fazla içeren LDL, HDL₂ ve HDL₃ en küçük lipoproteinlerdir. (33, 51, 80)

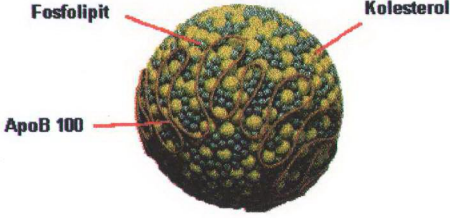
VLDL'nin yüzeyden görünümü



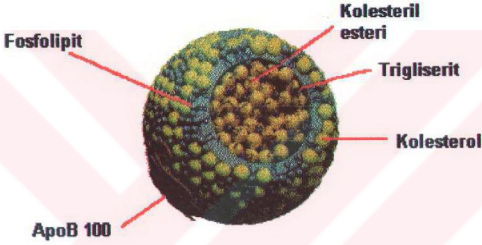
VLDL'nin çekirdek kısmının görünümü



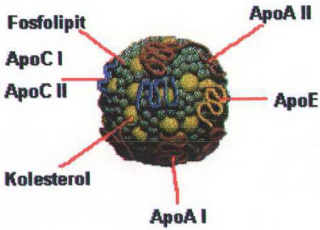
LDL'nin yüzeyden görünümü



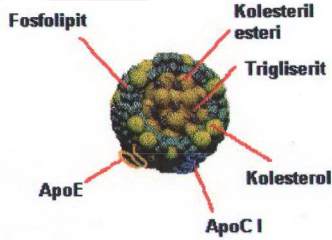
LDL'nin çekirdek kısmının görünümü



HDL'nin yüzeyden görünümü



HDL'nin çekirdek kısmının görünümü



Şekil 1. VLDL, LDL ve HDL lipoproteinlerin içerdikleri lipitler ve proteinlerin hem yüzeyden, hem de çekirdek kısmından gösterimi

Tablo I. Lipoproteinlerde yer alan apolipoproteinlerin genel özellikleri

| Apolipoprotein | Kromozom | M. A. (kDa) | Amino Asit Sayısı | Sentez Yeri | Lipoprotein Dağılımı |
|----------------|----------|----------------|-------------------------|---|--------------------------|
| A I | 11 | ~28 | 243 | karaciğer, ince barsak | HDL, şilomikron |
| A II | 1 | ~17 | 77 | karaciğer | HDL |
| A IV | 11 | ~45 | 376 | ince barsak | HDL, şilomikron |
| B - 48 | 2 | ~246 | 2152 | ince barsak | şilomikron |
| B - 100 | 2 | ~513 | 4536 | karaciğer | VLDL, IDL, LDL |
| C I | 19 | ~6.6 | 57 | karaciğer | HDL, VLDL, şilomikron |
| C II | 19 | 8.9 | 79 | karaciğer | HDL, VLDL, şilomikron |
| C III | 11 | 8.8 | 79 | karaciğer | HDL, VLDL, şilomikron |
| E | 19 | ~34 | 299 | karaciğer, beyin, deri, testis, dalak | HDL, VLDL, şilomikron |
| apo (a) | 6 | ~400-800 | 4-6000 | karaciğer | lipoprotein (a) |
| D | 3 | ~22 | 169 | karaciğer, ince barsak | HDL |

Tablo II. Lipoprotein sınıfları

| Sınıf | Kaynağı | Dansitesi | Elektroforetik Mobilitesi | Başlıca Lipitleri |
|------------------|-------------|-------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Şilomikron | İnce Barsak | <0.95 | Aplikasyon noktası | %86 Trigliserit |
| VLDL | Karaciğer | 0.95-1.006 | Pre-β | %55 Trigliserit %18 Fosfolipit |
| IDL | VLDL | 1.006-1.019 | Yavaş Pre-β | %38 Kolesterol %23 Trigliserit |
| LDL | IDL | 1.019-1.063 | β | %50 Kolesterol %22 Fosfolipit |
| HDL ₂ | Karaciğer | 1.063-1.125 | α | %40 Protein %33 Fosfolipit |
| HDL ₃ | İnce Barsak | 1.125-1.210 | α | %55 Protein %35 Fosfolipit |
| Lp (a) | Karaciğer | 1.040-1.090 | Yavaş Preβ | LDL'ye Benzer |

3. Lipoprotein Metabolizması

3.1. Apo B İçeren Lipoproteinlerin Sentez ve Katabolizması:

Şilomikronlar ve VLDL sırasıyla enterosit ve hepatositlerin endoplazmik retikulumunda sentezlenirler. Daha sonra golgi apereyine transfer edilerek, sekretuar veziküller içinde paketlenirler. Ekzositoz ile ekstrasellüler boşluğa aktarılırlar. Şilomikronlar intestinal lakteallere geçerken, VLDL de hepatik sinüzoidal endotelde bulunan pencerelerden kana geçer. (33, 34)

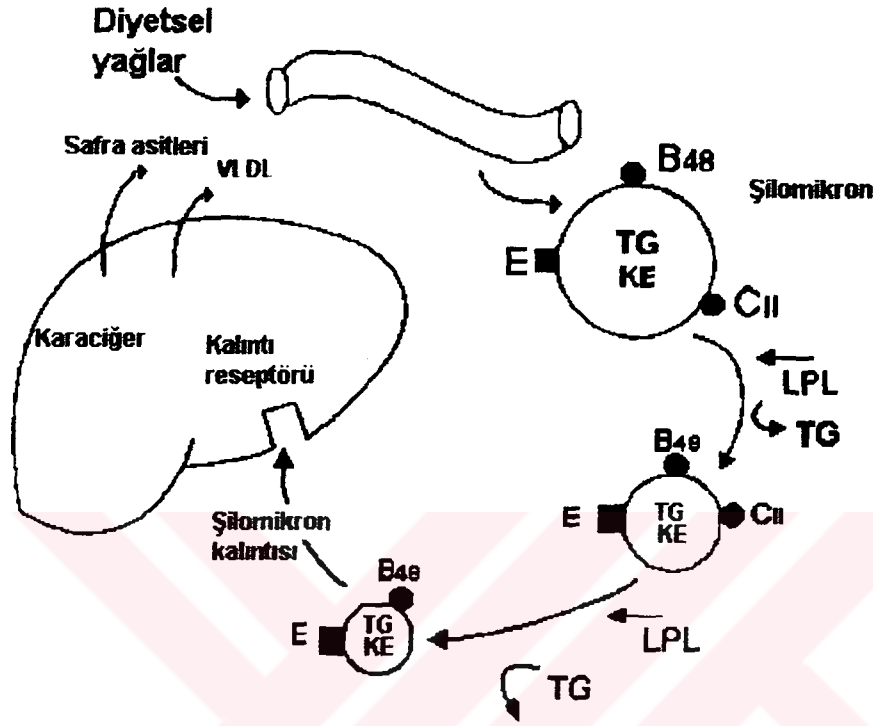
Henüz olgunlaşmamış şilomikronlar yeni emilmiş yağ asitlerini trigliserit olarak içerirler. Enterositlerde sentezlenen apo B-48 ve A apoproteinlerini yapılarında bulundururlar. Torasik duktus yoluyla genel kan dolaşımına geçerler.

HDL'den transfer ile apo C'leri ve E'yi de kazanarak, olgun şilomikron halini alırlar. Kapiller endotel hücrelerin yüzeyinde bulunan lipoprotein lipaz enzimine bağlanarak, içerdikleri trigliseritler hidroliz olur (Şekil 4). Apo CII ve fosfolipidler lipoprotein lipaz enziminin aktivatörü olarak rol oynarlar. Eş zamanlı olarak fosfolipidlerinin bir kısmı, A ve C apoproteinleri HDL'ye transfer olur. Trigliserit içeriğini %80-90 oranında yitirerek, göreceli olarak kolesterolce zenginleşen yapıya da şilomikron kalıntısı denir. Şilomikron kalıntıları hepatositlerde bulunan şilomikron kalıntı reseptörlerine apo E aracılığı ile bağlanırlar. Ekstrahepatik dokularda şilomikron metabolizmasının ilk basamağında, trigliseritlerin yağ asitleri adipositlere depolanmak üzere, diğer dokulara oksidasyon amacıyla alınırlar. Salınan yağ asitlerinin bir kısmı ise albumine bağlanarak değişik dokulara taşınırlar. Şilomikron metabolizmasının ikinci basamağında ise geriye kalan trigliseritler ve diyetsel kolesterolün tamamı hepatositlere taşınır (Şekil 2). (32, 38, 95, 96)

VLDL, hepatositlerdeki fazla trigliseritin (lipogenezle sentezlenen, serbest yağ asiti ve şilomikron kalıntısı olarak karaciğere taşınan) periferik dokulara depolanmak ya da oksidasyon amacıyla kullanılmak üzere taşınmasını sağlar. Olgunlaşmamış VLDL apo B-100, az miktarda da E ve C apoproteinlerini içerir. Sekresyondan sonra şilomikronlarda olduğu gibi HDL'den protein transferi gerçekleşir. VLDL metabolizmasının ilk basamağı, şilomikronunkine benzer şekilde, lipoprotein lipaz enziminin hidrolitik etkisiyle VLDL kalıntısının oluşmasıdır (Şekil 4). VLDL trigliseritlerinin hidroliz hızı şilomikron trigliseritlerine oranla daha yavaştır. Bunun, VLDL'nin çap olarak daha küçük olması ve daha az enzim bağlaması ile ilgili olduğu düşünülmektedir. (33, 38, 95)

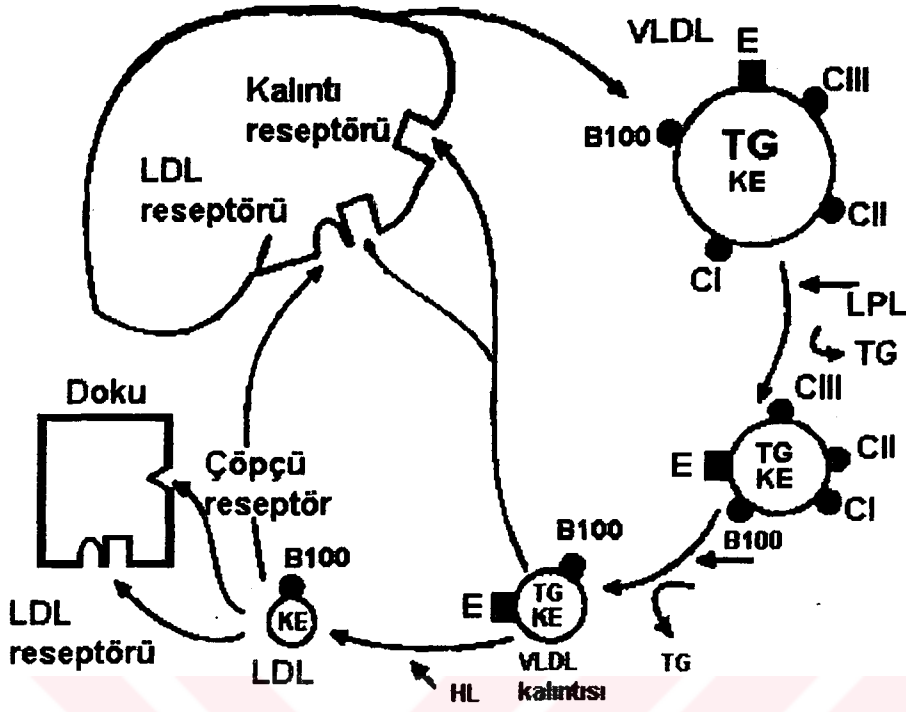
VLDL kalıntıları hepatositlerdeki LDL ve kalıntı reseptörlerine apo E aracılığıyla bağlanırlar. VLDL kalıntısı ne kadar çok apo E içerirse, reseptöre o kadar yüksek affiniteyle bağlanmakta ve kanın kalıntıdan temizlenmesi hızlanmaktadır. Yüksek affiniteyle bağlananlar fazla apo E içeren, büyük çaplı VLDL kalıntılarıdır. Daha küçük çaplı VLDL kalıntıları daha az apo E içerirler ve IDL olarak plazmadan izole edilebilirler. IDL hepatic lipaz enziminin etkisiyle trigliseritlerini daha da kaybederek LDL'yi oluşturmaktadır. LDL apo E içermez,

fakat karaciğerde ve ekstrahepatik dokularda bulunan LDL reseptörlerine B-100 proteiniyle monovalent olarak bağlanır (Şekil 3). (33, 34, 96)

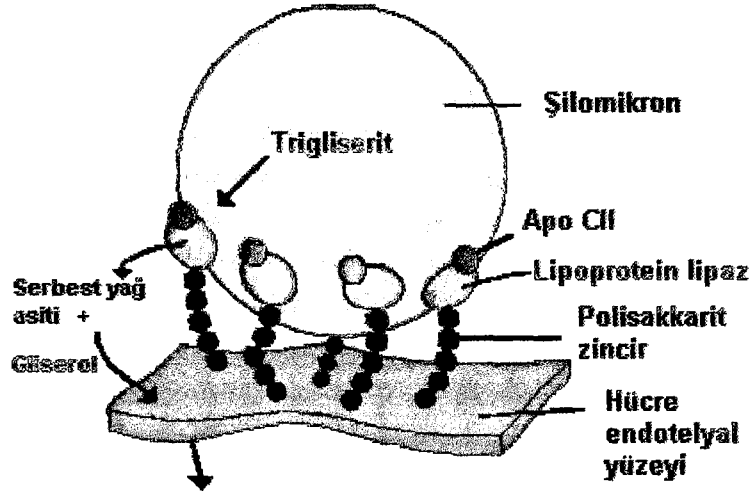


Şekil 2. Şilomikron metabolizması. Diyetsel yağlar enterositlerde şilomikron sentezine katılarak, genel dolaşıma geçerler. Temel apoliproteini B48'dir. Dolaşımda apo E ve C'leri de kazanır. Lipoprotein lipaz (LPL) enziminin etkisiyle trigliseritlerini kaybeden şilomikron, göreceli olarak kolesterolce zenginleşir. Hepatositlerin yüzeyinde bulunan kalıntı reseptörlerine apo E aracılığıyla bağlanarak, hücre içine alınır.

TG: Trigliserit, KE: Kolesterol esterleri



Şekil 3. VLDL ve LDL metabolizması. Karaciğerden salınan VLDL trigliseritten zengindir ve yapısında apo B 100, E ve C'leri içerir. Lipoprotein lipaz (LPL) enziminin etkisiyle trigliseritlerini kaybeden VLDL, göreceli olarak kolesterolce zenginleşir. Bazı VLDL kalıntıları apo E'nin aracılık ettiği LDL ve kalıntı reseptörlerince hepatositler tarafından hücre içine alınırlar. VLDL kalıntılarının bir kısmı da, hepatik lipaz (HL) etkisiyle trigliseritlerini daha da kaybederek LDL'yi oluştururlar. LDL apo B 100 aracılığıyla, karaciğer ve periferik dokularda bulunan LDL reseptörleri tarafından hücre içine alınır. LDL'nin bir kısmı da çöpçü (scavenger) reseptörlerce dokular tarafından alınır. TG: Trigliserit, KE: Kolesterol esterleri



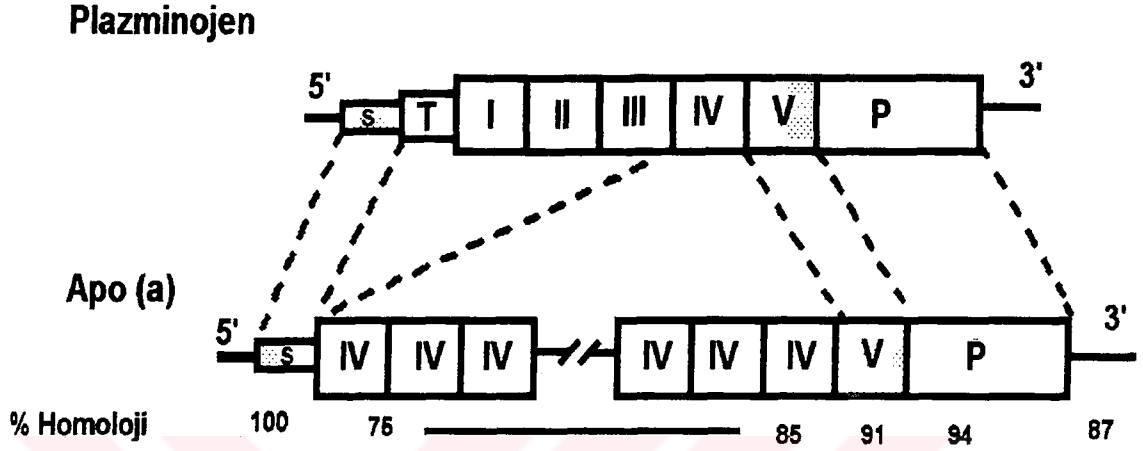
Şekil 4. Şematik olarak şilomikronun lipoprotein lipaz enzimine bağlanması. Enzim hücre yüzeyine polisakkarit zincirle bağlıdır. Apo CII'nin de kofaktör olarak rol almasıyla şilomikron ve VLDL trigliseritlerini hidroliz eder.

Apo B-100 içeren bir diğer lipoprotein olan Lp (a) ilk olarak 1963 yılında Kare Berg tarafından LDL'nin antijenik bir varyantı olarak tanımlanmıştır. Fakat kısa bir süre sonra LDL'nin varyantı olmadığı, farklı bir lipoprotein olduğu görülmüştür. Protein komponentinin kompleks olmasından dolayı moleküler biyoloji tekniklerindeki gelişmeye değin yapısı pek aydınlatılamamıştır. Lp (a), iki farklı komponenti olan kompleks bir yapıya sahiptir. LDL'den oluşan bir lipoprotein fraksiyonu ile yüksek moleküler ağırlıklı bir glikoprotein olan apo (a)'dan oluşmaktadır. Mc Lean ve arkadaşları tarafından apo (a) klonlanarak baz dizisi saptanmış ve plazminojen ile olan homolojisi gösterilmiştir. (75, 93)

Plazminojen fibrinolitik sistemin bir parçasıdır. Bir çeşit Danimarka peynirine benzerliğinden dolayı 'kringle' olarak adlandırılan yapıları içermektedir. 80-90 amino asit dizisinden oluşan kringle yapısında, stabilizasyon amacıyla üç disülfid köprüsü yer almaktadır. Plazminojen farklı amino asit dizilimlerine sahip, romen rakamları ile KI, KII, KIII, KIV ve KV olarak adlandırılan beş değişik kringle içermektedir. (53)

Apo (a) plazminojenden çok daha büyük bir yapıya sahiptir. Bunun nedeni, apo (a)'nın tekrarlayan KIV parçalarını içermesidir. Plazminojende bulunan KI, KII ve KIII apo (a)'da bulunmazken, bir proteaz olan KV'i her iki molekül de

içermektedir (Şekil 5). Fakat plazminojende aktivasyon bölgesinde bulunan arginin-valin, apo (a)'da yerini serin-izolösin'e bırakmıştır. Bu da apo (a)'nın plazmin benzeri proteaz aktivitesi göstermediğini düşündürmektedir. (5, 28, 30, 53, 89, 90, 93)



Şekil 5. Apo (a) ve plazminojen cDNA yapısı. İki molekülün farklı parçaları arasındaki homoloji % olarak verilmektedir.

S: Sinyal peptit, P: Proteaz domaini

I, II, III, IV ve V: Kringle'lar

Lp (a)'nın LDL ve apo (a) fraksiyonları birbirlerine tek bir disülfid bağı ile bağlanmaktadır. Bu bağ, apo (a)'nın 36. K IV'ünün sisteini ile apo B 100'ün karboksi terminalinde bulunan bir diğer sistein arasında gerçekleşmektedir (Şekil 6). Ayrıca apo (a) ile B 100 arasında nonkovalen bağların olduğuna da inanılmaktadır, fakat bunlar henüz aydınlatılamamıştır. (53, 93)

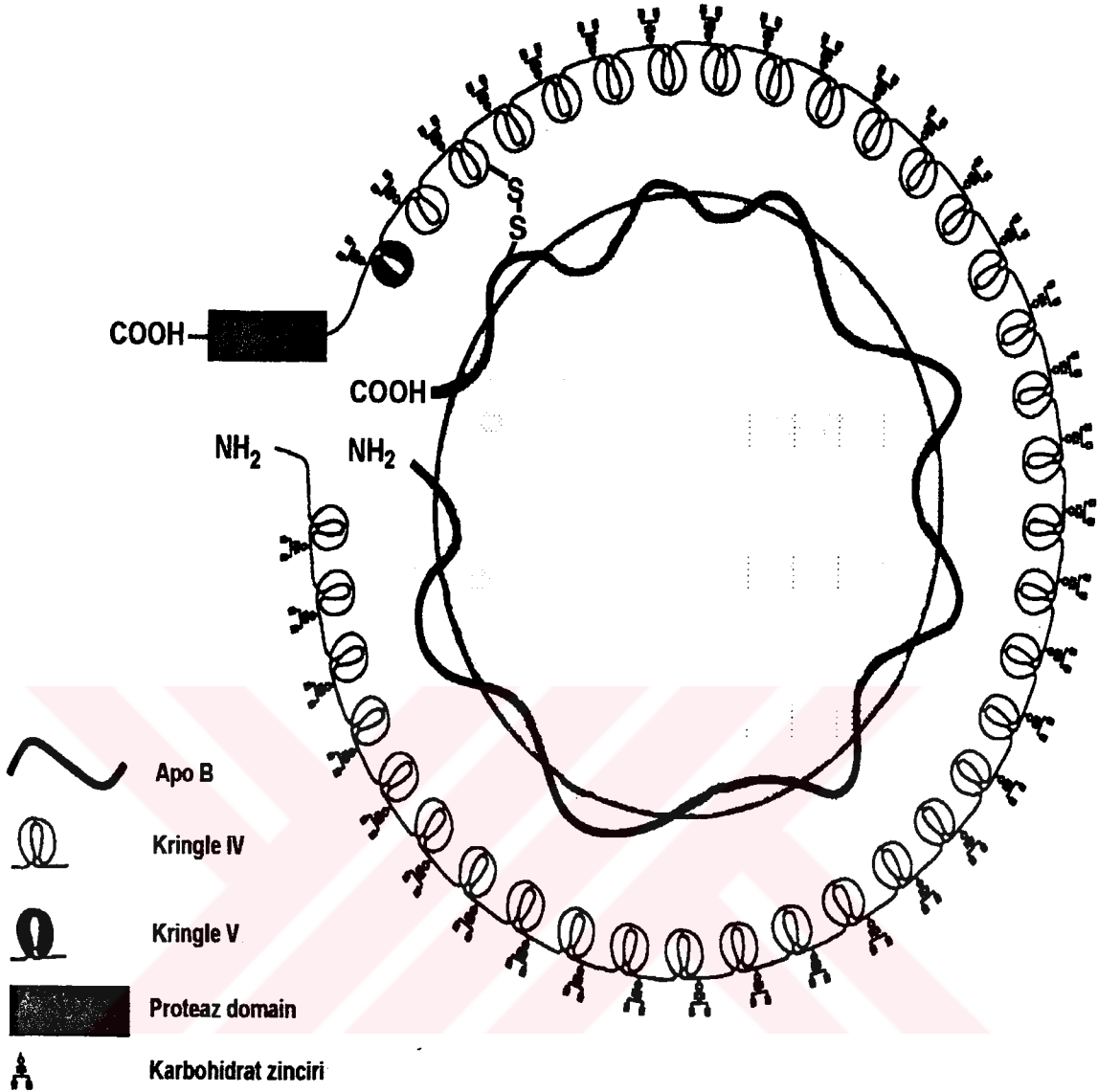
Apo (a) mRNA'sı en çok karaciğerde olmak üzere, testis ve beyinde de saptanmıştır. Fakat apo B 100'ün sentezlendiği tek yer olan karaciğerin, Lp (a) sentezinden de sorumlu olduğu düşünülmektedir. Karaciğer transplantasyonu yapılan bireylerde apo (a)'nın genetik tipinin değişmesi de bunu desteklemektedir. Apo (a)'nın, Lp (a)'yı oluşturmak üzere LDL ile birleşmesinin, çelişkili çalışmalar

bulunmakla birlikte, plazmada gerçekleştiği düşünülmektedir. Lp (a) ve apo (a)'nın bazı biyokimyasal özellikleri tablo III'de verilmiştir.(41, 55, 83, 93)

Yüksek Lp (a) düzeyinin aterotrombotik hastalık patogenezindeki rolü tam olarak aydınlatılamamıştır. Kostner ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Lp (a) düzeyinin 30 mg/dl'nin üzerine çıktığı, 40-60 yaş arası normolipidemik erkeklerde miyokardiyal infarktüs riskinin 1.75 kez arttığı saptanmıştır. Bu çalışmanın sonucu olarak da 30 mg/dl'nin üzerindeki Lp(a) konsantrasyonlarının miyokardiyal infarktüs için bağımsız bir risk faktörü olduğu yorumu yapılmıştır. Değişik populasyonlarda yapılan birçok çalışmayla da Lp (a) ile diğer lipoproteinler arasında ve Lp (a) ile fibrinolitik parametreler arasında herhangi bir ilişki saptanamamıştır. (63, 93)

Tablo III. Lp(a) ve apo (a)'nın bazı özellikleri

| | |
|--|--|
| Lp (a) <ul style="list-style-type: none">• Elektroforetik mobilite (agaroz)• Dansite (g/ml)• İzoelektrik nokta (pH)• Moleküler ağırlık (dalton)• Moleküler çap• Plazma konsantrasyonu (mg/dl)• Protein (g/mol)• Serbest kolesterol (mol/mol)• Kolesterol esteri (mol/mol)• Trigliserit (mol/mol)• Fosfolipit (mol/mol)• Fraksiyonel katabolizma hızı/gün• Plazma yarılanma ömrü• Sentez hızı (mg/kg/gün) | Beta 1.040-1.131 4.9 3.8-4.66 x 10 ⁶ ~250 0.1-120 ~800,000-1,350,000 750 2000 350 1110 0.26-0.306 3.32-3.93 4.60±3.64 (0.54-11.39) |
| Apo (a) <ul style="list-style-type: none">• Moleküler ağırlığı• Olgun proteinin amino asit sayısı• Karbohidrat (%)• Sialik asit (%) | 300,000-800,000 4529 28 21 |



Şekil 6. Lp (a)'nın şematik gösterimi. LDL ve apo B 100 iç kısımda, apo (a) dış kısımda yer almakta. Apo B'nin C terminali ile apo (a)'nın 36. K IV'ü arasında tek bir disülfid bağı bulunmaktadır.

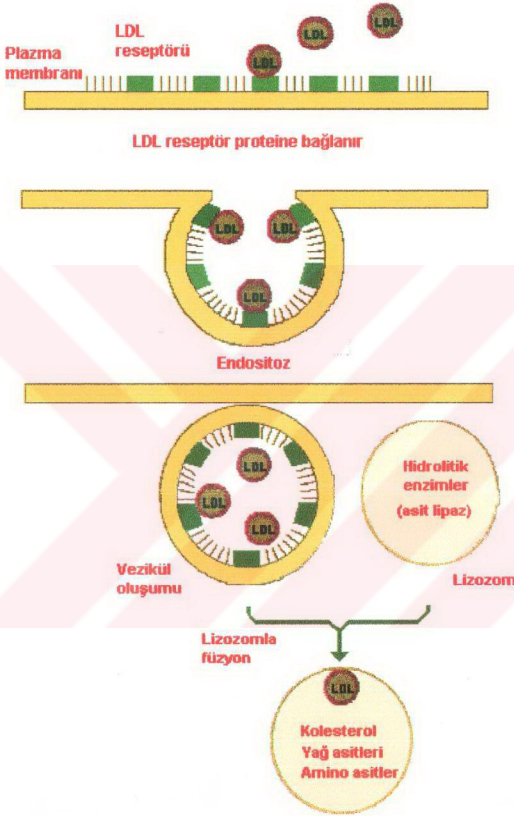
Lp (a) düzeyinin 6. kromozomda yer alan apo (a) geninin çoklu allellerinden etkilendiği gösterilmiştir. Günümüze kadar saptanmış olan 34 değişik apo (a) izoformu bilinmektedir. Özellikle B, S1 ve S2 izoformları yüksek Lp (a) düzeyleriyle ilişkili bulunmuştur. Çalışılan tüm etnik gruplarda koroner kalp hastalığı olan bireylerde bu izoformlara daha sıklıkla rastlanılmaktadır. (40, 65, 71, 75)

Lp (a)'nın plazmadan uzaklaştırılma yeri ve mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Lp (a), LDL reseptörü için ligant olarak fonksiyon gören apo B 100 içermektedir. Fakat Lp (a)'nın içerdiği B 100'ün LDL reseptörüne zayıf bir şekilde bağlandığı gösterilmiştir. Sonuç olarak da, LDL reseptörünün Lp (a) katabolizmasında minör öneme sahip olduğu düşünülmüştür. Lp (a) katabolizmasıyla ilgili üzerinde durulan diğer çalışmalar, makrofajlar tarafından bağlanarak plazmadan uzaklaştırıldığı şeklindedir. Ayrıca deneysel olarak lipoprotein lipaz enziminin, hücrelerce Lp (a) alımını ve degradasyonunu, enzimatik aktivitesine gerek olmadan arttırdığı gözlenmiştir. Degradasyon hücre içinde lizozomal olarak gerçekleşmektedir. Lipoprotein lipazın Lp (a) katabolizmasına olan etkisinin LDL reseptörü bağımlı ve LDL reseptöründen bağımsız olmak üzere iki komponenti bulunmaktadır. Lipoprotein lipazın, Lp(a)'nın LDL reseptörüne ve hücre yüzeyindeki heparin sülfat proteoglikanlara bağlanmasını arttırdığı ileri sürülmüştür. Heparin sülfat proteoglikanlara bağlanmada, LDL-reseptör ilişkili proteinin aracılık ettiği düşünülmektedir. Lp (a) katabolizmasıyla ilgili tüm bu çalışmalar deneysel olup, insan organizmasındaki geçerliliği kanıtlanamamıştır. (31, 84, 103, 108)

B apolipoproteinlerini içeren lipoproteinlerin (şilomikron, VLDL, LDL) katabolizması reseptör aracılı endositoz yoluyla gerçekleşmektedir. LDL ve şilomikron kalıntı reseptörleri lipoprotein katabolizmasında rol alan reseptörlerdir. Bunlar arasında en iyi tanımlanmış olanı, bir transmembran proteini olan LDL reseptörüdür. LDL reseptörü hem karaciğerde, hem de ekstrahepatik dokularda bulunmaktadır. Lipoproteinler içerdikleri apolipoproteine göre, apo B-100 ya da E aracılığıyla LDL reseptörüne bağlanırlar. Endositoz yoluyla hücre içine alınırlar. Lizozomlarda degrade edilirler. (32)

Membranda yer alan LDL reseptör düzeyi hücre içi kolesterol miktarına bağlı olarak kontrol edilir. Hücre içinde lizozomlardan kolesterol salınımı hem reseptör sentezini baskılamak, hem de kolesterol biyosentezinde hız kısıtlayıcı basamağı katalizleyen β -hidroksi- β -metilglutaril Co A redüktaz enzimini inhibe eder. Böylece hücre içi kolesterol konsantrasyonu belli sınırlar içinde tutulmaya çalışılır (Şekil 7). Bunun yanında, makrofaj kökenli köpük hücrelerin oluşumunda görev alan çöpçü (scavenger) reseptörlerce LDL alımında, hücre içi kolesterol

içeriği önem taşımamaktadır. Dolayısıyla fazla miktarda kolesterolün hücre içi birikimi, aterosklerozun öncül lezyonlarından olan yağlı çizgilenmelerin (fatty streak) oluşumuyla sonuçlanacaktır. (32, 39, 109)



Şekil 7. LDL'nin reseptör aracılığıyla hücre içine alımı. LDL plazma membranında bulunan özgün reseptörlerine bağlanarak, endositoz ile hücre içine alınır. Hücre içinde lizozomlarla birleşme sonucu lipoproteinler degrade olurlar.

3.2. HDL Sentez ve Katabolizması:

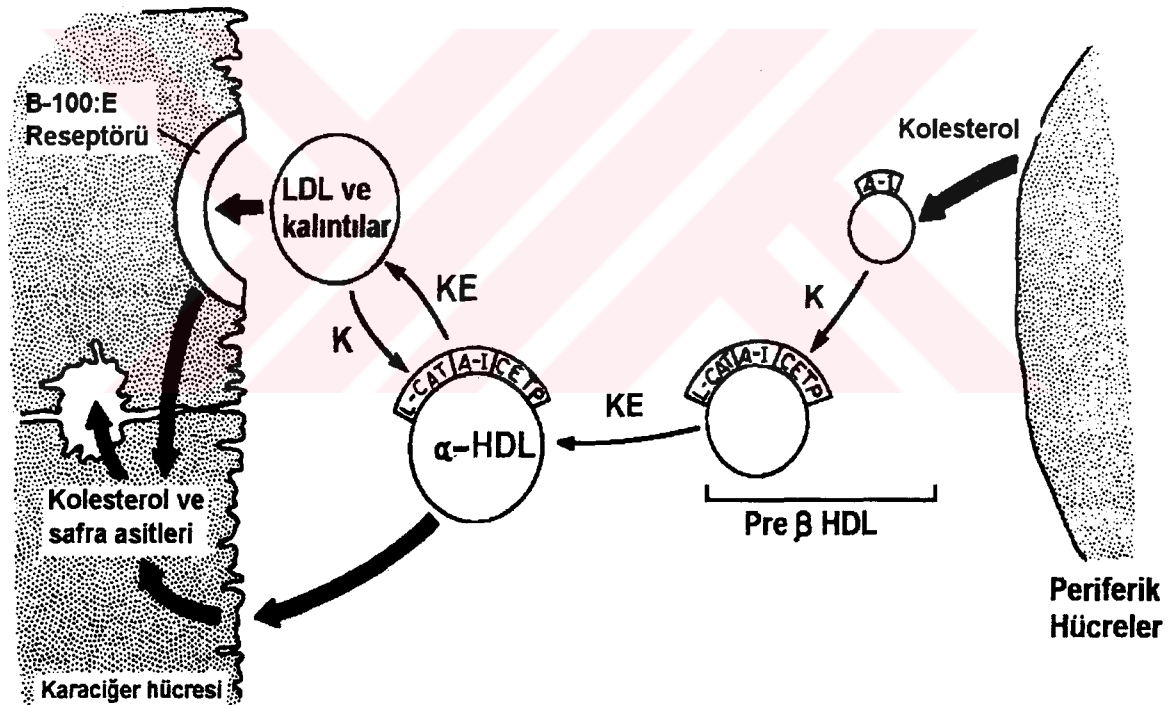
HDL hem karaciğer, hem de ince barsaklarda sentezlenerek, plazmaya salınmaktadır. Karaciğerden salınan HDL apo A, C ve E apolipoproteinleri içerirken, ince barsaktan yeni salınan HDL sadece A apolipoproteinlerini içermektedir. Trigliseritten zengin lipoproteinlerin lipolizi sırasında A, E ve C apolipoproteinleri HDL'ye transfer edilmektedir. Aynı şekilde yeni sentezlenmiş VLDL ve şilomikronlara da olgun HDL'den apolipoprotein transferi gerçekleşmektedir. VLDL ve şilomikronların metabolizmasında gerekli olan C ve E apolipoproteinleri için, HDL plazmada depo yeri olarak fonksiyon görmektedir. (25, 34)

Henüz olgunlaşmamış HDL diskoid fosfolipid çift katman, apolipoproteinler ve serbest kolesterolden oluşmaktadır. Yapıya lesitin kolesterol asil transferaz (LCAT) enzimi bağlanır. Apo A I, LCAT enziminin aktivatörüdür. LCAT enziminin etkisiyle yüzey fosfolipidleri ve serbest kolesteroller, kolesteril esterlerine ve lizolesitine çevrilir. Nonpolar kolesteril esterleri yapının hidrofobik iç kısmına doğru yer değiştirirken, lizolesitin de plazma albuminine transfer edilir. Bu reaksiyon, nonpolar lipidler sayesinde HDL sferik bir şekil alana kadar devam eder. İnsanda plazma kolesteril esterlerinin çoğu bu yolla oluşur. LCAT substratı olan kolesterol, hem plazma lipoproteinlerinin yüzeyinden, hem de hücrelerin plazma membranlarından sağlanır (Şekil 8). (27, 33)

HDL ile ilişkili bir diğer protein ise kolesteril ester transfer proteindir (CETP). CETP, HDL'den VLDL, LDL ve daha az oranda da şilomikronlara kolesteril esterlerini transfer ederken, bu lipoproteinlerden de HDL'ye trigliserit transferini gerçekleştirir. Böylece CETP, LCAT'in son ürün inhibisyonunu engeller. Ayrıca HDL'de LCAT aktivitesi sonucu oluşan kolesteril esterlerinin çoğu IDL ve LDL yoluyla karaciğere taşınmış olur. Eş zamanlı olarak trigliserit içeriği bakımından zenginleşen HDL, hepatik lipaz enziminin etkisiyle, bu yükünü karaciğere aktarır. Kolesteril esterlerinin transferi ve trigliseridlerin hidrolizi sonucunda HDL'nin boyutu küçülür. Büyük HDL partikülüne HDL₂ denirken, daha küçük olan HDL partikülü HDL₃ olarak adlandırılmaktadır. (20, 22)

HDL'nin karaciğer tarafından plazmadan uzaklaştırılmasında birkaç değişik mekanizmanın görev aldığı düşünülmektedir. Tam olarak aydınlatılmamış olmakla

birlikte, HDL kolesteril esterlerinin karaciğer tarafından selektif olarak hücre içine alındığına inanılmaktadır. Ayrıca HDL fosfolipitlerinin hepatik lipaz ile hidrolizi, HDL kolesterolün kimyasal gücünde değişikliğe neden olmaktadır. Bu da, HDL'den karaciğere kolesterol transferinde artışla sonuçlanmaktadır. Bir diğer mekanizma ise, apo E içeren HDL'lerin reseptör aracılığıyla hücre içine alınmalarıdır. Fakat bu son mekanizma, insan plazmasında apo E içeren HDL miktarının oldukça az olması nedeniyle, HDL katabolizmasında önem taşımamaktadır. (33, 68)



Şekil 8. Ters kolesterol transportu. Karaciğer ve ince barsaktan salınan olgunlaşmamış HDL, plazmada LCAT enzimini bağlar. Apo A1, enzimin kofaktörüdür. Ekstrahepatik hücrelerden alınan kolesterolü (K) kolesteril esterlerine (KE) dönüştürür. Oluşan kolesteril esterleri CETP'nin etkisiyle şilomikron ve VLDL kalıntıları ile LDL'ye aktarılır. Kolesteril esterlerince zenginleşen α-HDL ve diğer lipoproteinler karaciğer tarafından alınır. Karaciğerde kolesterol safra asitlerine çevrilerek atılır.

4. Apolipoprotein E

Apo E, lipid metabolizmasında, özellikle de trigliseritten zengin lipoproteinlerin aterojenik kalıntılarının plazmadan uzaklaştırılmasında esansiyel rolü olan bir glikoproteindir. Diyetle alınan ve karaciğerde sentezlenen lipidlerin plazmada transportu sırasıyla, şilomikron ve VLDL ile yapılmaktadır. Apo E, bu lipoprotein kalıntılarının plazmadan uzaklaştırılmasında ligant olarak fonksiyon görmektedir. Periferik dokulardan karaciğere kolesterol transportunda görev alan HDL'nin, periferik dokularda, kolesterol içeriğinin artmasında apo E'nin belirleyici olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Ayrıca, apo E içeren HDL, LDL reseptörüne bağlanarak plazmadan uzaklaştırılabilmektedir. (8, 24, 47, 64, 96, 104)

İlk olarak 1973 yılında Shore ve arkadaşları tarafından VLDL'den izole edilerek, direk amino asit dizisinin tanımlanmasıyla primer yapısı ortaya çıkarılmıştır. Bu araştırmacılar tarafından da 'argininden zengin apolipoprotein' olarak tanımlanmıştır. Daha sonra Utermann ve arkadaşları tip III hiperlipoproteinemili hastalarda erken koroner kalp hastalığının gelişmesi ile apo E polimorfizmi arasında bağlantı kurmuşlardır. Bu dönemde yapılan çalışmalar protein düzeyinde gerçekleştirilirken, Mc Lean ve arkadaşları apo E mRNA'sından cDNA nükleik asit dizisini saptamışlardır. Apo E'nin yirmi yıldan daha uzun süredir ateroskleroz ile olan ilgisinin bilinmesine karşın, Alzheimer hastalığı ve yaşlanma ile olan ilgisinin saptanmasından dolayı 1993'den sonra araştırmaların yoğunlaştığı bir konu haline gelmiştir. (13, 52, 74, 107)

4.1. Vücutta Dağılımı:

Apo E'nin normal plazma sınırları 3-7 mg/dl'dir. Apo E primer olarak hepatik parankimal hücrelerce sentezlenmekle birlikte, birçok değişik dokularda mRNA'sı saptanmıştır. Plazma apo E miktarının 2/3 kadarı karaciğer kaynaklıdır. İkinci sıklıkta üretildiği yer ise beyindir. Beyinde astrositler tarafından sentezlenmekte ve beyin omurilik sıvısının (BOS) majör apolipoproteinini oluşturmaktadır. BOS'da düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve apolipoprotein B bulunmadığından, kolesterol transportundan apo E'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Makrofajların da apo E sentezleyebildiği ve bunun kolesterol tarafından indüklenebildiği deneysel

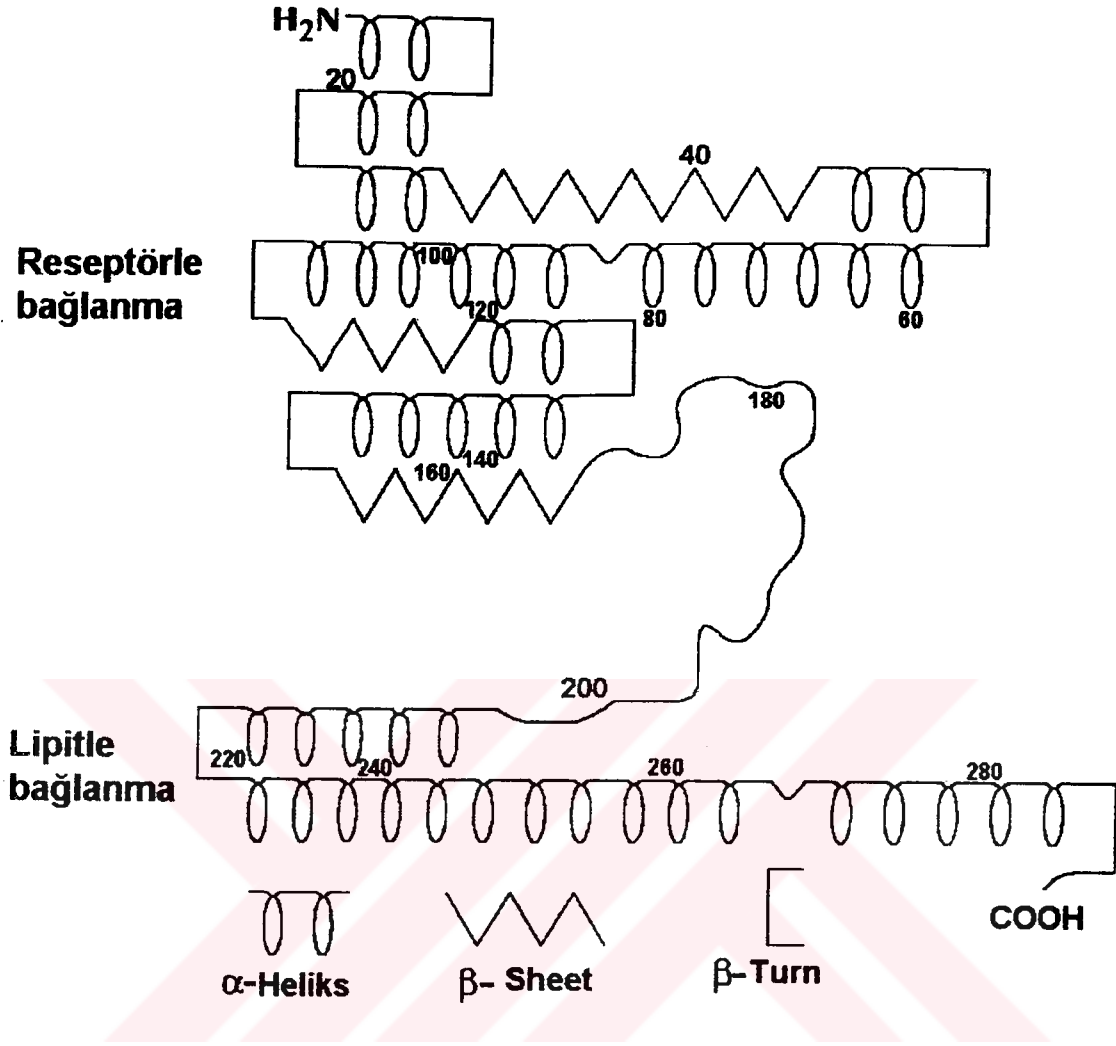
çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca akciğer, düz kas hücreleri, dalak, böbrek, over, gonatlar ve adrenal bez apo E'nin sentezlendiği diğer dokulardır. (10, 58, 74, 99)

4.2. Yapısal Özellikleri:

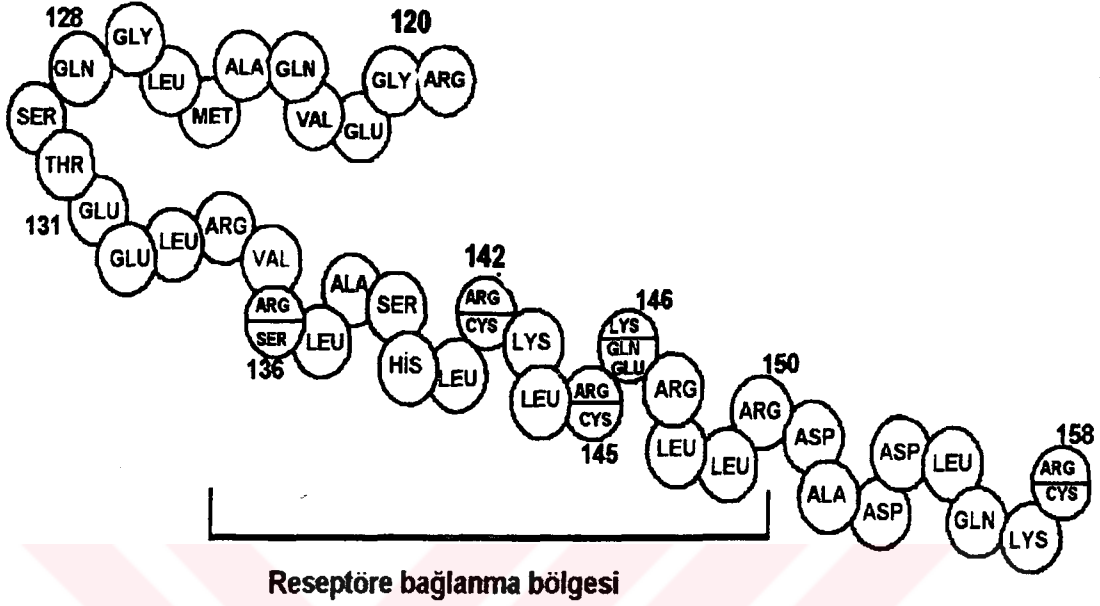
Apo E'nin primer yapısı ilk olarak, VLDL'den saflaştırılan proteinin amino asit dizisinin saptanması ile ortaya çıkarılmıştır. Apo E'nin tahmin edilen sekonder yapısına göre % 62 α heliks, % 9 β sheet, % 11 β turn ve % 16 düzensiz yapılar içermektedir. 165. amino asitten 200. amino asite kadar olan düzensiz yapı molekülü farklı fonksiyonlara sahip, amino ve karboksi terminal kısma ayırmaktadır. Amino terminal kısmın reseptöre bağlanmada, karboksi terminalin ise lipidlere bağlanmada fonksiyon gördüğü düşünülmektedir (Şekil 9). Yapılan çalışmalar sonucunda arginin, lizin ve histidin gibi bazik amino asitlerden oluşan 20 amino asitlik dizinin LDL reseptörüne bağlanmada fonksiyon gördüğü saptanmıştır (Şekil 10). Bağlanmanın, bazik amino asitlerin varlığından dolayı iyonik etkileşimle olduğu düşünülmektedir. Bu bölgedeki bazik amino asitlerin nötral amino asitlerle yer değiştirmesi sonucunda reseptöre olan ilgi azalmaktadır. (37, 47, 57, 58, 61, 74, 98, 102)

4.3. Gen Yapısı:

Apo E geni 19. kromozomun uzun kolunda lokalize ve 3.7 kilobaz uzunluğundadır. Dört ekson ve üç introndan oluşan genden, 1163 nükleotitik mRNA sentezlenmektedir. 317 amino asitlik preproteinden, 18 amino asitten oluşan sinyal peptidin ko-translasyonel olarak uzaklaştırılması ile 299 amino asitlik olgun apo E proteini oluşmaktadır (Şekil 11). Protein, tek bir polipeptit zincirinden oluşup, 34200 dalton moleküler ağırlığa sahiptir. (45, 47, 66, 77, 86)



Şekil 9. Apo E'nin tahmin edilen şekonder yapısı

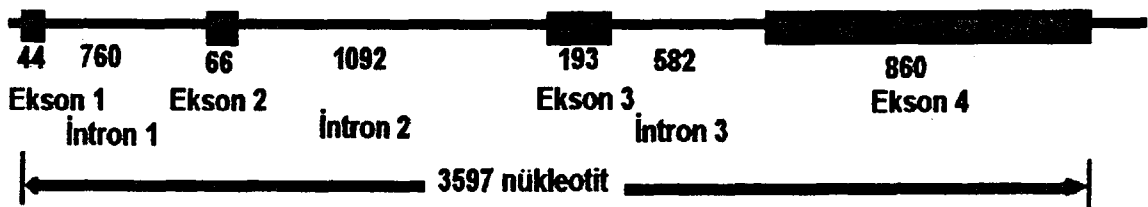


Şekil 10. Apo E'nin reseptöre bağlanma bölgesi. Özellikle bazik amino asitler yer almaktadır. Bu bölgedeki bazik amino asitlerin nötral amino asitlerle yer değiştirmesi apo E'nin reseptöre olan ilgisini azaltmaktadır.

Plazma Apo-E 299 amino asit

Prekürsör protein 317 amino asit

mRNA - A_n 1163 nükleotit



Şekil 11. Apo E geni ve protein ürünü

4.4. Katıldığı Metabolik Olaylar:

4.4.1. Farklı organların hücreleri arasında lipitlerin dağılımı: Diyetel lipitler absorbe edildikten sonra enterositlerde şilomikron sentezi gerçekleşir. Şilomikron, esas olarak trigliseritlerden ve az miktarda da kolesterol esterlerinden oluşur. Temel apolipoproteini apo B 48'dir. Genel dolaşıma geçtikten sonra HDL'den apo E ve apo CII transferi gerçekleşir. Lipoprotein lipaz enzimi ekstrahepatik dokularda, apo C II'nin aktivatör etkisiyle, şilomikronların trigliseritlerini hidroliz eder. Açığa çıkan serbest yağ asitleri, bu dokularca absorbe edilir. Trigliserit içeriğinin çoğunu kaybeden ve kolesterol esterlerince göreceli olarak zenginleşen şilomikron kalıntıları, karaciğerde kalıntı reseptörlerince hücre içine alınırlar. Apo E, şilomikron kalıntısının reseptöre bağlanmasında ligant olarak fonksiyon görür. (74, 96)

Karaciğerde sentezlenen, trigliserit içeriği yüksek olan VLDL'ler apo E, apo B 100 ve apo C'leri içerirler. Ekstrahepatik dokularda, şilomikron metabolizmasında olduğu gibi, lipoprotein lipaz enziminin lipolitik etkisiyle VLDL kalıntıları (IDL) oluşur. IDL, içerdiği apo E miktarıyla orantılı olarak, iki metabolik yol izleyebilir:

1. Daha küçük olan IDL molekülleri daha az apo E içerirler. Hepatik lipaz enziminin etkisiyle trigliseritlerini daha da kaybeder, bu arada apo B 100 dışındaki diğer apolipoproteinlerini de yitirerek LDL'ye dönüşürler.
2. Karaciğerde LDL ya da kalıntı reseptörleri aracılığıyla hücre içine alınırlar. Hem LDL, hem de kalıntı reseptörü ile olan ilişkide apo E aracılık eder. (74, 96)

Periferik dokulardan kolesterol transportunda görev alan HDL'ler, makrofajlar gibi kolesterol ile yüklü hücrelerden interstisyel sıvıya salınan kolesterolü yapılarına alırlar. Bunlar fosfolipitten zengin, apo E içermeyen HDL'lerdir. Kolesterol içeriği artan HDL'ler, makrofaj, düz kas hücreleri gibi değişik hücre tiplerince salgılanan apo E'yi yapılarına alırlar. Apo E'nin kazanılması ile deneysel olarak HDL'lerin kolesterol içeriğinin daha da arttığı gösterilmiştir. Yine deneysel olarak, apo E içeren bu HDL'lerin LDL reseptörlerine bağlanabildiği, apo E'sini kaybedenlerin ise bağlanamadığı gösterilmiştir. HDL'nin LDL reseptörüne bağlanmasında apo E'nin aracılık ettiği sonucu çıkarılmıştır. Fakat insan

plazmasında apo E içeren HDL konsantrasyonunun oldukça düşük olduğu ve periferden karaciğere kolesterol transportunda başka mekanizmaların görev aldığı bilinmektedir. (96)

4.4.2. Bir organ ya da dokuda hücreler arasında lipitlerin yeniden dağılımı:

Apo E'nin, bir dokuda fazla kolesterol içeren hücrelerden, gereksinimi olan diğer hücrelere kolesterol transportunda görev aldığı düşünülmektedir. Olay, gereksinimi olan hücrelerin fazla miktarda LDL reseptörü sentezleyerek, diğerlerinden salınan kolesterol-apo E lipit komplekslerini bu reseptörler aracılığıyla aldığı şeklinde açıklanmaktadır. (17, 47)

4.4.3. Lipit transportu ile ilgili olmayan fonksiyonları: Apo E'nin lipit transportundan ilgisiz, ancak hipotez aşamasında olan fonksiyonlarının da bulunduğu düşünülmektedir. Bunlar:

- Nörotrofik faktör olması,
- Düz kas hücre çoğalması ve farklılaşması üzerine etki ve
- İmmünoregülasyon ile olan ilişkisidir. (36, 47)

4.5. Polimorfizmi:

Apo E'nin polimorfik doğası ilk olarak 1970'lerde tanımlanmıştır. Daha sonrada üç majör apo E izoformu saptanmıştır. İki nedenle polimorfizm gerçekleşmektedir:

1. Post-translasyonel polimorfizm: Proteinin sentezinden sonra, 194. pozisyondaki treonine sialik asitin eklenmesi ile glikozilasyon gerçekleşmektedir. Eklenen sialik asit miktarına göre değişik polaritede polimorfik apo E molekülleri oluşmaktadır.
2. Genetik polimorfizm: Apo E gen lokusu polimorfiktir. Sık görülen üç homozigot (E 2/2, E 3/3, E 4/4) ve üç heterozigot (E 2/3, E 2/4, E 3/4) fenotipin ortaya çıkışından ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 allelleri sorumludur. Bu üç allelin protein ürünü apo E 2, E 3 ve E 4 olmak üzere üç majör apo E izoformu oluşmaktadır (Tablo IV). (15, 17, 58, 59)

Tablo IV. Üç apo E allelinin farklılıkları verilmektedir.

| ALLEL | AMİNO ASİT DEĞİŞİKLİĞİ | | KODON DEĞİŞİKLİĞİ | | YÜK DURUMU |
|--------------|------------------------|---------|-------------------|-----|------------|
| | 112 | 158 | 112 | 158 | |
| ϵ 2 | Sistein | Sistein | TGC | TGC | 0 |
| ϵ 3 | Sistein | Arginin | TGC | CGC | + |
| ϵ 4 | Arginin | Arginin | CGC | CGC | ++ |

Apo E 3 izoformu en sık görülen olduğundan normal tip olarak kabul edilirken, E 2 ve E 4 varyant tipler olarak değerlendirilmektedir. Reseptöre bağlanma bölgesindeki amino asit farklılıkları iyonik etkileşimi değiştirdiğinden, reseptöre olan ilgi de değişmektedir (Tablo V). (10, 37, 47, 57, 61, 74, 98, 102)

Tablo V. Apo E 3 ile karşılaştırıldığında, varyant apo E'lerin LDL reseptörüne bağlanma aktiviteleri (%) verilmektedir.

| Amino asid farklılığı | Reseptöre bağlanma aktivitesi (%) |
|--|-------------------------------------|
| Sistein 112 → Arginin (apo E 4) | 100 |
| Arginin 158 → Sistein (apo E 2) | < 2 |
| Arginin 145 → Sistein | 45 |
| Lizin 146 → Glutamin | 40 |
| Sistein 112 → Arginin, Arginin 142 → Sistein | < 20 |
| Glisin 127 → Aspartat, Arginin 158 → Sistein | 4 |
| Alanin 99 → Treonin, Alanin 152 → Prolin | Bilinmiyor |

Apo E izoformlarının fenotipik olarak saptanmasında izoelektrik fokuslama kullanılmaktadır. Genotip belirlemede kullanılacak DNA metodları:

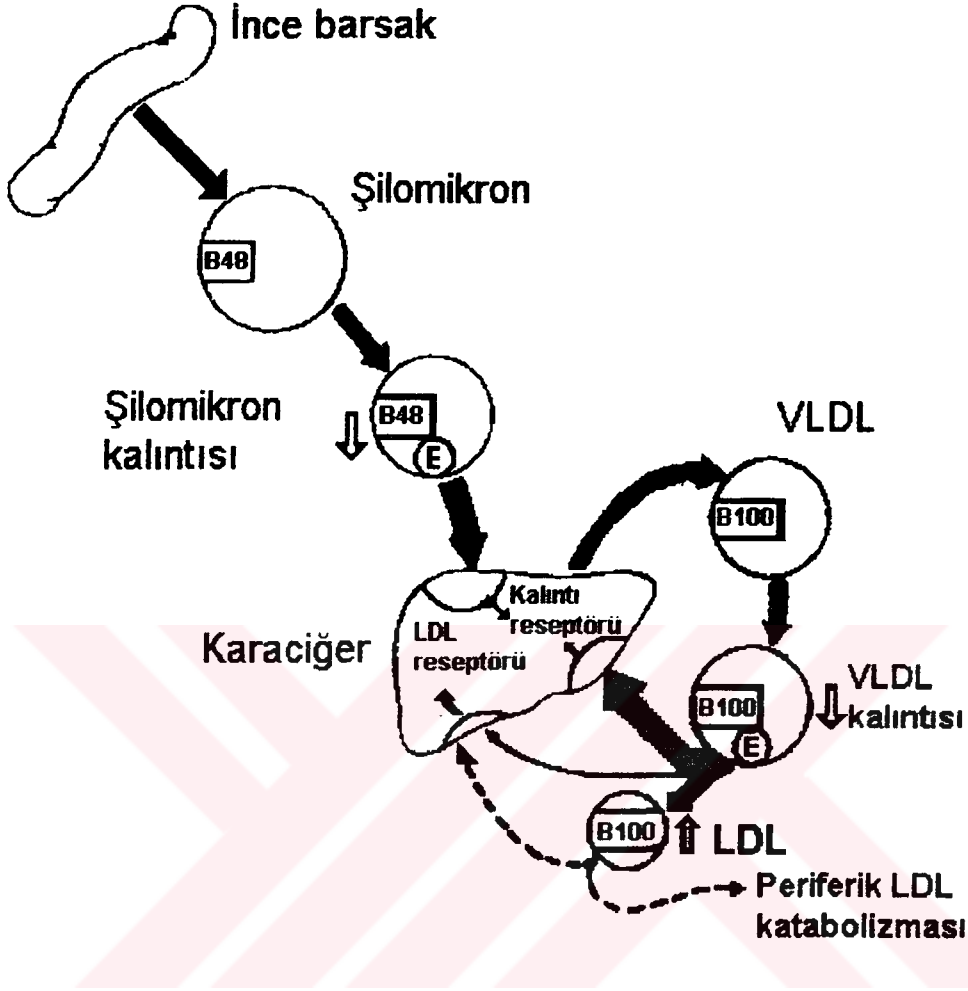
1. Allel spesifik oligonükleotit (ASO) hibridizasyon
2. Restriksiyon tipleme yöntemi (RFLP)
3. Denatüran gradyent jel elektroforezi (DGGE)
4. DNA dizi analizidir.

Kolay ve diğerlerine kıyasla ucuz olmasından dolayı restriksiyon tipleme yöntemi apo E'nin genotipik olarak saptanmasında tercih edilen yöntemdir. Cfo I restriksiyon enzimiyle amplifiye DNA'nın özgün bölgelerden kesilmesinden sonra, ortaya çıkan bantların gösterimi için genel olarak poliakrilamid jel elektroforezi kullanılmaktadır. Ancak poliakrilamidin toksik etkileri ve yöntemin yatay jel elektroforezine göre daha zor uygulanır olması göz önünde bulundurularak, MetaPhor agaroz ya da NuSieve agaroz jel elektroforeziyle apo E izoformlarının tiplendirilmesi yapılmaktadır. (8, 43, 44, 74, 98, 106)

4.6. Kardiyovasküler Hastalıklarda Apo E Polimorfizmi

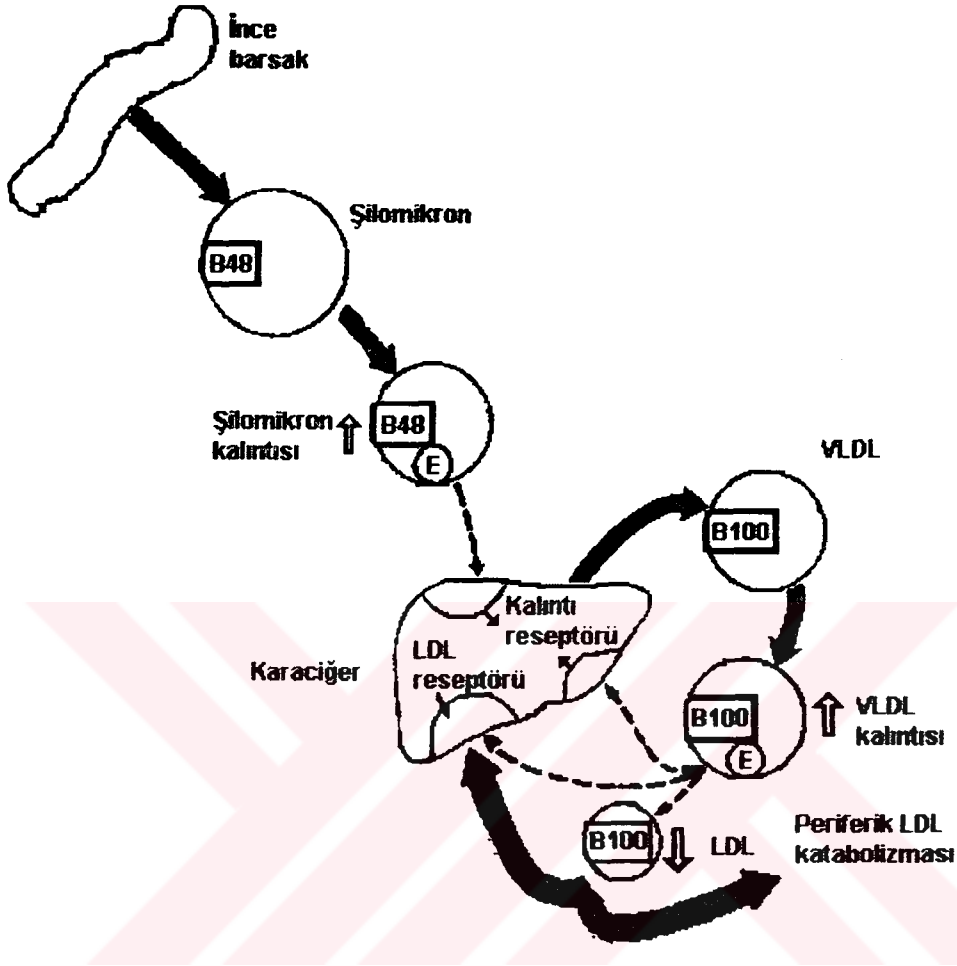
Apo E polimorfizmi ile ateroskleroz arasındaki bağlantı, ilk olarak apo E 2/2 fenotipine sahip tip III hiperlipoproteinemili hastalarda erken koroner kalp hastalığının gözlenmesi ile kurulmuştur. Bu aşamadan sonra konuyla ilgili çalışmaların yoğunlaşması ile apo E'nin, aterosklerozun başlama ve ilerlemesinde bireysel varyasyonun majör belirleyicisi olduğu sonucu çıkarılmıştır. (46, 74)

Apo E4 izoformunu içeren şilomikron ve VLDL kalıntılarının reseptöre bağlanma aktivitesinin yüksek olduğu ve karaciğer tarafından daha hızlı hücre içine alındığı bilinmektedir. Ayrıca apo E'nin aracılık ettiği VLDL kalıntılarının LDL'ye dönüşüm hızı, E4 izoformunu içerenlerde daha yüksek oranda olmakta ve LDL oluşum hızını arttırmaktadır. Karaciğere kolesterol transportu ve LDL oluşum hızındaki artma, LDL reseptör sentezini baskılamakta ve sonuç olarak da LDL düzeyi daha yüksek olurken, şilomikron ve VLDL kalıntılarının düzeyi daha düşük olmaktadır (Şekil 12). (19, 74, 84, 96)



Şekil 12. Apo E 4/4 genotipinde lipoprotein metabolizması. VLDL ve şilomikron kalıntılarının plazma düzeyleri azalırken, LDL oluşum hızında artış ve periferik katabolizmasındaki yavaşlama sonucu konsantrasyonunun artması söz konusudur.

E2 izoformunu içeren şilomikron ve VLDL kalıntılarının reseptöre bağlanma aktivitelerinin düşük olması nedeniyle katabolizmalarının daha yavaş olduğu bilinmektedir. E4 izoformunun tersine, E2 izoformunu içeren VLDL'lerin LDL'ye dönüşüm hızları daha yavaştır. Karaciğere azalmış kolesterol transportu ve LDL oluşum hızındaki azalma, LDL reseptör sentezini uyaracaktır (Şekil 13). E2 izoformuna sahip bireylerde daha düşük LDL düzeyleri olurken, şilomikron ve VLDL kalıntılarının düzeyleri daha yüksek olacaktır (Tablo VI). (19, 74, 84, 96, 101)



Şekil 13. Apo E 2/2 genotipinde lipoprotein metabolizması. VLDL ve şilomikron kalıntılarının plazma düzeyi yüksektir. Diğer taraftan LDL oluşum hızındaki azalma ve periferik katabolizmasındaki artışa paralel, LDL plazma konsantrasyon düşüklüğü gözlenir.

Tablo VI. $\epsilon 3$ ile $\epsilon 2$ ve $\epsilon 4$ allelleri kıyaslandığında plazma lipid parametrelerindeki farklılık.

| Allel | Total Kolesterol | LDL Kolesterol | LDL Apo B | Trigliserit | Apo E |
|--------------|------------------|----------------|-----------|-------------|-------|
| $\epsilon 2$ | ↓ | ↓ | ↓ | ↑ | ↑ |
| $\epsilon 4$ | ↑ | ↑ | ↑ | ↓ | ↓ |

↓: $\epsilon 3$ 'den daha düşük, ↑: $\epsilon 3$ 'den daha yüksek

Yapılan çalışmalarda yüksek LDL kolesterol düzeyi ile ilişkili olan E4 izoformunun ateroskleroz açısından bir risk faktörü olduğu, E2 izoformunun ise tip III hiperlipoproteinemi gelişmediği sürece, ateroskleroza karşı koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. (18, 60)

Tip III hiperlipoproteinemi trigliseritten zengin lipoprotein kalıntılarının (β -VLDL) plazmada artışı ile karakterize herediter bir dislipidemidir. Hastalarda kolesterol ve trigliserit yüksekliği birlikte bulunmaktadır. β -VLDL partiküllerinin aterojenik etkisiyle erken yaşta ateroskleroz gelişmektedir. Tip III hiperlipoproteinemili hastalarda, bazı ender vakalar dışında E 2/2 fenotipi saptanmaktadır. Fakat hastalığın prevalansı 1:10000 iken, E 2/2 fenotipinin görülme sıklığının çok daha yüksek olması, hastalığın ortaya çıkışında genetik ya da çevresel başka faktörlerin de rol oynadığını düşündürmektedir. (19, 42, 58, 84)

4.7. Apo E Polimorfizmi ve Alzheimer Hastalığı

Alzheimer hastalığı ekstrasellüler senil plaklar, nöron ve dendritlerde nörofibriler karışıklıklar ve vasküler amiloyid birikimi ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Alzheimer hastalığı ile ϵ 4 alleli arasındaki ilişki, ilk olarak 1989 yılında Shimano ve arkadaşları tarafından tanımlanmış ve hastalarda ϵ 4 allelinin, kontrolle karşılaştırıldığında iki kat daha yüksek sıklıkta görüldüğü saptanmıştır. (45, 52, 69, 74)

Alzheimer hastalığında primer değişiklikler olan senil plakların ve nörofibriler karışıklıkların oluşumunda apo E'nin de rol aldığı düşünülmektedir. Senil plakların ana komponentini amiloyid β peptidi oluştururken, nörofibriler karışıklıkların ana komponentini Tau proteini oluşturmaktadır. Deneysel olarak apo E'nin amiloyid β peptidine bağlanarak, denatürasyona dirençli stabil kompleksler oluşturduğu gösterilmiştir. Apo E4, E3'e göre amiloyid β peptidine çok daha hızlı bağlanma göstermektedir. ϵ 4 alleli olan hastalarda, apo E amiloyid β ile kolayca birleşerek çökmesini sağlamakta ve senil plak oluşumu gerçekleşmektedir. Anormal olarak hiperfosforile olmuş Tau proteini, hücre içinde nörofibriler karışıklıklarla ilgili olarak çiftleşmiş helikal filamentler oluşturur. Bu filamentlerin oluşumu apo E genotipi ile ilişki göstermektedir. Apo E3 Tau proteinini bağlayarak fosforilasyona karşı koruyucu etki gösterirken, apo E4

bağlayamamaktadır. ϵ 4 alleli olan hastalarda, serbest Tau proteini fosforile olarak nörofibrillerin yapısını etkilemektedir. (7, 78)



GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. Araç ve Gereçler:

1.1. Cihazlar:

| | |
|----------------------------------|----------------------------------|
| 1. UV Spektrofotometre | Shimadzu UV-120-02 |
| 2. Mikrosantrifüj | Fisher 235B |
| 3. Soğutmalı masa üstü santrifüj | Eppendorf centrifuge 5403 |
| 4. Thermal Cycler | Perkin Elmer Cetus |
| 5. Speed Vac Konsantratör | Savant SVC 100H |
| 6. Elektroforez Tankı | Pharmacia GNA-100 |
| 7. Güç Kaynağı | Pharmacia EPS 500/400 |
| 8. Mikrodalga Fırın | Vestel Goldstar |
| 9. Derin Dondurucu | Bosch |
| 10. Kar Makinası | Scotsman AF-10 |
| 11. Polaroid Kamera | MP4 Land Camera |
| 12. Su Banyosu | Electro-mag |
| 13. Etüv | Nüve EN 500 |
| 14. Analitik Terazî | Mettler AJ 100 |
| 15. pH Metre | Beckman Century SS 1 |
| 16. Otomatik Pipet | Gilson 10, 20, 100, 200, 1000 µl |
| 17. Eliza | Denley Wellprep 2000 |
| 18. Dansitometre | Cliniscan 2 |

1.2. Kimyasal Maddeler:

1. Proteinaz K
2. Deoksi Adenozin Trifosfat (dATP)
3. Deoksi Sitozin Trifosfat (dCTP)
4. Deoksi Guanozin Trifosfat (dGTP)
5. Deoksi Timidin Trifosfat (dTTP)
6. Taq Polimeraz
7. Bovin Serum Albumin

8. Dimetil sulfoksit (DMSO)
9. Primerler
10. Cfo I Restriksiyon Enzimi
11. Φ X 174 DNA / Hae III Marker
12. Agaroz
13. NuSieve Agaroz
14. Etidiyum Bromür

Diğer tüm kimyasal maddeler analar kalitede olup, Sigma ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

1.3. Kitler:

- | | |
|-------------------------------|-------------------------------------|
| 1. Kolesterol Kiti | Boehringer Mannheim MPR 1 1 442 341 |
| 2. LDL Kolesterol Çöktürücüsü | Boehringer Mannheim 726 290 |
| 3. HDL Kolesterol Çöktürücüsü | Boehringer Mannheim 543 004 |
| 4. Trigliserit Kiti | Randox TR 210 |
| 5. Apolipoprotein B Kiti | The Binding Site NK086 |
| 6. Apolipoprotein A1 Kiti | The Binding Site NK085 |
| 7. Lipoprotein (a) Kiti | Boehringer Mannheim 1 386 107 |

2. Örnek Toplama:

Kan örnekleri Adana ili Yemişli köyünden ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına lipit parametrelerini öğrenmek amacıyla başvuran kişilerden alındı. Kişilerle daha önceden temasa geçilerek, kan alınmasından önce 12 saat aç kalmaları söylendi. EDTA'lı tüplere 5 ml kan örneği alındı. Köyden toplanan kan örnekleri Adana'ya, buz kabında korunarak taşındı. Örnekler santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Her örnekten, iki ependorf tüpüne 250'şer μ l plazma konarak, daha sonra lipoprotein (a), apolipoprotein A1 ve B çalışılmak üzere derin dondurucuda -20°C 'de saklandı. Lipoprotein elektroforezi, total, LDL ve HDL kolesterol ile trigliserit düzeylerinin saptanmasından sonra lökosit DNA'ları izole edilerek, restriksiyon tipleme yöntemi ile apo E genotipleri belirlendi.

3. Analiz Yöntemleri:

3.1. Lipoprotein Elektroforezi:

Prensip: Lipoproteinler elektriksel bir alanda farklı mesafelere göç ederler. Ayırışmayı, taşıdıkları farklı yükler yanında, şekil ve boyut farklılıkları ile destek materyaliyle olan etkileşimleri belirler. Alkali ortamda lipoproteinler negatif yüklüdürler ve elektriksel alanda anoda doğru göç ederler. Sellüloz asetat kağıdında HDL (α -lipoprotein) anoda doğru en hızlı göç eden lipoproteindir. Bunu sırasıyla VLDL (pre- β -lipoprotein) ve LDL (β -lipoprotein) izler. Şilomikron ise aplikasyon noktasında yer alır. (79)

Ayırıklar:

1. Barbitol Tamponu: 0.05 mol/L, pH 8.6

Sodyum Barbitol 10.6 g

Disodyum EDTA 0.70 g

tartılarak 1000 ml'ye distile su ile tamamlanır.

2. Sellüloz asetat elektroforez kağıdı (Sartorius 12200)

3. Stok oil red boyası: 0.3 g toz boya %70'lik, 500 ml metanol içinde çözülür.

Isıtıcıda kaynatılır. Kaynar kaynamaz ısıtıcıdan alınır. 37°C'de etüvde saklanır.

Süzmeden kullanılır.

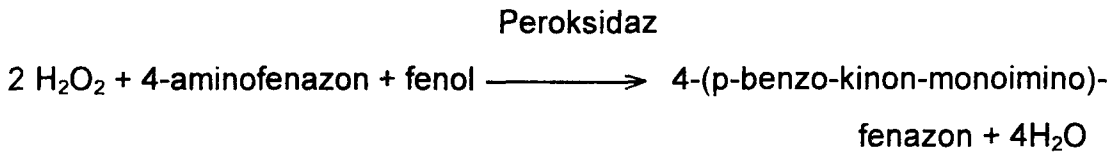
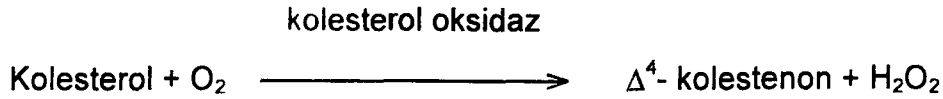
4. Çalışma boyası: Etüvde saklanan boyadan 30 ml alınarak, üzerine 0.1 N'lik NaOH'ten 7 ml ilave edilir.

Yöntem: Elektroforez tankının anod ve katoduna eşit miktarda barbitol tampon konur. Sellüloz asetat elektroforez kağıtları tampon içinde 15 dakika ıslatılır. İki μ 'lik aplikatör ile aplikasyon uygulanır. Kağıt tankın köprüsüne yerleştirilir. Santimetresine 0.6 mA akım 45 dakika uygulanır. Oil red boyası içinde bir gece bekletilir. Ertesi gün suyla yıkanarak artık boya kalıntılarından temizlenir. Dansitometre ile boya yoğunluğuna göre lipoprotein yüzdeleri saptanır.

3.2. Total Kolesterol Tayini (CHOD-PAP Metodu - Enzimatik Yöntem)

Prensip: Kolesterol esterlerinin tümü kolesterol esteraz ile serbest kolesterol ve yağ asitlerine dönüştürülür. Ortamda oksijen varlığında, serbest kolesterol kolesterol oksidaz ile kolest-4-en-3-on ve H₂O₂'e çevrilir. H₂O₂, peroksidaz

varlığında fenol ve 4-aminofenazon ile reaksiyona girerek kinonimin boyasını oluşturur. Oluşan renk şiddeti kolesterol konsantrasyonu ile orantılıdır. 500 nm'de fotometrik olarak ölçüm yapılır.



Ayıraçlar:

1. Kolesterol ayıracı
2. Kolesterol standardı (200 mg/dl)

Yöntem: Test tüplerine Tablo VII'deki gibi pipetleme yapılır.

Tablo VII. Total kolesterol için deney tüplerine pipetlenecek miktarlar

| | Ayıraç Körü | Standart | Örnek |
|----------------------|-------------|----------|---------|
| Örnek materyali | --- | --- | 10 µl |
| Kolesterol standardı | --- | 10 µl | --- |
| Kolesterol ayıracı | 1000 µl | 1000 µl | 1000 µl |

Karıştırılır, tüpler 20-25°C' de 10 dakika inkübe edilir. Bir saat içinde, spektrofotometrede ayıraç körüne karşı 500 nm'de okuma yapılır.

Hesaplama:

mg/dl konsantrasyon = 575 x A_{örnek} ya da

$$\text{mg/dl konsantrasyon} = \frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{Standart}}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$$

3.3. LDL Kolesterol Tayini: (Polivinil sülfat presipitasyon metodu)

Prensip: Örneğe polivinil sülfat eklenmesi ile LDL kolesterol presipite edilir. Santrifugasyondan sonra supernatanın kolesterol içeriği enzimatik olarak ölçülür. Total kolesterolden ölçülen değer çıkarılarak LDL kolesterol düzeyi saptanır.

Ayıraçlar:

1. Kolesterol ayıracı
2. Polivinil sülfat
3. Akseleratör

Bir şişe polivinil sülfat üzerine 1000 µl akseleratör eklenerek presipite edici solüsyon hazırlanır. Solüsyon oda ısısında 4 hafta dayanıklıdır.

Yöntem:

a) Presipitasyon: 200 µl örnek üzerine 100 µl presipite edici solüsyondan eklenir. Karıştırılır, oda ısısında 15 dakika inkübe edilir. 10 000 g'de 2 dakika sanrifüj edilir.

b) Kolesterol Tayini: Tablo VIII'deki gibi pipetleme yapılır.

Tablo VIII. LDL kolesterol için deney tüplerine pipetlenecek miktarlar

| | Ayıraç Körü | Örnek |
|---------------------------|--------------------|--------------|
| Redistile su | 25 µl | --- |
| Supernatan | --- | 25 µl |
| Kolesterol ayıracı | 1000 µl | 1000 µl |

Karıştırılır ve tüpler oda ısısında 10 dakika inkübe edilir. Bir saat içerisinde örneğin absorbansı ayıraç körüne karşı, spektrofotometrede 500 nm'de okunur.

Hesaplama:

$$\text{mg/dl supernatan kolesterolü} = A_{\text{örnek}} \times 350.1$$

$$\text{LDL kolesterol} = \text{Total kolesterol} - \text{Supernatanın kolesterolü}$$

3.4. HDL Kolesterol Tayini:

Prensip: Örneğe fosfotungstik asit ve magnezyum iyonlarının eklenmesiyle şilomikronlar, VLDL ve LDL presipite olur. Santrifüj sonucu supernatanda sadece HDL kalır. Supernatanın kolesterol içeriği enzimatik olarak saptanır.

Ayıraçlar:

1. Kolesterol ayıracı
2. Presipite edici solüsyon

Yöntem:

a) **Presipitasyon:** 200 µl örnek üzerine 500 µl presipite edici solüsyondan eklenir. Karıştırılarak, oda ısısında 10 dakika inkübe edilir. 12 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.

b) **Kolesterol Tayini:** Tablo IX'daki gibi pipetleme yapılır.

Tablo IX. HDL kolesterol için deney tüplerine pipetlenecek miktarlar

| | Ayıraç Körü | Örnek |
|---------------------------|--------------------|--------------|
| Redistile su | 100 µl | --- |
| Supernatan | --- | 100 µl |
| Kolesterol ayıracı | 1000 µl | 1000 µl |

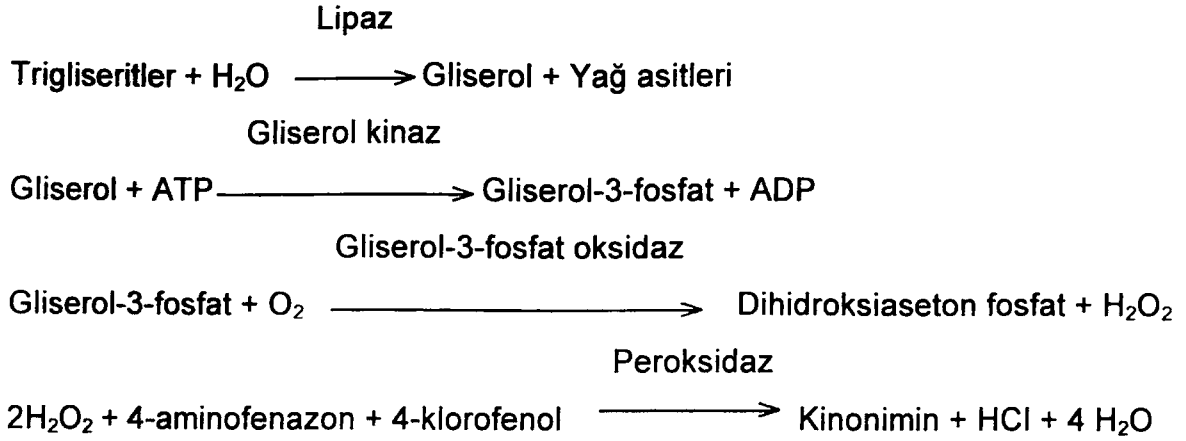
Karıştırıldıktan sonra tüpler oda ısısında 10 dakika inkübe edilir. Bir saat içerisinde örneğin absorbanansı ayıraç körüne karşı, spektrofotometrede 500 nm'de okunur.

Hesaplama:

$$\text{mg/dl HDL Kolesterol} = A_{\text{örnek}} \times 219.2$$

3.5. Trigliserit Tayini: (GPO-PAP Metodu, Enzimatik Yöntem)

Prensip: Trigliseritlerin lipaz ile hidrolizi sonucu gliserol ve yağ asitleri açığa çıkar. Gliserol, ATP varlığında gliserol kinaz ile gliserol-3-fosfata dönüşür. Gliserol-3-fosfat, oksijen varlığında gliserol-3-fosfat oksidaz ile dihidroksiaseton fosfat ve H₂O₂ oluşturur. H₂O₂, peroksidaz varlığında fenol ve 4-aminofenazon ile reaksiyona girerek kinonimin boyasını oluşturur. Oluşan renk şiddeti trigliserit konsantrasyonu ile orantılıdır. 500 nm'de fotometrik olarak ölçüm yapılır.



Ayıracılar:

1. Tampon
2. Enzim ayıracı: Bir şişe enzim ayıracı içerisine 15 ml tampon konarak karıştırılır. 2-8°C'de 21 gün dayanıklıdır.
3. Trigliserit standardı (200 mg/dl)

Yöntem: Tablo X'daki gibi pipetleme yapılır.

Tablo X. Trigliserit tayini için deney tüplerine pipetlenmesi gereken miktarlar

| | Ayıracı Kökü | Standart | Örnek |
|---------------|--------------|----------|---------|
| Örnek | --- | --- | 10 µl |
| Standart | --- | 10 µl | --- |
| Enzim ayıracı | 1000 µl | 1000 µl | 1000 µl |

Karıştırılır ve oda ısısında 10 dakika inkübe edilir. 60 dakika içerisinde örneğin ve standardın absorbansı, ayıracı körüne karşı 500 nm'de okunur.

Hesaplama:

mg/dl konsantrasyon = $743 \times A_{\text{örnek}}$ ya da

mg/dl konsantrasyon = $\frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{Standart}}} \times \text{Standart konsantrasyonu}$

3.6. Apolipoprotein AI Tayini: (Türbidimetrik Yöntem)

Prensip: Türbidimetri, solüsyonda bulunan partiküllerin yaydığı ışığı ölçme esasına dayanır. Örnekteki apo AI'ın özgün antikorlarla birleşerek, türbidite ile sonuçlanan immün kompleksler oluştururlar. Oluşan türbiditenin miktarı örneğin apo AI konsantrasyonu ile orantılıdır. Türbidite spektrofotometrede 340 nm'de ölçülür. Daha önceden farklı konsantrasyonlardaki apo AI kalibratörleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisinden örneğin konsantrasyonu saptanır.

Ayırıcılar:

1. Antiserum
2. Antiserum sulandırıcısı
3. Kalibratör (163 mg/dl)
4. Düşük kontrol (62-84 mg/dl)
5. Yüksek kontrol (189-257 mg/dl)
6. Serum sulandırıcısı

Yöntem:

a) Standart eğri çizimi (Tablo XI)

Tablo XI. Apo AI için standart eğri çiziminde kullanılacak standartların hazırlanması

| | Kalibratör hacmi (μ l) | Serum sulandırıcısı hacmi (μ l) | Konsantrasyon (% kalibratör değeri) |
|-----------|--------------------------------|---|--|
| S1 | 10 | 450 | 20 |
| S2 | 15 | 360 | 40 |
| S3 | 25 | 300 | 80 |
| S4 | 50 | 365 | 120 |
| S5 | 60 | 320 | 160 |
| S6 | 100 | 400 | 200 |

b) Örnek ve kontrollerin hazırlanması

Kontrol / Örnek hacmi

50 μ l

Serum sulandırıcısı hacmi

450 μ l

Dilüsyon

1 / 10

c) Uygulama:

Antiserum sulandırıcısı 675 µl

Sulandırılmış standart/örnek/kontrol 15 µl

340 nm'de su körüne karşı optik dansite₁ (OD₁) ölçülür.

Antiserum 75 µl

Karıştırılır, oda ısısında 520 saniye sonra OD₂ ölçülür.

Hesaplama:

$$\Delta OD = OD_2 - OD_1$$

Çalışılan standartlarla çizilen kalibrasyon eğrisinden, örneğin ve kontrollerin konsantrasyonları saptanır.

3.7. Apolipoprotein B Tayini: (Türbidimetrik Yöntem)

Prensip: Türbidimetri, solüsyonda bulunan partiküllerin yaydığı ışığı ölçme esasına dayanır. Örnekteki apo B özgün antikorlarla birleşerek, türbidite ile sonuçlanan immün kompleksler oluştururlar. Oluşan türbiditenin miktarı örneğin apo B konsantrasyonu ile orantılıdır. Türbidite spektrofotometrede 340 nm'de ölçülür. Daha önceden farklı konsantrasyonlardaki apo B kalibratörleri kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisinden örneğin konsantrasyonu saptanır.

Ayırıcılar:

1. Antiserum
2. Antiserum sulandırıcısı
3. Kalibratör (99 mg/dl)
4. Düşük kontrol (40-60 mg/dl)
5. Yüksek kontrol (100-140 mg/dl)
6. Serum sulandırıcısı

Yöntem:

a) Standart eğri çizimi (Tablo XII)

Tablo XII. Apo B için standart eğri çiziminde kullanılacak standartların hazırlanması

| | Kalibratör hacmi (μ l) | Serum sulandırıcısı hacmi (μ l) | Konsantrasyon (% kalibratör değeri) |
|----|--------------------------------|---|--|
| S1 | 20 | 480 | 20 |
| S2 | 40 | 460 | 40 |
| S3 | 80 | 420 | 80 |
| S4 | 160 | 340 | 120 |
| S5 | 180 | 320 | 160 |
| S6 | 200 | 300 | 200 |

b) Örnek ve kontrollerin hazırlanması

| <u>Kontrol / Örnek hacmi</u> | <u>Serum sulandırıcısı hacmi</u> | <u>Dilüsyon</u> |
|------------------------------|----------------------------------|-----------------|
| 50 μ l | 200 μ l | 1 / 5 |

c) Uygulama:

Antiserum sulandırıcısı 450 μ l

Sulandırılmış standart/örnek/kontrol 80 μ l

340 nm'de su körüne karşı optik dansite₁ (OD₁) ölçülür.

Antiserum 50 μ l

Karıştırılır, oda ısısında 360 saniye sonra OD₂ ölçülür.

Hesaplama:

$$\Delta OD = OD_2 - OD_1$$

Çalışılan standartlarla çizilen kalibrasyon eğrisinden, örneğin ve kontrollerin konsantrasyonları saptanır.

3.8. Lipoprotein (a) Tayini: (Mikroeliza)

Prensip: Öncelikle 'mikro plate' kuyucuklarının duvarına poliklonal antikolar adsorptif olarak bağlanır. Serbest antikolar yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılır. Kuyucuklara özgün olmayan proteinlerin bağlanmasını önlemek amacıyla 'bloking' ayıraç ile inkübe edilir. Daha sonra serum/plazma/standart eklenir. Serum/plazma/standart içindeki Lp (a), kuyucukların duvarına bağlı antikolara

bağlanır. Bağlanmayan proteinler yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılır. Peroksidaz işaretli monoklonal antikörlerle inkübe edilir. Bu antikörler Lp (a)'ya fikse olurlar. Ortama kromojen bir madde eklenmesiyle de Lp (a) konsantrasyonu ile orantılı olarak, koyu yeşil bir renk oluşur. Lp (a) konsantrasyonu çizilen standart eğriden değerlendirilir.

Ayırıcılar:

1. 'Coating' tampon: PBS (phosphate buffer saline) toz karışımı 1000 ml redistile su içinde çözülür. 100 ml'si 'capture antibody' solüsyonu ve 'conjugate dilution' hazırlanmasında kullanılır.
2. Konsantre 'capture antibody' solüsyonu: Liyofilizat 1 ml redistile su içinde çözülür. 50 µl'lik 20 alikota ayrılır. -20°C'de saklanır.
3. 'Capture antibody' solüsyonu: 50 µl konsantre 'capture antibody' solüsyonu 1 ml 'coating' tampon ile sulandırılır. 10 test için yeterlidir. Kullanılacağı an hazırlanmalıdır.
4. Yıkama solüsyonu: 450 µl Tween 20, 900 ml 'coating' tampona eklenir.
5. 'Blocking/diluting' solüsyonu: 100 ml konsantre 'blocking/diluting' solüsyonu 1000 ml'ye redistile su ile tamamlanır.
6. Stok Lp (a) standardı: Liyofilize standart üzerine 500 µl redistile su eklenir. Konsantrasyonu 50 mg/dl'dir.
7. Standart dilüsyonları: Kullanılacağı an hazırlanmalıdır. (Tablo XIII)

Tablo XIII. Lp (a) standartlarının hazırlanması

| | 'Blocking/diluting solüsyonu (ml) | Stok standart (µl) | Konsantrasyon (mg/dl) |
|-----------|-----------------------------------|--------------------|-----------------------|
| S1 | 5.0 | 100 | 1.0 |
| S2 | 5.0 | 50 | 0.5 |
| S3 | 5.0 | 20 | 0.2 |
| S4 | 5.0 | 10 | 0.1 |
| S5 | 5.0 | S2'den 500 | 0.05 |
| S6 | 5.0 | S3'den 500 | 0.02 |

8. Serum dilüsyonu: 10 µl serum, 5 ml 'blocking/diluting' solüsyonu ile 1/500 oranında sulandırılır.
9. Konsantre 'conjugate' solüsyonu: 1 ml redistile su içinde çözülür. Mikrobiyal kontaminasyondan korumak amacıyla birkaç timol kristali eklenir. Dondurulmamalıdır.
10. Çalışma 'conjugate' solüsyonu: 50 µl konsantre 'conjugate' solüsyonuna 1ml 'blocking/diluting' solüsyonundan eklenerek hazırlanır. Kullanılacağı an hazırlanmalıdır.
11. Substrat solüsyonu: 2 ABTS tableti 10 ml substrat tamponu içinde çözülür. 100 test için yeterlidir. Işıktan korunmalıdır.

Yöntem: İnkübasyon oda ısısında 700 rpm'de çalkamayı kapsar.

1. Antikorla kaplama: 'Mikro plate'in her kuyusuna 100 µl 'capture antibody' solüsyonu pipetlenir. 30 dakika inkübe edilir.
2. Yıkama: Kuyular boşaltılır. Kalan sıvı kısım selüloz gibi yumuşak-kuru bir zemin üzerine hafifçe vurularak uzaklaştırılır. Her kuyuya 250 µl yıkama solüsyonundan eklenir. Etkisini göstermesi için 15 saniye beklenir. Daha sonra boşaltılarak, yukarıda anlatıldığı şekilde sıvı kısım uzaklaştırılır. Bu olay 3 kez tekrarlanır.
3. 'Blocking/diluting' solüsyonla kaplama: Her kuyuya 250 µl 'blocking/diluting' solüsyondan pipetlenir. 15 dakika inkübe edilir.
4. Yıkama: 2. aşamada anlatıldığı şekilde yapılır.
5. Standart/örnek ile reaksiyon: Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 6 standart ve sulandırılmış örneklerden 100'er µl kuyucuklara pipetlenir. 30 dakika inkübe edilir.
6. Yıkama: 2. aşamada anlatıldığı şekilde yapılır.
7. 'Conjugate' ile inkübasyon: Her kuyuya 100'er µl çalışma 'conjugate' solüsyonu pipetlenir. 90 dakika inkübe edilir.
8. Yıkama: 2. aşamada anlatıldığı şekilde yapılır.
9. Substratla reaksiyon: Her kuyuya 100'er µl substrat solüsyonu pipetlenir. 30 dakika inkübe edilir.

Bir 'mikro plate' okuyucu kullanarak, 405 nm'de okuma yapılır. Sonuçlar çizilen standart eğriden değerlendirilir.

3.9. Tam Kandan DNA Eldesi:

Prensip: Tam kandaki eritrositler hipotonik lizis çözeltisi ile patlatıldıktan sonra santrifüj edilerek lökositler ayrıştırılır. Sodyum klorür-tris-EDTA (STE) çözeltisi ile lökosit pelleti süspansiyon edilir. Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve proteinaz K eklenerek, hücre zarlarının ve proteinlerin hidrolizi gerçekleştirilir. Bir gece inkübasyondan sonra protein ve hücre artıkları fenol-kloroform ile uzaklaştırılır. Pürifiye edilen DNA soğuk saf etanolde çöktürülerek, genomik DNA elde edilir.

(105)

Ayırıcılar:

1. 5 x Retik salin çözeltisi:

| | |
|--------------------------------------|--|
| NaCl | 40.9 g |
| KCl | 1.85 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 7.1 g distile su ile litreye tamamlanır. |

2. Lizis çözeltisi: Günlük hazırlanmalıdır.

| | |
|---|---|
| 131 mM NH ₄ Cl | 7.14 g |
| 0.9 mM NH ₄ HCO ₃ | 0.07 g distile su ile litreye tamamlanır. |

3. STE çözeltisi:

| | |
|------------|--|
| 0.1 M NaCl | 5.844 g |
| 0.2 M Tris | 6.057 g |
| 1 mM EDTA | 0.3722 g distile su ile litreye tamamlanır. NaOH |

ya da HCl kullanılarak pH'sı 7.4'e ayarlanır.

4. Proteinaz K çözeltisi: 25 mg proteinaz K, pH'sı 7.4 olan 10 mM'lık 2.5 ml tris tamponda çözülür ve -20°C'de saklanır.

5. Fenol: 1000 g fenole 200 mM, pH 8.5 tris (200 mM tris: 24.22 g tris baz 1000 ml saf suda çözülerek hazırlanır, pH'sı 8.5'e HCl ile ayarlanır) tampon eşit miktarda eklenir. İyice karıştıktan sonra fazlar ayrışınca kadar bekletilir. Üst fazın pH'sı ölçülür. pH 8.5'in altında ise üst faz dökülerek yeni tampon eklenir. Aynı işleme pH yaklaşık 8.5 oluncaya kadar devam edilir. Son olarak konsantrasyonu %0.1 olacak şekilde 8-hidroksi kinolin (1 g) eklenir. Buzdolabında saklanır.

6. TE solüsyonu:

| | |
|------------|----------|
| 10 mM Tris | 1.2114 g |
|------------|----------|

1 mM EDTA

0.3722 g distile su ile litreye tamamlanır, HCl ile

pH 7.4'e ayarlanır.

7. Kloroform

Yöntem:

1. EDTA'lı tüpe 5 ml kan alınır. Santrifüj edilerek plazması uzaklaştırılır.
2. 15 ml'lik tüpe aktarılır ve üzerine eşit miktarda 1x retik salin eklenir.
3. 4°C'de, 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
4. Beyaz küre tabakasına dikkat edilerek, süpernatant aspire edilir.
5. 1x retik salin ile yıkama işlemi üç kez tekrarlanır.
6. Günlük hazırlanmış lizis solüsyonu ile eritrositler patlatılır. Oda ısısında 5-10 dakika yavaşça karıştırılır.
7. 4°C'de, 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
8. Süpernatant aspire edilir ve lizis işlemi üç kez tekrarlanır.
9. Lökosit pelleti 5 ml STE içerisinde süspansiyon edilir. İçine 1/20 oranında %20'lik SDS ve 100 µl proteinaz K eklenerek, bir gece 37°C'de bekletilir.
10. Ertesi sabah solüsyon kıvamlı bir hal alır. Eğer lökositler tam olarak parçalanmamışsa iki saat daha inkübasyonda bırakılır.
11. Eşit hacimde fenol eklenir. Yavaşça 10 dakika karıştırılır ve 10 dakika buzda bekletilir. 4°C'de, 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
12. Üst faz pastör pipeti ile çekilerek temiz bir tüpe aktarılır.
13. 2.5 ml fenol ve 2.5 ml kloroform eklenir. Yavaşça 10 dakika karıştırılır ve 10 dakika buzda bekletilir. 4°C'de, 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
14. Üst faz pastör pipeti ile çekilerek temiz bir tüpe aktarılır..
15. 5 ml kloroform eklenir. Yavaşça 10 dakika karıştırılır ve 10 dakika buzda bekletilir. 4°C'de, 2500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
16. Üstteki faz %95'lik soğuk etanol içine aktarılır. DNA'nın hava kabarcıkları şeklinde presipite olduğu gözlenir.
17. Presipite olan DNA %70'lik etanole aktarılarak yıkanır. 2 dakika santrifüj edilir.
18. Dikkatlice alkol dökülür, içinde kalan az miktar ise 'speed vac'a konarak uçurulur.

19. DNA pelleti üzerine TE solüsyonu eklenerek, 37°C'de bir gece inkübe edilir. DNA tamamen çözülünce 10 µl'si 590 µl saf suyla karıştırılır. 260 nm'deki absorbansı ölçülerek, konsantrasyonu hesaplanır.

$$\mu\text{g/ml konsantrasyon} = \text{OD}_{260} \times \text{sulandırma katsayısı (60)} \times 40$$

DNA'nın 280 nm'deki absorbansı da ölçülerek, $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ oranından verimi hesaplanır. Verimin 1.5'dan daha yüksek olması istenir.

3.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Apo E Geninin Amplifikasyonu:

Prensip: Genomik DNA'nın çoğaltılmak istenen yöresinin iki ucuna özgü, bu yöredeki DNA dizisine komplementer, bir çift sentetik primer kullanılarak, o yörenin enzimatik olarak çoğaltılması esasına dayanır. İlk aşamada, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısıda birbirinden ayrılması sağlanır. İkinci aşamada, sıcaklık düşürülerek, primerlerin kendilerine komplementer olan DNA dizilerine bağlanması sağlanır. Son aşamada ise taq polimeraz enzimi ortamda bulunan deoksi nükleotit trifosfatları (dNTP) kullanarak DNA zincirlerinin sentezini gerçekleştirir. Bu işlem 25-30 kez tekrarlandığında, istenilen yöre, yaklaşık bir milyon kez çoğaltılmış olur (Şekil 14). (70)

Ayırıcılar:

1. 10 x PCR tamponu (3):

| | |
|---|----------|
| Tris HCl pH 8.8 | 670 mM |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 166 mM |
| MgCl ₂ | 67 mM |
| β-Merkaptoetanol | 100 mM |
| Bovin serum albumin | 10 µg/ml |
| Steril redistile su içinde | 10 ml |

2. Primerler: Apo E geninin 4. eksonunun 227 baz çiftlik (bp) bölgesinin amplifikasyonunda kullanılan primerlerin baz dizisi.(100)

Primer 48 5' TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA3'

Primer 49 5' ACA GAA TTC GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A 3'

3. 2.5 mM dNTP karışımı:

| | |
|-------------|-------|
| 100 mM dATP | 25 µl |
| 100 mM dGTP | 25 µl |
| 100 mM dCTP | 25 µl |
| 100 mM dTTP | 25 µl |

900 µl steril redistile su eklenir.

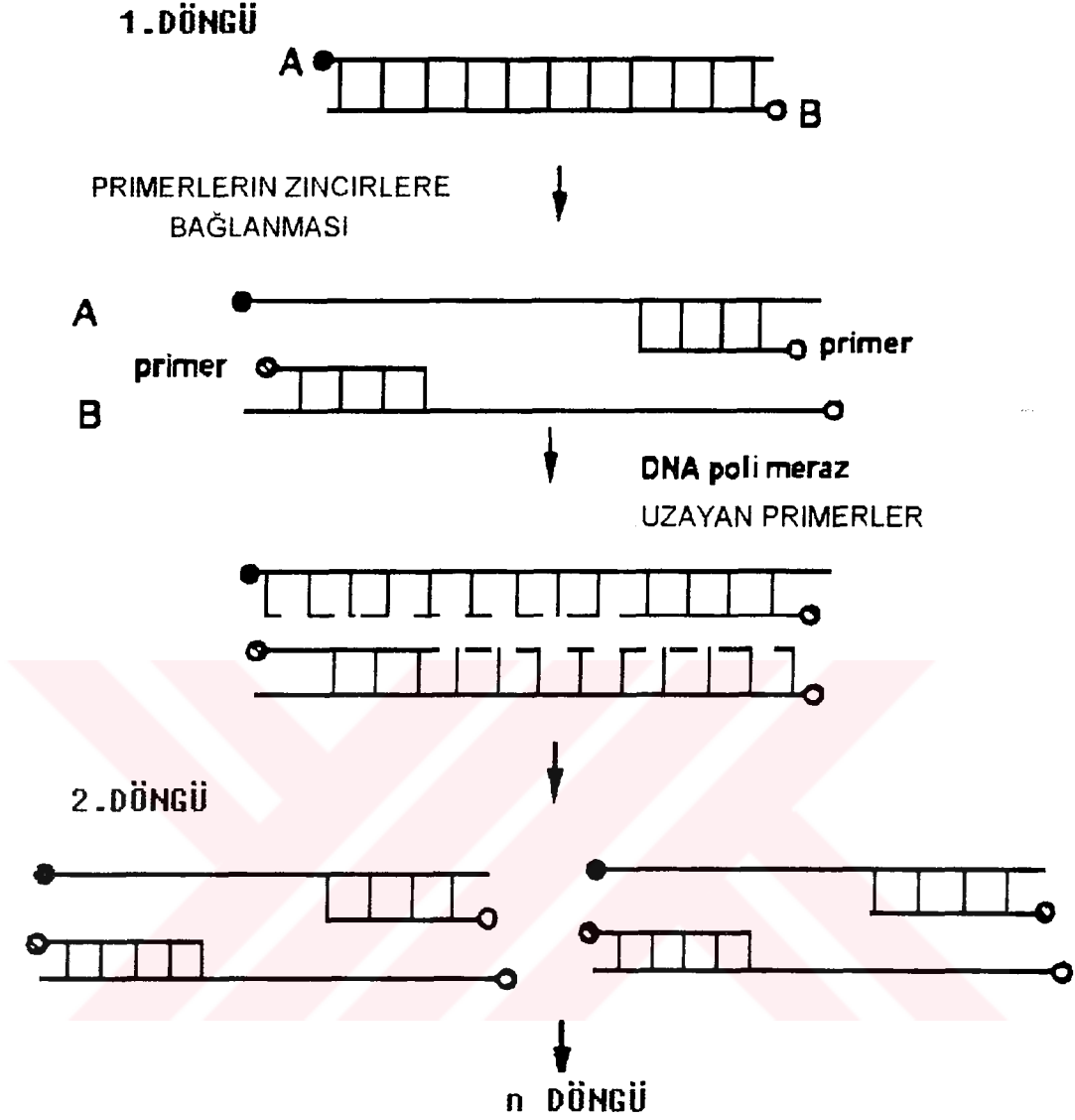
4. %50'lik dimetil sülfoksit (DMSO)

5. Taq polimeraz

3.10.1. Amplifikasyon Koşulları: Her örnek için tablo XIV'de verildiği şekilde PCR karışım havuzu hazırlanır. Karıştırılıp, anlık santrifüjden sonra, her bir örnek tüpüne bu havuzdan 19'ar µl pipetlenir. Daha sonra tüplere 0.4 µg konsantrasyonda DNA ve 0.3 µl (1.5 ünite) taq polimeraz eklenir. Her örnek tüpü 50 µl'ye redistile steril su ile tamamlanır. Karıştırılıp, anlık santrifüj edilir. Amplifikasyona başlamadan önce, tüp içeriğinin buharlaşmasını önlemek amacıyla, 1'er damla mineral oil damlatılır. PCR programı uyarınca amplifikasyon başlatılır. (17)

Tablo XIV. PCR karışım havuzunun hazırlanması

| Çözelti | Miktar | Konsantrasyon |
|------------------------|--------|---------------------|
| 10 x PCR tamponu | 5 µl | 1 x PCR tamponu |
| 2.5 mM dNTP karışımı | 2 µl | 0.1 mM her dNTP'den |
| 25 pmol / µl Primer 48 | 1 µl | 25 pmol / 50 µl |
| 25 pmol / µl Primer 49 | 1 µl | 25 pmol / 50 µl |
| %50 DMSO | 10 µl | %10 |



Şekil 14. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR). Amplifiye edilmek istenen hedef DNA bölgesi, A zinciri ve ona komplementer olan B zinciri şeklinde çift sarmallı DNA olarak gösterilmiştir. 1. döngüde, DNA denatüre edilir ve kısa oligonükleotit primerlerin yapışması sağlanır. Taq polimeraz, dNTP'ler varlığında, primerlerin uzamasını sağlar. Hedef DNA bölgesinin iki kopyası oluşur. 2.döngüde, 1. döngü sonucunda oluşan iki DNA sarmalı denatüre olur ve aynı işlemler tekrarlanır. Böylece hedef DNA'nın 4 kopyası oluşur. N döngü sonucunda 2^n kadar DNA oluşur.

3.10.2. PCR Programı: 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon yapılır. Bunu 40 döngü olacak şekilde,

| | |
|--------------------|---------------------|
| 94°C'de 0.5 dakika | denatürasyon |
| 65°C'de 0.5 dakika | yapışma (annealing) |
| 70°C'de 1.5 dakika | uzama (extension) |

aşamaları izler. 10 dakika 70°C'de son uzama aşamasıyla amplifikasyon tamamlanır. (100)

3.10.3. Amplifikasyon Kontrolü: Restriksiyon tipleme yöntemi için enzimle kesme aşamasından önce amplifikasyon kontrolünün yapılması gerekmektedir. Bu amaçla, daha sonra detaylı olarak bahsedilecek olan, yatay jel elektroforezi uygulanır. %1'lik agaroz jelde, 1 x tris borat EDTA (TBE) tamponda, 150 voltta 30 dakika yürütülen örnekler, etidiyum bromürle boyandıktan sonra ultraviyole (uv) lamba altında kontrol edilir.

3.11. Restriksiyon Tipleme Yöntemi İle Apo E Genotipinin Saptanması (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP):

Prensip: Restriksiyon enzimleri, kendileri için özgün baz dizilimlerini tanıyıp, bu yörelerden çift sarmallı DNA'ları keserek, farklı uzunlukta DNA parçacıklarının oluşumuna neden olurlar. Bir restriksiyon enzimi, aynı DNA dizisine sahip farklı örneklerde, aynı uzunlukta DNA parçacıklarının oluşumunu gerçekleştirir. Ancak, DNA dizisindeki bir mutasyon, restriksiyon enzimine özgü tanıma bölgesinde değişikliğe neden oluyorsa, bu durumda farklı uzunlukta DNA parçacıkları oluşacaktır. Apo E geninin, polimorfik yörelerini içeren 227 bp'lik dizisinin amplifikasyonla çoğaltılmasından sonra, Cfo I restriksiyon enzimiyle inkübasyonu, polimorfik yörelerdeki farklı baz dizilimi nedeniyle, farklı uzunluklarda DNA parçacıklarının oluşumuyla sonuçlanacaktır. (1, 2, 35, 85)

Ayıraçlar:

1. Cfo I restriksiyon enzimi

Özgün tanıma bölgesi;

↓

GCGC

CGCG

↑

2. 10 x tampon L

Yöntem: Amplifikasyon kontrolünden sonra, her örnek için tablo XV'de verildiği şekilde pipetleme yapılır.

Tablo XV. Cfo I restriksiyon enzimi ile kesim hazırlığı

| | |
|---------------------------|-----------------|
| Amplifikasyon ürünü | 20 µl |
| Cfo I restriksiyon enzimi | 1 µl (10 ünite) |
| 10 x tampon L | 2.5 µl |
| Steril redistile su | 1.5 µl |
| Toplam | 25 µl |

37°C'de bir gece inkübasyondan sonra, oluşan DNA parçacıklarının görüntülenmesi aşamasına geçilir. (2, 35)

3.12. Elektroforez:

Prensip: Elektriksel alanda, NuSieve agaroz-agaroz jel üzerine applike edilen DNA'ların anoda doğru göç etmesi esasına dayanır. Örneklerin yanında uygun marker kullanılması ile de, belirli uzaklıklara yürümüş olan DNA bantlarının moleküler ağırlığı saptanabilir.

Ayırıcılar:

1. %4'lük NuSieve agaroz-agaroz (2:1 oranında) jel:

NuSieve agaroz 1.3 g

Agaroz 0.7 g

50 ml 1xTBE tamponda çözülür.

2. 10xTBE tampon:

Tris baz 108 g

Borik asit 55 g

200 ml 0.1 M, pH 8.0 EDTA içinde çözüldükten sonra 1000 ml'ye saf su ile tamamlanır. Son pH yaklaşık 8.3'tür. Kullanılacağı zaman 1:10 sulandırılarak 1xTBE tampon hazırlanır.

3. Etidiyum bromür: 5 mg/ml olacak şekilde saf suda hazırlanır.

4. Yükleme (loading) tamponu:

| | |
|------------------|-------|
| Bromfenol mavisi | %0.25 |
| Sukroz | %40 |

olacak şekilde 1xTBE tamponda çözülüp, pH'sı 7.5'e ayarlanır.

Yöntem: %4'lük NuSieve agaroz-agaroz polimerizasyona uygun hale gelmesi için mikrodalga fırında ısıtılır. Homojen sıvı jel, daha önceden uygun tarak konarak hazırlanmış olan elektroforez kabına dökülür. Donuncaya kadar beklenir. Polimerize olmuş jel 1xTBE tampon içeren elektroforez tankına yerleştirilerek tarak çıkarılır. Parafilm üzerine her örnek için 2 µl yükleme tamponu pipetlenir. Cfo I restriksiyon enzimiyle kesilmiş her örnekten 20 µl, otomatik pipet yardımıyla, homojen hale gelinceye dek yükleme tamponuyla karıştırılır. Bu karışımlar kuyucuklara aplike edilir. Ayrıca uygun marker da yükleme tamponuyla karıştırılarak kuyucuklardan birine aplike edilir. Aplikasyon tamamlandığında elektroforez işlemi başlatılır. İki saat süreyle 100 V akım uygulanır. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel etidiyum bromür kabına konarak, 5 dakika boyada bırakılır. Daha sonra bir saat süreyle su içinde bekletilir ve jelin artık boyalardan temizlenmesi sağlanır. UV ışık altında kamera ile deney sonucu görüntülenir ve çekilen resimlerde apo E genotipleri belirlenir.

4. İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel açıdan değerlendirmeler 'one-way analysis of variance'a göre yapılmıştır.

BULGULAR

Çalışma süresince, toplam 75 kan örneği toplandı. Örneklerin 41 tanesi Adana ili Yemişli köyünden, 34'ü ise Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'na lipit parametrelerini öğrenmek amacıyla başvuran, sağlıklı görünen kişilerden temin edildi. Yemişli köyünün seçilmesinin nedeni, henüz yayınlanmamış olan tarama çalışmalarında, bu köyün insanların yüksek lipit konsantrasyonlarına sahip olmalarıdır. Olguların yaşları 20 ile 84 arasında değişmekteydi. Olgular 40 yaş ve altı ile 40 yaş üzeri olmak üzere iki gruba ayrıldı. Her dekadı kendi içinde değerlendirmememizin nedeni, olgu sayısının istatistiksel değerlendirme açısından yetersiz olmasıdır. Ayrıca kadın ve erkek olarak cinsiyetlerine göre de alt gruplara ayrıldı. Tablo XVI'da bu grupların istatistiksel değerleri verilmektedir.

Tablo XVI. Çalışılan kan örneklerinin cinsiyet ve yaşa göre dağılımı ile grupların yaş ortalamaları ve standart sapmaları

| | 40 Yaş ve Altı (Yaş $X \pm SD$) | 40 Yaş Üzeri (Yaş $X \pm SD$) | Toplam (Yaş $X \pm SD$) |
|---------------|--|--|------------------------------------|
| Kadın | 22 (31 \pm 5.9) | 27 (57 \pm 10.4) | 49 (45 \pm 15.8) |
| Erkek | 13 (32 \pm 4.9) | 13 (49 \pm 6.0) | 26 (41 \pm 15.8) |
| Toplam | 35 (31 \pm 5.6) | 40 (54 \pm 9.8) | 75 (44 \pm 14.2) |

Kanların laboratuvara ulaşmasından sonra lipoprotein elektroforezi, total kolesterol (TK), LDL kolesterol (LDL-K), HDL kolesterol (HDL-K) ve trigliserit (TG) değerleri saptandı. Tablo XVII'de lipoprotein elektroforez sonuçlarının yaş ve

cinsiyete göre dağılımı verilmektedir. Tablo XVIII'de TK, LDL-K, HDL-K ve TG değerlerinin istatistiksel verileri verilmektedir. Tüm örneklerin toplanmasından sonra apo A I, apo B ve Lp (a) parametreleri toplu olarak çalışıldı. Bu değerlerin istatistiksel verileri ise tablo XIX'da verilmektedir. Şekil 15'de total, LDL ve HDL kolesterol ile apo A I'in, çalışılan tüm olguları kapsayacak biçimde yapılmış olan populasyon dağılımı verilmektedir. Her dört parametre de gausiyan dağılımına uygunluk göstermektedir. Diğer taraftan şekil 16'da gözlenen trigliserit, apo B ve Lp (a) parametreleri gausiyan dağılım göstermemektedir.

Tablo XVII. Tüm olguların yaş ve cinsiyete göre lipoprotein elektroforez sonuçları

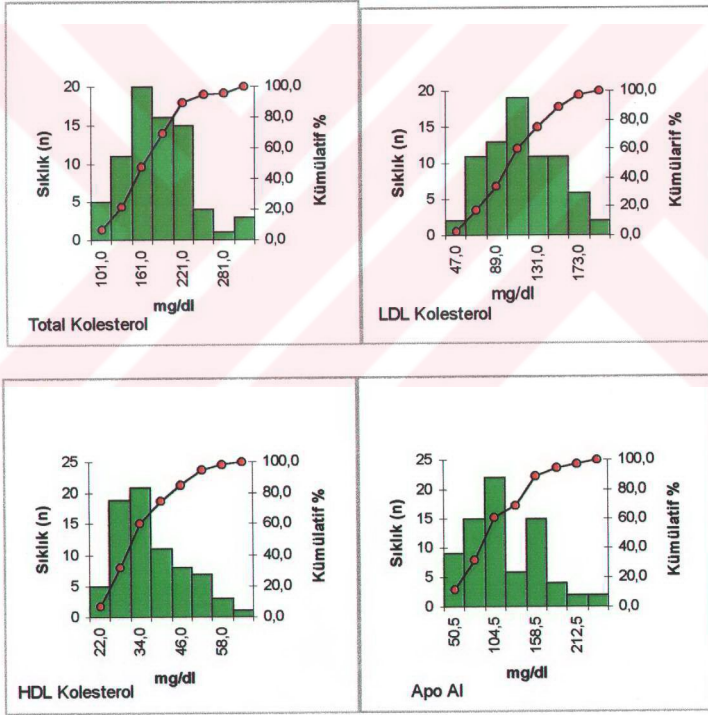
| | β X \pm SD | pre β X \pm SD | α X \pm SD |
|---------------|--------------------|------------------------|---------------------|
| Kadın | 54 \pm 8.5 | 18 \pm 12.4 | 27 \pm 10.0 |
| Erkek | 58 \pm 11.1 | 22 \pm 12.5 | 20 \pm 6.6 |
| Toplam | 55 \pm 9.6 | 20 \pm 12.4 | 25 \pm 9.6 |

Tablo XVIII. Çalışılan örneklerin TK, LDL-K, HDL-K ve TG ortalamaları, standart sapmaları ve minimum - maksimum değerleri

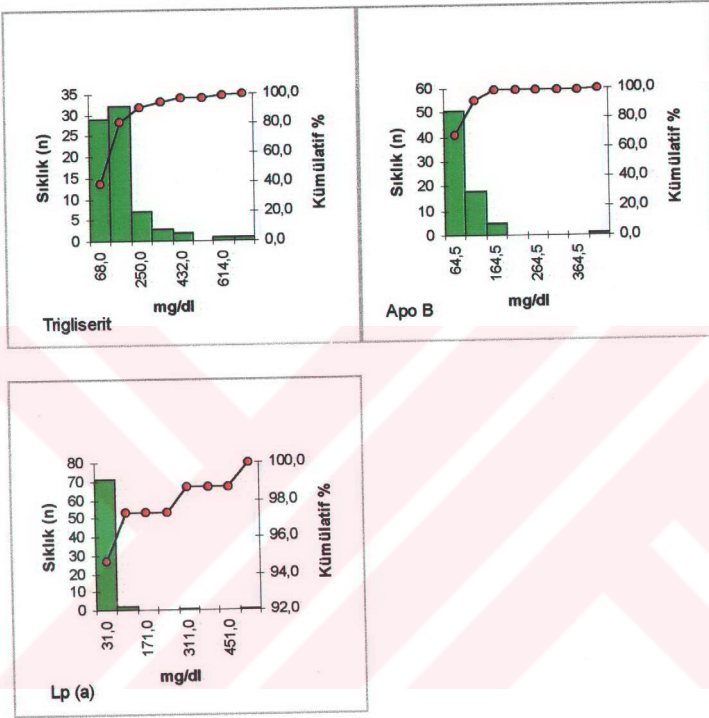
| | Total-K \pm SD (min - max) | LDL-K \pm SD (min - max) | HDL-K \pm SD (min - max) | TG \pm SD (min - max) |
|---------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Kadın | 187 \pm 43.3 (87 - 312) | 117 \pm 33.5 (37 - 188) | 40 \pm 9.6 (20 - 65) | 147 \pm 101.5 (32 - 651) |
| Erkek | 176 \pm 54.5 (113 - 324) | 109 \pm 37.3 (67 - 203) | 30 \pm 6.3 (21 - 51) | 176 \pm 159.9 (25 - 747) |
| Toplam | 183 \pm 47.4 (87 - 324) | 114 \pm 34.8 (37 - 203) | 37 \pm 10 (20 - 65) | 157 \pm 124.6 (25 - 747) |

Tablo XIX: Çalışılan örneklerin Lp (a), apo A I ve apo B ortalamaları, standart sapmaları ve minimum - maksimum değerleri

| | Lp (a) ± SD (min - max) | Apo A I ± SD (min - max) | Apo B ±SD (min - max) |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Kadın | 18 ± 47.8 (1 - 316) | 130 ± 48.4 (49 - 251) | 78 ± 15.9 (51 - 112) |
| Erkek | 33 ± 106.2 (1 - 550) | 93 ± 32.3 (38 - 188) | 101 ± 70.9 (62 - 427) |
| Toplam | 23 ± 73.1 (1 - 550) | 117 ± 46.7 (38 - 251) | 91 ± 45.9 (51 - 427) |



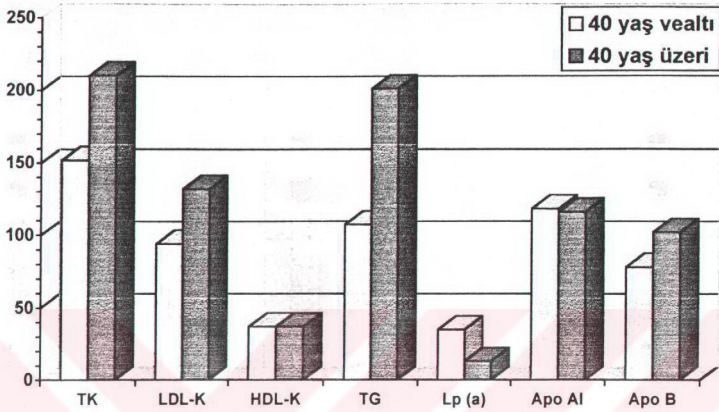
Şekil 15. Total, LDL ve HDL kolesterol ile apo A I'in gausiyan dağılımları



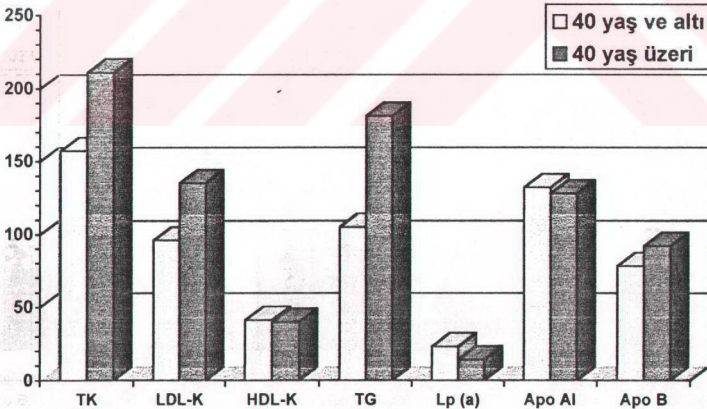
Şekil 16. Trigliserit, apo B ve Lp (a)'nın gausiyen olmayan dağılımları.

Tüm olgularda yaş gruplarına göre, lipit parametrelerinin ortalama değerlerinin dağılımı şekil 17'de verilmektedir. İki yaş grubu istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserit $p < 0.01$ 'e göre, apo B $p < 0.05$ 'e göre anlamlı farklılık göstermektedir. Şekil 18 ve 19'da ise farklı cinsiyetlerde yaş gruplarına göre lipit parametrelerinin dağılımı verilmektedir. Kadınlarda total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserit istatistiksel açıdan anlamlı ($p < 0.01$) farklılık gösterirken, erkeklerde total ve LDL kolesterol $p < 0.01$ 'e göre,

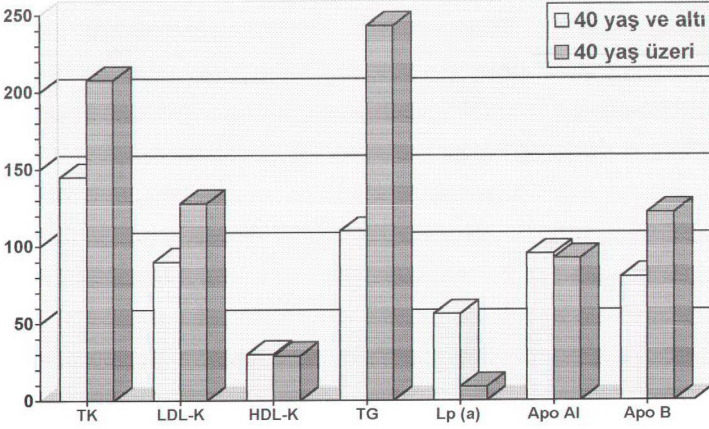
trigliserit $p < 0.05$ 'e göre anlamlı farklılık göstermektedir. Her iki cinsiyette yaş gruplarına göre apo B istatistiksel açıdan anlamlı farklılık göstermemektedir.



Şekil 17. Tüm olgularda yaş gruplarına göre lipit parametrelerinin dağılımı

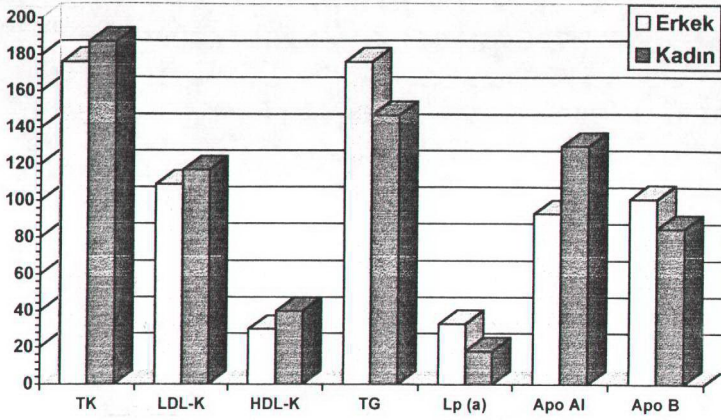


Şekil 18. Kadın olgularda yaş gruplarına göre lipit parametrelerinin dağılımı

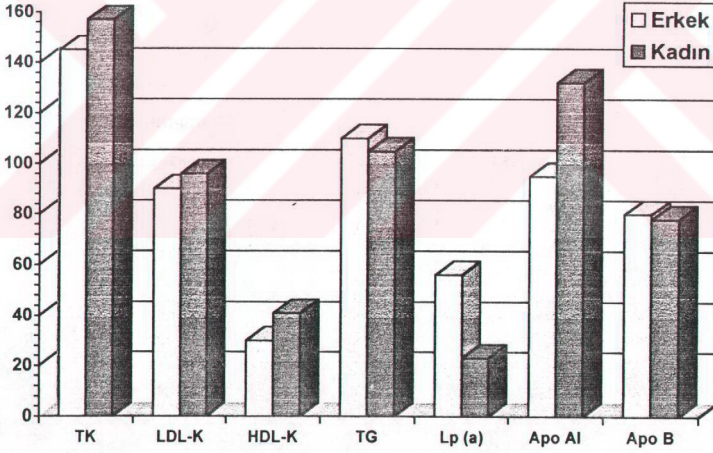


Şekil 19. Erkek olgularda yaş gruplarına göre lipit parametrelerinin dağılımı

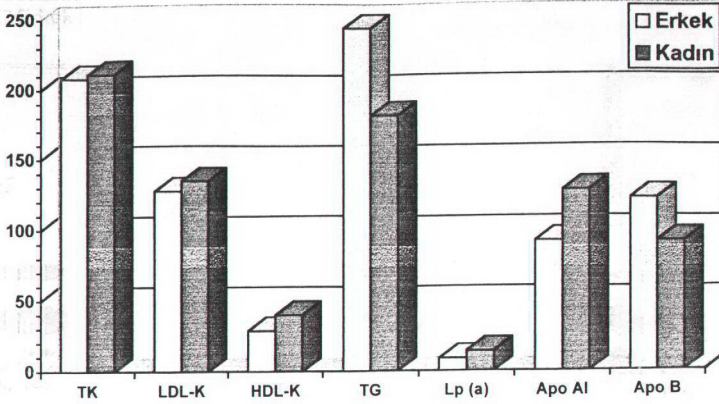
Şekil 20'de tüm olguların cinsiyete göre lipit parametrelerinin dağılımı verilmektedir. İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde HDL kolesterol ve apo AI $p < 0.01$ 'e göre anlamlı farklılık göstermektedir. Şekil 21 ve 22'de ise cinsiyete göre lipit parametrelerinin dağılımı, yaş gruplarına ayrılarak verilmiştir. 40 yaş ve altındaki olgularla 40 yaş üzerindeki olguların gruplarında HDL kolesterol $p < 0.01$ 'e ve apo AI $p < 0.05$ 'e göre anlamlı farklılığı yansıtmaktadır



Şekil 20. Tüm olgularda cinsiyete göre lipit parametrelerinin dağılımı



Şekil 21. 40 yaş ve altındaki olgularda lipit parametrelerinin cinsiyete göre dağılımı



Şekil 22. 40 yaş üzerindeki olgularda lipit parametrelerinin cinsiyete göre dağılımı

Hastaneye başvuran olgularla Yemişli köyünün olgularının lipit parametreleri karşılaştırıldığında total, LDL ve HDL kolesterol ile apo AI istatistiksel açıdan ($p < 0.05$) anlamlı farklılık göstermektedir.

Tablo XX: Farklı olgu kaynaklarının lipit parametrelerinin karşılaştırması

| Olguların Kaynağı | TK (\pm SD) | LDL-K (\pm SD) | HDL-K (\pm SD) | TG (\pm SD) | Apo AI (\pm SD) | Apo B (\pm SD) | Lp (a) (\pm SD) |
|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------|-------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|
| Yemişli Köyü | 195 (41.7) | 124 (32.2) | 39 (9.7) | 150 (109.4) | 129 (52.1) | 89 (23.0) | 20 (52.0) |
| Hastane | 169 (50.4) | 103 (36.0) | 33 (9.5) | 166 (141.9) | 102 (34.5) | 93 (63.5) | 27 (93.1) |
| p | 0.016 | 0.011 | 0.010 | 0.579 | 0.013 | 0.645 | 0.672 |

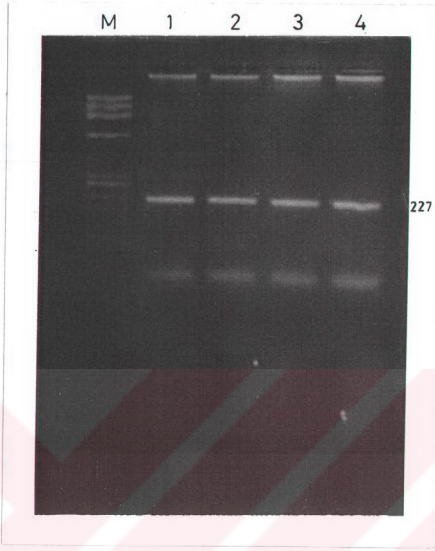
Örneklerin DNA'ları fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile izole edildikten sonra, 260 nm dalga boyunda DNA ve 280 nm dalga boyunda protein absorbanları ölçülerek, DNA yoğunluğu ve verimi hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular tablo XXI'de verilmektedir.

Tablo XXI. DNA izolasyonu sonucu elde edilen veriler

| (No) Olgular | O.D. ₂₆₀ | O.D. ₂₈₀ | O.D. ₂₆₀ / O.D. ₂₈₀ | Konsantrasyon µg/ml | |
|--------------|---------------------|---------------------|---|------------------------|-----|
| 1 | E.A. | 0.100 | 0.055 | 1.82 | 120 |
| 2 | F.K. | 0.106 | 0.090 | 1.18 | 127 |
| 3 | Y.K. | 0.220 | 0.122 | 1.80 | 264 |
| 4 | Ç.K. | 0.085 | 0.065 | 1.31 | 102 |
| 5 | Ş.Y. | 0.140 | 0.100 | 1.40 | 168 |
| 6 | G.Ö. | 0.276 | 0.200 | 1.38 | 331 |
| 7 | A.A. | 0.490 | 0.280 | 1.75 | 588 |
| 8 | C.G. | 0.310 | 0.220 | 1.41 | 372 |
| 9 | N.A. | 0.360 | 0.200 | 1.80 | 432 |
| 10 | M.A. | 0.404 | 0.235 | 1.72 | 485 |
| 11 | M.E. | 0.332 | 0.235 | 1.41 | 398 |
| 12 | A.K. | 0.370 | 0.230 | 1.61 | 444 |
| 13 | M.K. | 0.283 | 0.170 | 1.66 | 340 |
| 14 | N.K. | 0.462 | 0.280 | 1.65 | 554 |
| 15 | M.K. | 0.290 | 0.200 | 1.45 | 348 |
| 16 | F.Ü. | 0.112 | 0.082 | 1.37 | 134 |
| 17 | B.Ü. | 0.109 | 0.086 | 1.27 | 131 |
| 18 | D.A. | 0.101 | 0.074 | 1.37 | 121 |
| 19 | A.A. | 0.145 | 0.118 | 1.23 | 174 |
| 20 | G.E. | 0.155 | 0.110 | 1.41 | 186 |
| 21 | N.K. | 0.212 | 0.132 | 1.61 | 254 |
| 22 | B.T. | 0.272 | 0.175 | 1.55 | 326 |
| 23 | A.B. | 0.166 | 0.094 | 1.76 | 199 |
| 24 | F.E. | 0.245 | 0.136 | 1.80 | 294 |
| 25 | H.Ö. | 0.160 | 0.082 | 1.95 | 192 |
| 26 | E.Ö. | 0.202 | 0.112 | 1.80 | 242 |
| 27 | A.Ş. | 0.124 | 0.080 | 1.55 | 149 |
| 28 | M.K. | 0.256 | 0.145 | 1.77 | 307 |
| 29 | A.M. | 0.270 | 0.149 | 1.81 | 324 |
| 30 | E.K. | 0.334 | 0.190 | 1.76 | 401 |
| 31 | A.K. | 0.148 | 0.085 | 1.74 | 178 |
| 32 | S.B. | 0.160 | 0.065 | 2.46 | 192 |
| 33 | M.B. | 0.140 | 0.080 | 1.75 | 168 |
| 34 | N.K. | 0.255 | 0.162 | 1.57 | 306 |
| 35 | N.K. | 0.238 | 0.153 | 1.56 | 286 |
| 36 | M.K. | 0.245 | 0.166 | 1.48 | 294 |
| 37 | Y.A. | 0.110 | 0.090 | 1.22 | 132 |
| 38 | N.U. | 0.133 | 0.110 | 1.21 | 160 |
| 39 | N.A. | 0.130 | 0.107 | 1.22 | 156 |
| 40 | İ.A. | 0.141 | 0.114 | 1.24 | 169 |
| 41 | G.A. | 0.133 | 0.108 | 1.23 | 160 |
| 42 | G.T. | 0.060 | 0.045 | 1.33 | 71 |
| 43 | H.H. | 0.136 | 0.104 | 1.31 | 163 |
| 44 | İ.K. | 0.097 | 0.061 | 1.59 | 116 |
| 45 | B.E. | 0.137 | 0.107 | 1.28 | 164 |
| 46 | N.E. | 0.321 | 0.206 | 1.56 | 385 |
| 47 | K.E. | 0.180 | 0.106 | 1.70 | 216 |
| 48 | N.B. | 0.222 | 0.131 | 1.70 | 266 |
| 49 | Y.B. | 0.204 | 0.150 | 1.36 | 245 |
| 50 | N.B. | 0.109 | 0.070 | 1.49 | 131 |

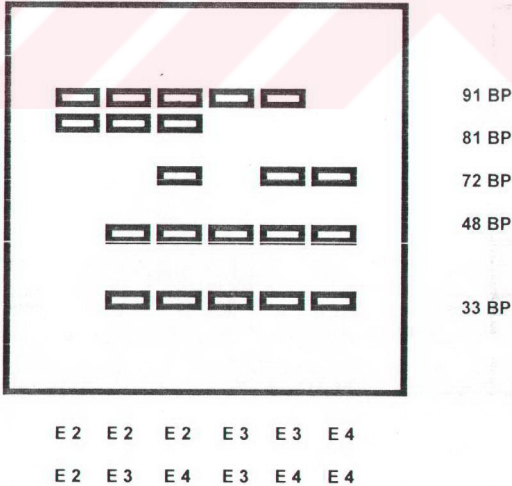
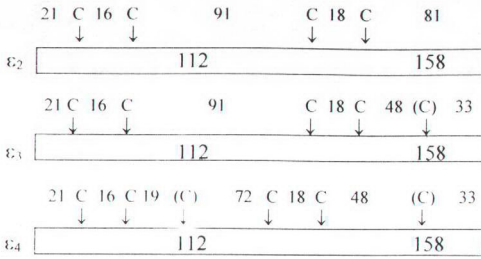
| | | | | | |
|----|--------|-------|-------|------|------|
| 51 | G.U. | 0.246 | 0.180 | 1.37 | 295 |
| 52 | N.U. | 0.116 | 0.080 | 1.45 | 139 |
| 53 | H.A. | 0.273 | 0.200 | 1.37 | 328 |
| 54 | E.A. | 0.263 | 0.180 | 1.46 | 316 |
| 55 | A.K. | 0.088 | 0.060 | 1.47 | 104 |
| 56 | E.Ö. | 0.100 | 0.080 | 1.25 | 120 |
| 57 | S.A. | 0.157 | 0.110 | 1.43 | 188 |
| 58 | O.I. | 0.092 | 0.060 | 1.53 | 110 |
| 59 | M.A.A. | 0.131 | 0.090 | 1.46 | 157 |
| 60 | A.K. | 0.074 | 0.050 | 1.48 | 89 |
| 61 | H.K. | 0.109 | 0.056 | 1.82 | 131 |
| 62 | F.K. | 0.080 | 0.050 | 1.60 | 96 |
| 63 | D.T. | 0.254 | 0.200 | 1.27 | 305 |
| 64 | A.S. | 0.117 | 0.090 | 1.30 | 140 |
| 65 | K.B. | 0.082 | 0.050 | 1.64 | 98 |
| 66 | H.B. | 0.085 | 0.055 | 1.55 | 102 |
| 67 | P.Ü. | 0.175 | 0.109 | 1.61 | 210 |
| 68 | Ş.K. | 0.257 | 0.207 | 1.24 | 308 |
| 69 | I.I. | 0.436 | 0.200 | 2.18 | 523 |
| 70 | T.İ. | 0.949 | 0.683 | 1.39 | 1139 |
| 71 | H.G. | 0.135 | 0.072 | 1.86 | 162 |
| 72 | G.Y. | 0.075 | 0.060 | 1.25 | 90 |
| 73 | H.A. | 0.465 | 0.340 | 1.37 | 558 |
| 74 | R.K. | 0.665 | 0.375 | 1.77 | 788 |
| 75 | C.I. | 0.280 | 0.152 | 1.84 | 336 |

PCR ile DNA'ların amplifikasyonundan sonra, restriksiyon enzimiyle kesimden önce, her örnek için amplifikasyon kontrolü yapıldı (Şekil 23). Amplifiye edilen 227 bp'lik yöre 112. ve 158. polimorfik kodonları içermektedir. 227 bp'lik amplifiye DNA'ları göstermek amacıyla ϕ X174DNA/Hae III markerı kullanılmıştır.

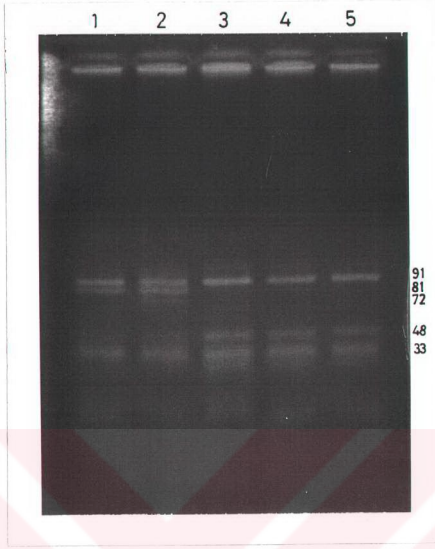


Şekil 23. Amplifikasyon kontrolü. Marker olarak ϕ X174DNA/Hae III kullanılmıştır.

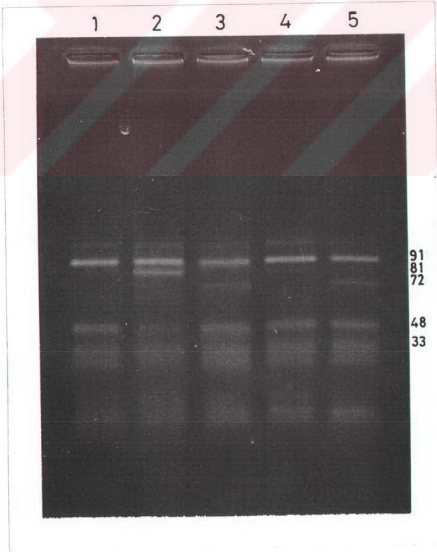
Cfo I restriksiyon enzimiyle kesim sonucunda, çalışılan 75 olguda E 2/3, 2/4, 3/3, 3/4 ve 4/4 olmak üzere, sık görülen 5 değişik apo E genotipi saptandı. Cfo I restriksiyon enzimiyle apo E geninin ϵ 2, ϵ 3 ve ϵ 4 allellerinin restriksiyon haritası şekil 24'de verilmektedir. Kodon 112 ve 158, 3745. ve 3883.'deki polimorfik nükleotitleri içermektedir. Şekil 25'de Cfo I restriksiyon enzimiyle 227 bp'lik amplifiye DNA'nın inkübasyonu sonucu, değişik apo E genotipine göre oluşan bantlar şematik olarak gösterilmektedir. E 2/2 genotipinde 91 ve 81; E 2/3'de 91, 81, 48 ve 33; E 2/4'de 91, 81, 72, 48 ve 33; E 3/3'de 91, 48 ve 33; E 3/4'de 91, 72, 48 ve 33; E 4/4'de ise 72, 48 ve 33 bp'lik DNA fragmanları oluşmaktadır. Şekil 26, 27 ve 28'de ise değişik apo E genotiplerine örnek verilmektedir. Çalışılan olgular arasında E 2/2 genotipine rastlanmadı. (100)



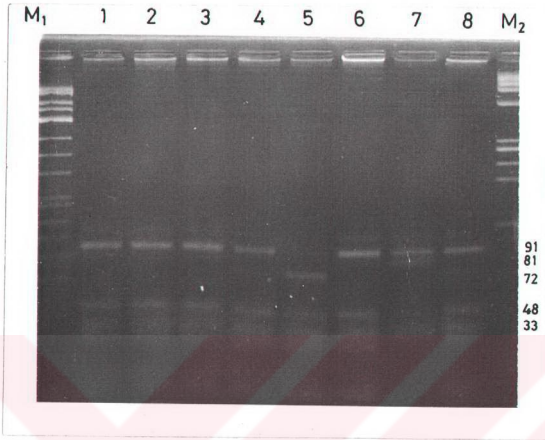
Şekil 25. Şematik olarak apo E genotiplerinin gösterimi



Şekil 26. 1 E2/3, 2 E2/4 ve diğerleri E3/3 genotipleri



Şekil 27. 1 ve 4 E3/3, 2 E2/3, 3 ve 5 E3/4 genotipleri



Şekil 28. M₁ ve M₂ marker, 1, 2, 3 ve 6 E_{3/3}, 4 ve 8 E_{3/4}, 5 E_{4/4} ve 7 E_{2/3} genotipleri

Tablo XXII'de çalışılan tüm olguların apo E genotipleri toplu olarak verilmektedir. Olguların apo E genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı tablo XXIII'de verilmektedir. E 2/3 genotipi erkeklerde %3.85, kadınlarda %14.3; E 2/4 erkeklerde %3.85, kadınlarda %2; E 3/3 erkeklerde %76.9, kadınlarda %63.3; E 3/4 erkeklerde %15.4, kadınlarda %18.4 ve E 4/4 erkeklerde %0, kadınlarda %2 sıklıkta görülmektedir.

Tablo XXII. Çalışılan tüm olguların apo E genotipleri

| No | İsim | Apo E Genotipi | No | İsim | Apo E Genotipi |
|-----|------|----------------|-----|--------|----------------|
| 1. | E.A. | 3/3 | 39. | N.A. | 3/3 |
| 2. | F.K. | 3/4 | 40. | İ.A. | 3/3 |
| 3. | Y.K. | 3/3 | 41. | G.A. | 2/3 |
| 4. | Ç.K. | 4/4 | 42. | G.T. | 3/3 |
| 5. | Ş.Y. | 3/3 | 43. | H.H. | 3/3 |
| 6. | G.Ö. | 2/3 | 44. | İ.K. | 3/4 |
| 7. | A.A. | 3/3 | 45. | B.E. | 3/4 |
| 8. | C.G. | 3/4 | 46. | N.E. | 3/3 |
| 9. | N.A. | 3/3 | 47. | K.E. | 3/3 |
| 10. | M.A. | 3/3 | 48. | N.B. | 2/4 |
| 11. | M.E. | 3/3 | 49. | Y.B. | 2/3 |
| 12. | A.K. | 3/3 | 50. | N.B. | 3/3 |
| 13. | M.K. | 3/3 | 51. | G.U. | 3/3 |
| 14. | N.K. | 3/4 | 52. | N.U. | 2/3 |
| 15. | M.K. | 3/3 | 53. | H.A. | 3/3 |
| 16. | F.Ü. | 3/3 | 54. | E.A. | 2/3 |
| 17. | B.Ü. | 3/4 | 55. | A.K. | 2/4 |
| 18. | D.A. | 3/3 | 56. | E.Ö. | 3/3 |
| 19. | A.A. | 3/3 | 57. | S.A. | 3/3 |
| 20. | G.E. | 3/4 | 58. | O.İ. | 3/3 |
| 21. | N.K. | 3/3 | 59. | M.A.A. | 3/3 |
| 22. | B.T. | 3/3 | 60. | A.K. | 3/4 |
| 23. | A.B. | 3/4 | 61. | H.K. | 3/3 |
| 24. | F.E. | 2/3 | 62. | F.K. | 3/4 |
| 25. | H.Ö. | 3/3 | 63. | D.T. | 3/3 |
| 26. | E.Ö. | 3/4 | 64. | A.S. | 3/4 |
| 27. | A.Ş. | 3/3 | 65. | K.B. | 3/3 |
| 28. | M.K. | 3/3 | 66. | H.B. | 3/4 |
| 29. | A.M. | 3/3 | 67. | P.Ü. | 3/3 |
| 30. | E.K. | 2/3 | 68. | Ş.K. | 3/3 |
| 31. | A.K. | 3/3 | 69. | İ.İ. | 3/3 |
| 32. | S.B. | 3/3 | 70. | T.İ. | 3/3 |
| 33. | M.B. | 2/3 | 71. | H.G. | 3/3 |
| 34. | N.K. | 3/3 | 72. | G.Y. | 3/3 |
| 35. | N.K. | 3/3 | 73. | H.A. | 3/3 |
| 36. | M.K. | 3/3 | 74. | R.K. | 3/3 |
| 37. | Y.A. | 3/3 | 75. | C.İ. | 3/3 |
| 38. | N.U. | 3/3 | | | |

Tablo XXIII. Çalışılan olgularda apo E genotiplerinin cinsiyete göre dağılımı ve % sıklığı

| | E 2/3 (%) | E 2/4 (%) | E 3/3 (%) | E 3/4 (%) | E 4/4 (%) | TOPLAM |
|---------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------|
| Kadın | 7 (14.3) | 1 (2.0) | 31 (63.3) | 9 (18.4) | 1 (2.0) | 49 |
| Erkek | 1 (3.9) | 1 (3.9) | 20 (76.8) | 4 (15.4) | 0 (0) | 26 |
| TOPLAM | 8 (10.7) | 2 (2.7) | 51 (68.0) | 13 (17.3) | 1 (1.3) | 75 |

Apo E 2/4 ve 4/4 grupları sayı yetersizliği nedeniyle istatistiksel analiz dışı bırakılıp diğer üç grubun (apo E 2/3, 3/3, 3/4) total ve LDL kolesterol ile trigliserit, lipoprotein (a), apo AI ve apo B parametrelerinin değerlendirilmesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık olmadığı gözlenmiştir. Diğer taraftan HDL kolesterol düzeyleri gruplar arasında farklılık taşımaktadır ($p < 0.05$). Tablo XXIV ve XXV'de apo E genotiplerine göre yaş, total, LDL ve HDL kolesterol ile trigliserit, lipoprotein (a), apo AI ve B parametrelerinin grup ortalamaları ve standart sapmaları verilmektedir. Tablo XXVI ve XXVII'de ise sırasıyla apo E genotiplerinin % ve allellerinin rölatif sıklığı verilmektedir.

Tablo XXIV. Apo E genotipine göre yaş ve lipit parametrelerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları

| Apo E genotipi (olgu sayısı) | Yaş ± SD | TK ± SD | LDL-K ± SD | HDL ± SD | TG ± SD |
|---------------------------------|-----------|------------|------------|-----------|-------------|
| E 2/3 (8) | 40 ± 12.5 | 171 ± 29.4 | 102 ± 23.6 | 44 ± 13.3 | 132 ± 95.4 |
| E 2/4 (2) | 28 ± 14.9 | 169 ± 5.7 | 74 ± 5.7 | 37 ± 9.2 | 288 ± 174.0 |
| E 3/3 (51) | 46 ± 14.1 | 188 ± 53.1 | 119 ± 37.0 | 34 ± 9.0 | 168 ± 136.5 |
| E 3/4 (13) | 37 ± 14.1 | 173 ± 35.3 | 109 ± 31.0 | 40 ± 9.7 | 112 ± 62.6 |
| E 4/4 (1) | 32 | 182 | 118 | 45 | 94 |

Tablo XXV. Apo E genotiplerine göre yaş, Lp (a) ve apolipoproteinlerin ortalama değerleri ile standart sapmaları

| Apo E genotipi | Yaş ± SD | Lp (a) ± SD | Apo AI ± SD | Apo B ± SD |
|----------------|-----------|-------------|-------------|------------|
| E 2/3 | 40 ± 12.5 | 6 ± 4.3 | 146 ± 69.4 | 69 ± 14.2 |
| E 2/4 | 28 ± 14.9 | 7 ± 4.2 | 130 ± 54.4 | 78 ± 8.5 |
| E 3/3 | 46 ± 14.1 | 24 ± 77.7 | 110 ± 44.0 | 95 ± 53.7 |
| E 3/4 | 37 ± 14.1 | 13 ± 15.6 | 122 ± 36.8 | 82 ± 23.2 |
| E 4/4 | 32 | 316 | 159 | 93 |

Tablo XXVI. Olgu kaynağına göre ve toplam olarak apo E genotiplerinin % sıklığı

| Olguların Kaynağı | E 2/3 | E 2/4 | E 3/3 | E 3/4 | E 4/4 |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Yemişli Köyü | %12.2 | %2.4 | %61 | %22 | %2.4 |
| Hastane | %8.8 | %2.9 | %76.5 | %11.8 | %0 |
| TOPLAM | %10.7 | %2.7 | %68 | %17.3 | %1.3 |

Tablo XXVII. Apo E allellerinin olguların kaynağına göre ve toplam olarak rölatif sıklıkları

| Olguların Kaynağı | $\epsilon 2$ | $\epsilon 3$ | $\epsilon 4$ |
|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| Yemişli Köyü | 0.073 | 0.781 | 0.146 |
| Hastane | 0.059 | 0.868 | 0.073 |
| TOPLAM | 0.067 | 0.820 | 0.113 |

Total kolesterol için 200 mg/dl, LDL kolesterol için 150 mg/dl, Lp (a) için 30 mg/dl ve apo B için 96 mg/dl üzerindeki değerler ateroskleroz açısından risk faktörleri olarak bilinmektedir. Aynı şekilde HDL kolesterol için 35 mg/dl ve apo A1 için 112 mg/dl altındaki değerler de risk faktörleri arasında yer almaktadır. Apo E allellerinin yukarıda bahsedilen lipit parametrelerine göre, ateroskleroz açısından risk taşımayan ve taşıyan olgulardaki % dağılımı tablo XXVIII'de verilmektedir. (79)

Tablo XXVIII. Lipit parametrelerine göre ateroskleroz riski taşımayan ve taşıyan olgulardaki apo E allellerinin % dağılımı

| | Risk (-) | | | Risk (+) | | |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | $\epsilon 2$ (%) | $\epsilon 3$ (%) | $\epsilon 4$ (%) | $\epsilon 2$ (%) | $\epsilon 3$ (%) | $\epsilon 4$ (%) |
| TK | 8.8 | 78.4 | 12.8 | 2.1 | 89.6 | 8.3 |
| LDL-K | 8.6 | 79.3 | 12.1 | 0 | 96.9 | 3.1 |
| HDL-K | 10.5 | 75.0 | 16.5 | 2.7 | 89.2 | 8.1 |
| Apo A1 | 8.3 | 77.8 | 13.9 | 5.1 | 85.9 | 9.0 |
| Apo B | 8.0 | 79.5 | 12.5 | 2.6 | 89.5 | 7.9 |
| Lp (a) | 7.5 | 82.8 | 9.7 | 0 | 75 | 25 |

TARTIŞMA

Yetişkin dönemde görülen birçok hastalık, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi sonucunda ortaya çıkan, multifaktöryel hastalıklardır. Ateroskleroz ve Alzheimer hastalığı, genetik olarak apo E polimorfizminden etkilendiği düşünülen hastalıklardır. Apo E polimorfizmi ve ateroskleroz arasındaki ilişki, ilk olarak Utermann ve arkadaşlarının apo E 2/2 fenotipi taşıyan tip III hiperlipoproteinemili hastalarda erken koroner kalp hastalığını gözlemeleri ile ortaya konmuştur. Apo E polimorfizmi ile ilgili çalışmaların artmasıyla da, apo E'nin aterosklerozun başlama ve ilerlemesinde bireyler arası değişkenliğin majör belirleyicilerinden olduğu kanısındaki görüşler giderek güçlenmiştir. 1993 yılında apo E'nin Alzheimer hastalığı ile olan ilişkisinin ortaya atılmasıyla da, bu konudaki çalışmalar daha da yoğunluk kazanmıştır. (4, 96)

Apo E geninin çoklu allellerden oluşması, sık görülen üç apo E izoformunun ortaya çıkışından sorumludur. Apo E 3 izoformu, yapılan değişik populasyon taramalarında en sık görülen olduğundan normal tip, E 2 ve 4 ise varyant tipler olarak değerlendirilmektedir. Yapılan birçok populasyon taramasında izoform sıklığıyla birlikte, sık görülen apo E genotiplerinin lipit parametreleri ile olan ilişkisi de araştırılmıştır. (15, 17, 58, 59)

Bizim çalışmamızda lipoprotein elektroforez sonuçlarına bakıldığında (Tablo XVII), β kadınlarda %54, erkeklerde % 58 ve tüm grupta %55; pre β kadınlarda %18, erkeklerde %22 ve tüm grupta %20; α ise kadınlarda %27, erkeklerde %20 ve tüm grupta % 25'lik bir ortalama değer göstermektedir. Normalde %5 ile 10 arasında olması beklenen pre β fraksiyonu, özellikle erkeklerde olmak üzere, tüm grupta oldukça yüksek bir yüzdeye sahiptir. Bu sonuç VLDL kolesterol ve paralelinde trigliserit yüksekliğini yansıtmaktadır. Ayrıca, normalde %25 ile 30 arasında olması beklenen α fraksiyonunun, erkeklerde %20'lik bir değer göstermesi de HDL kolesterol düşüklüğünü yansıtmaktadır.

Lipit parametrelerini gözden geçirdiğimizde (Tablo XVIII ve XIX) özellikle dikkat çekici olan, erkeklerdeki HDL kolesterol düşüklüğüdür. Normalde 35 mg/dl'nin üzerinde olması beklenen değer, ortalama 30 mg/dl olarak saptanmıştır.

21 mg/dl gibi oldukça düşük HDL kolesterol düzeylerinin bulunması ve HDL kolesterolün ateroskleroz gelişimiyle olan negatif korelasyonu göz önüne alınırsa, bu konuyla ilgili çevresel ve genetik faktörleri kapsayan çalışmaların yoğunlaşması gerekliliği ortaya çıkacaktır. Bir diğer dikkat çekici nokta trigliserit düzeylerinin yüksek olmasıdır. Kadınlarda 30 ile 135 mg/dl arasında beklenen değer ortalama 147, erkeklerde 40 ile 160 mg/dl arasında beklenen değer ise ortalama 176 mg/dl olarak saptanmıştır. Bunun temelinde bölgedeki beslenme alışkanlığının önem taşıdığı düşünülmektedir. (79)

Erkeklerde Lp (a), apo B ve apo AI konsantrasyonları da normalden sapma göstermektedir. Bunların ortalama değerleri sırasıyla 33, 101 ve 93 mg/dl olarak saptanmıştır. Aterosklerozla, 30 mg/dl üzerindeki Lp (a) ile 96 mg/dl üzerindeki apo B düzeylerinin pozitif korelasyonu ve 112 mg/dl altındaki apo AI düzeyinin negatif korelasyonu, bu popülasyonda, ateroskleroz açısından risk faktörlerini ortaya koymaktadır. Ayrıca 40 yaş üzerindeki grubun Lp (a) düzeyinin düşük olması, yüksek Lp (a) konsantrasyonuna sahip bireylerin erken yaşta koroner arter hastalığından kaybedilmiş olabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır (Şekil 19). (67, 72, 81)

Şekil 20'de tüm olgularda cinsiyete göre lipit parametrelerinin dağılımı verilmektedir. HDL kolesterol ve paralelinde apo AI'nin cinsiyete göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.01$). Erkeklerde belirgin HDL kolesterol ve apo AI düşüklüğü gözlenmektedir. Bu farklılık yaş gruplarının cinsiyete göre kıyaslanmasında da (HDL-K için $p < 0.01$, apo AI için $p < 0.05$) aynı şekilde ortaya çıkmaktadır (Şekil 21 ve 22). Kadınlarda HDL kolesterol ve apo AI düzeylerinin daha yüksek olması östrojenin metabolik etkilerinden kaynaklanmaktadır. (79)

Tüm olgularda yaş gruplarına göre lipit parametrelerinin dağılımında (Şekil 17) total kolesterol ($p < 0.01$), LDL kolesterol ($p < 0.01$), trigliserit ($p < 0.01$) ve apo B ($p < 0.05$) 40 yaş üzerindeki grupta istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Yaş gruplarına göre kadın ve erkek olguları kendi içlerinde değerlendirdiğimizde; kadınlarda total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserit ($p < 0.01$), erkek olgularda total kolesterol ($p < 0.01$), LDL kolesterol ($p < 0.01$) ve trigliserit ($p < 0.05$) yine 40 yaş üzerindeki grupta anlamlı olarak yüksek

saptanırken, apo B farklılığı ortadan kalkmaktadır (Şekil 18 ve 19). Apo B düzeyinin değerlendirilmesinde dikkat edilmesi gereken nokta, sadece LDL kolesterolün içerdiği apo B 100'ün ölçülmediği, bunun yanında Lp (a)'nın içerdiği apo B 100'ün de ölçüldüğüdür. Bu bilgi doğrultusunda; özellikle erkeklerde 40 yaş ve altındaki grupta Lp (a) düzeyinin yüksek olmasının, iki yaş grubu arasındaki apo B farklılığının ortadan kalkmasında etken olabileceği görüşünü ortaya atabiliriz. (45)

Olguların kaynağına göre lipit parametrelerini karşılaştırdığımızda; Yemişli köyü olgularının, hastaneye başvuran olgulara göre, istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha yüksek total, LDL ve HDL kolesterol ile apo AI düzeylerine sahip olduklarını saptadık (Tablo XX). Yemişli köyünde daha önceden yapılan tarama sonuçlarında da yine total ve LDL kolesterol düzeyleri yüksek olarak saptanmıştır. E 3/4 ve 4/4 genotiplerinin yüksek total ve LDL kolesterol düzeyleri ile ilişkili olduğunu göz önüne alarak bu farklılığı açıklayabiliriz. E 3/4 ve 4/4 genotipleri Yemişli köyü olgularında sırasıyla %22.0 ve %2.4 sıklıkta bulunurken, hastaneye başvuran olgularda %11.8 ve %0 olarak saptanmıştır (Tablo XXVI). ε4 allelinin rölatif sıklığı açısından da iki toplum farklılık göstermektedir. Yemişli köyünün olgularında 0.146 iken, hastaneye başvuran olgularda 0.073'tür (Tablo XXVII). HDL kolesterol ve paralelinde apo AI düzeylerinin Yemişli köyü olgularında daha yüksek olarak bulunmasını ise kent insanların köye oranla daha sedanter yaşam biçimlerine sahip olmalarıyla açıklayabiliriz.

Tüm olgularda tablo XXII'de de görüldüğü gibi, sık görülen üç homozigot ve üç heterozigot apo E genotiplerinden, E 2/2 genotipi dışında diğerleri toplumda yer almaktadır. Çalışılan 75 olgudan 8'i (%10.7) E 2/3, 2'si (%2.7) E 2/4, 51'i (%68.0) E 3/3, 13'ü (%17.3) E 3/4 ve 1 olgunun (%1.3) E 4/4 genotipine sahip olduğu saptanmıştır (Tablo XXIII). E 2/3 genotipi erkeklere oranla kadınlarda belirgin yükseklik gösterirken, erkeklerde E 3/3 daha yüksek olarak saptanmıştır. Boerwinkle ve arkadaşlarının Fransa'da, Ordovas ve arkadaşlarının Amerika'da yaptıkları çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır. Ancak olgu sayısının

azlığının, bu konuda kesin bir yargıya varmamızı engellediği düşüncesindeyiz. (8,56)

Tablo XXIX'da verilen değişik populasyonlarda saptanan apo E genotiplerinin sıklıklarını, bizim çalışmamızın sonuçları ile kıyasladığımızda, koroner arter hastalığının düşük görüldüğü Japon toplumuna benzerlik gösterdiği ortaya çıkmaktadır. Almanya ve Kuzey İskoçya sonuçları birbirine paralellik gösterirken, Kanada, özellikle E 4/4 sıklığı açısından bu iki toplumdan ayrılmaktadır. Amerika'nın San Fransisko kentinde yapılan çalışma ise E 2/3, 3/3 ve 4/4 sıklıkları açısından Kanada'dan farklılık göstermektedir. Burada, Kanada ve Amerika'nın sonuçlarını yorumlarken dikkat edilmesi gereken nokta, her iki ülkenin de heterojen toplum yapısının olduğudur. Diğer taraftan, koroner kalp hastalığının oldukça sık görüldüğü Finlandiya, özellikle E 3/4 ve E 4/4 genotiplerinin yüksek sıklıkta, E 3/3'ün ise düşük sıklıkta görülmesi ile tüm toplumlara göre farklılık taşımaktadır. Bizim olgularımız arasında E 2/2 genotipinin bulunmaması, olgu sayısının diğer çalışmalara oranla daha düşük olmasından kaynaklanabilir. Ancak olgu sayımızı arttırmamızın, apo E genotiplerinin sıklığını ne ölçüde etkileyeceği de tartışma konusudur. (16, 19, 23, 24, 49, 76)

Tablo XXIX. Değişik populasyonlarda apo E genotiplerinin sıklığı (%)

| Merkez (n) | E 2/2 | E 2/3 | E 2/4 | E 3/3 | E 3/4 | E 4/4 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Almanya (Münih) (272) | 1.1 | 11.8 | 2.6 | 59.5 | 23.9 | 1.1 |
| Kuzey İskoçya (400) | 0.5 | 12.8 | 2.8 | 58.2 | 24.7 | 1.0 |
| Finlandiya (Helsinki) (207) | 0.5 | 10.1 | 1.4 | 47.3 | 34.8 | 5.8 |
| Kanada (Ottawa) (102) | 2.0 | 9.8 | 2.0 | 61.7 | 20.6 | 3.9 |
| USA (San Fransisko) (412) | 0.5 | 8.5 | 1.0 | 67.0 | 20.6 | 2.4 |
| Japonya (Osaka) (100) | 0 | 12 | 1.0 | 71.1 | 15.0 | 1.0 |
| Çukurova (75) | 0 | 10.7 | 2.7 | 68.0 | 17.3 | 1.3 |

Apo E genotip sıklığı yanında, allellerin rölâtif sıklıkları da değişik populasyonlarda saptanmıştır. Tablo XXX'da görüldüğü gibi ϵ_2 İskoçya, ϵ_4 Finlandiya ve ϵ_3 de Çin ile Japon populasyonlarında en yüksek sıklıkta saptanmışlardır. Güney Amerika yerlilerinde ϵ_2 'nin hiç olmaması ve ϵ_4 'ün Finlandiya kadar olmasa da, yüksek sıklıkla görülmesi dikkat çekicidir. Dünyanın değişik yerlerinde yaşayan Yahudiler üzerinde yapılan çalışmalarda apo E allel sıklıkları Framingham sonuçlarına benzerlik göstermektedir. İskoç toplumu dışında, ϵ_4 allel sıklığı Avrupa'da kuzeyden güneye doğru azalmaktadır. Asya populasyonunda ise en düşük düzeye ulaşmaktadır. Bununla birlikte, zenci Afrikalılarda ve Papua Yeni Gine'de ϵ_4 yine yüksek sıklıkta karşımıza çıkmaktadır. (3, 8, 19, 24, 26, 49, 54, 56, 74, 97)

Çukurova Bölgesi'nin apo E allellerinin rölâtif sıklıkları Asya populasyonlarında yapılan çalışmalara benzerlik göstermektedir. Tablo XXVII'de de görüldüğü gibi ϵ_2 0.067, ϵ_3 0.820 ve ϵ_4 0.113'lük bir rölâtif sıklığa sahiptir. Bizim toplumumuzda ϵ_4 ve ϵ_2 allelleri, Avrupa ve Amerika populasyonlarına göre daha düşük sıklıkta saptanmıştır.

Bizim çalışmamızın apo E genotiplerinin % sıklığını olgu kaynağına göre incelediğimizde daha farklı bir sonuçla karşılaşmaktayız (Tablo XXVI). Yemişli köyü olgularının sonuçları, Finlandiya dışındaki Almanya, Kuzey İskoçya, Kanada ve Amerika gibi batı toplumu sonuçlarıyla uygunluk göstermektedir. Benzer şekilde E 2/3, 3/4 ve 4/4 genotipleri yüksek ve 3/3 genotipi ise düşüktür. Bunun yanında, hastaneye başvuran olgularda E 3/4 ve 4/4 genotipleri Japon toplumundan da daha düşük olarak bulunmuştur. E 3/3 genotipi ise çalışılan tüm populasyonlardan daha yüksek sıklıkta saptanmıştır. E 2/3 ve 2/4 genotipleri ise batı toplumuna daha uygunluk göstermektedir.

Olgu kaynağına göre apo E allellerinin rölâtif sıklığı da farklılık göstermektedir (Tablo XXVII). Yemişli köyü olguları, allellerin rölâtif sıklığı açısından Almanya, Amerika ve Yahudilerde saptanan sonuçlara uygunluk göstermektedir. Hastaneye başvuran olgular ise Asya populasyonunun sonuçlarıyla daha uyumludur.

Populasyonlar arası apo E allel sıklıklarındaki farklılıklardan nelerin sorumlu olduğuna yönelik özgün çalışmalar henüz bulunmamaktadır. Ancak

populasyonlar arası $\epsilon 4$ allel sıklığındaki farklılıklar, belki de değişik populasyonlardaki kardiyovasküler hastalık prevalansındaki değişkenliği açıklamakta yardımcı olabilir. (74)

Tablo XXX. Değişik populasyonlarda apo E allellerinin rölatif sıklığı

| Merkez | n | $\epsilon 2$ | $\epsilon 3$ | $\epsilon 4$ |
|---------------------|------|--------------|--------------|--------------|
| USA Framingham | 1108 | 0.075 | 0.790 | 0.135 |
| USA San Fransisko | 412 | 0.052 | 0.816 | 0.132 |
| Eski Batı Almanya | 1000 | 0.078 | 0.783 | 0.139 |
| | 272 | 0.083 | 0.774 | 0.143 |
| Fransa Nancy | 434 | 0.123 | 0.751 | 0.126 |
| Güney Amerika | 95 | 0.000 | 0.816 | 0.184 |
| Yerlileri | | | | |
| Çin | 196 | 0.086 | 0.852 | 0.064 |
| Japonya | 880 | 0.035 | 0.851 | 0.112 |
| Yahudiler | 5805 | 0.080 | 0.769 | 0.150 |
| Finlandiya Helsinki | 207 | 0.063 | 0.698 | 0.239 |
| İskoçya | 400 | 0.147 | 0.770 | 0.083 |
| Çukurova | 75 | 0.067 | 0.820 | 0.113 |

Apo E'nin lipoprotein reseptörleriyle olan ilişkisi, farklı apo E genotiplerinin lipoprotein metabolizması üzerine farklı etkileşimlerini ortaya çıkarmaktadır. Bu konu ilk olarak Utermann ve arkadaşlarının, normal populasyonda yaptıkları bir çalışmada $\epsilon 2$ allellini taşıyan bireylerde, E 3/3 genotipini taşıyan bireylere kıyasla, daha düşük plazma total ve LDL kolesterol düzeylerini saptamaları ile gündeme gelmiştir. Bunu, Bouthillier ve arkadaşları ile Davignon ve arkadaşlarının, $\epsilon 4$ allellini taşıyan bireylerin E 3/3 genotipi olanlara göre daha yüksek plazma total ve LDL kolesterol düzeylerine sahip olduklarını açıklamaları izlemiştir. (9, 76, 88, 91, 92)

Eichner ve arkadaşları ise, orta yaş erkeklerde yaptıkları bir çalışmada, apo E genotiplerine göre LDL kolesterolün istatistiksel açıdan anlamlı farklılık

gösterdiğini yayınlamışlardır. Bu çalışmada, diğer apo E genotiplerini taşıyan gruplarla apo E 2/3 genotipine sahip olanların LDL kolesterol düzeyleri arasında 20-23 mg/dl'lik bir farkın bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte, total kolesterol ve trigliserit düzeylerinin apo E genotipine göre farklılık gösterdiğini de belirtmişlerdir. (24)

Manke ve arkadaşlarının famiyal defektif apo B-100'lü hastalarla normal populasyonu, apo E genotipleri açısından karşılaştırdıkları çalışmada, kontrol olgularında; E 2/2 grubunun en düşük total ve LDL kolesterol, E 4/4 grubunun ise en yüksek total ve HDL kolesterol düzeyleriyle ilişkili olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca trigliserit konsantrasyonu açısından E 2/2 ve E 4/4 gruplarının istatistiksel olarak farklılık taşıdıkları, E 2/2 grubunun daha yüksek konsantrasyona sahip olduğu da belirtilmektedir. Bu çalışmada apo E allellerinin lipit parametreleri üzerine olan etkisi de incelenmiştir. Genel olarak $\epsilon 2$ allellinin LDL ve HDL kolesterolü, $\epsilon 3$ allellinin trigliseriti düşürücü ve $\epsilon 4$ allellinin ise total ve LDL kolesterolü yükseltici etkisinin bulunduğu sonucuna varılmıştır. (49)

Bizim çalışmamızda ise istatistiksel olarak değerlendirmeye aldığımız üç farklı apo E genotipine sahip gruplar arasında total ve LDL kolesterol ile trigliserit, Lp (a), apo AI ve apo B açısından anlamlı bir farklılık gözlenmezken, HDL kolesterolde farklılık bulunmaktadır (Tablo XXIV). HDL kolesterol düzeyi en yüksek E 2/3, en düşük 3/3 grubunda saptanmıştır. Bunun, gruplardaki cinsiyet farklılığından kaynaklandığını düşünüyoruz. Erkek/kadın oranı E 2/3, 3/3 ve 3/4 grupları için sırasıyla 1/7, 20/31 ve 4/9'dur. Ortalama HDL kolesterol düzeylerine göre grupları sıralarsak E 3/3 < E 3/4 < E 2/3 diziliminin cinsiyet oranına paralellik gösterdiği sonucunu elde ederiz. Birçok çalışmada apo E genotipinin HDL kolesterol üzerine etkisi olmadığı yönünde sonuçlar alınmış ise de, Manke ve arkadaşlarının çalışmasında en yüksek HDL kolesterol düzeyi E 4/4 genotipini taşıyan bireylerde gözlenmiştir. Bu çalışmada grupların cinsiyet oranı verilmemiştir. Fakat en yüksek düzeye sahip grubun yaş ortalaması en düşük olandır. (49)

Diğer parametreler açısından farklılık bulunmaması sonucuna ulaşmamıza etken olabileceğini düşündüğümüz faktörler:

- E 2/2 genotipinin olgularımız arasında bulunmaması.

- E 2/4 ve 4/4 gruplarındaki olgu sayılarının yetersizliği nedeniyle istatistiksel değerlendirmeye alınmaması.
- Değerlendirmeye alınan E 2/3, 3/3 ve 3/4 gruplarının farklı yaş ortalamalarına sahip olmalarıdır.

E 3/4 grubu (37 ± 14.1) en düşük, 3/3 grubu (46 ± 14.1) ise en yüksek yaş ortalamasına sahip olgulardan oluşmaktadır. Lipit parametreleri yaşa göre değişiklik göstermekte ve persentil değerleri saptanmış durumdadır. Total ve LDL kolesterol ile trigliseritin yaşla olan pozitif korelasyonu ve HDL'nin negatif korelasyonu göz önünde bulundurulması gereken bir gerçektir. (79)

Farklı apo E genotipindeki bireylerin, aynı LDL kolesterol konsantrasyonuna sahip olmaları, LDL kolesterol eğrisinin farklı persentilinde yer almalarından kaynaklanabilir. E 2/3 genotipini taşıyan grupta 110 mg/dl LDL kolesterol düzeyi olan bir kişi, bu grubun %95'lik persentiline daha yakın olabilir. Aynı şekilde 3/4 genotipini taşıyan grupta 110 mg/dl LDL kolesterol düzeyi olan bir kişi, bu grubun %5'lik persentiline daha yakın olabilir. (24)

Olaya ateroskleroz açısından bakacak olursak, yüksek LDL kolesterol düzeyine sahip bireylerin, bu düzeye ne kadar süredir maruz kaldıkları da önem taşımaktadır. E3/4 genotipindeki bir kişi, 3/3 ya da 2/3 genotipindeki bir kişiye göre daha uzun süredir yüksek LDL kolesterol düzeyine sahip olabilir. Sonuç olarak, başka etkenleri göz önüne almadan, sadece LDL kolesterol düzeylerine bakarak, bu kişilerin ateroskleroz riskini ne oranda taşıdıklarını kestirmemiz mümkün olmayacaktır. (24)

Apo E polimorfizminin apolipoprotein düzeyleri üzerine olan etkisi de araştırılmıştır. Sing ve Davignon ile Utermann yaptıkları çalışmalar sonucunda en düşük apo B düzeyinin E 2/2, en yüksek apo B düzeyinin ise E 4/4 ve 3/4 genotipleriyle ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Havekes ve arkadaşları da benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Ayrıca Utermann tarafından apo B farklılığı üzerine apo E polimorfizminin %12'lik bir etkisinin bulunduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte apo AI üzerine apo E polimorfizminin herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmektedir. Diğer taraftan ateroskleroz açısından bağımsız risk faktörü olarak değerlendirilen Lp (a) üzerine apo E polimorfizminin etkisi ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. (12, 76, 92)

Bizim çalışmamızda gruplar arası apo AI farklılığı, istatistiksel açıdan anlam taşımamakla birlikte, HDL kolesterol sonuçlarına uygunluk göstermektedir. Benzer uygunluk, apo B ile LDL kolesterol ve apo B ile Lp (a) arasında da gözlenmektedir (Tablo XXV). LDL kolesterol, Lp (a) ve apo B grup ortalamalarını yüksek düzeyden düşüğe doğru sıralayacak olursak E3/3> E 3/4> E 2/3 dizilimini elde etmekteyiz.

Olgu kaynağına göre, apo E genotiplerinin lipit parametreleri üzerine olan etkileri, sayı yetersizliği nedeniyle istatistiksel açıdan anlamlı olmayacağı düşünüülerek yapılmamıştır.

Ateroskleroz açısından yüksekliği ya da düşüklüğü risk faktörü olarak değerlendirilen lipit parametrelerine göre apo E allellerinin % dağılımı tablo XXVIII'de verilmektedir. Risk (-) grupta $\epsilon 2$ alleli, risk (+) gruba göre oldukça yüksek yüzdeyle saptanmıştır. Bunun yanında risk (-) gruba göre risk (+) grupta $\epsilon 4$ allelinin daha yüksek yüzdeye sahip olması beklenirken, daha düşük olarak bulunmuştur. Bu sonuç, $\epsilon 4$ allelini taşıyan bireylerin ateroskleroz riski taşıdığına yönelik bir değerlendirme yapmamızı engellemektedir.

Bu çalışma ile;

- Total ve LDL kolesterol ile apo B ve Lp (a) yüksekliği, HDL kolesterol ve apo AI düşüklüğü gibi ateroskleroz açısından risk faktörleri olarak kabul edilen parametreler özellikle erkek popülasyonunda saptanmıştır. Hem LCAT eksikliği gibi genetik faktörler, hem de beslenme alışkanlığı ve egzersiz gibi çevresel faktörler üzerinde yoğunlaşarak, bu konudaki çalışmalar ilerletilmelidir.
- Çukurova Bölgesi'nin apo E genotipleri ve allellerinin sıklığı açısından Asya popülasyonuna paralellik gösterdiği, diğer taraftan total ve LDL kolesterolün yüksek olarak saptandığı Yemişli köyü olgularının ise batı toplumuna benzerlik gösterdiği ortaya çıkmaktadır. $\epsilon 4$ allelinin daha yüksek olarak saptandığı bu köyde, halkın, ateroskleroz risk faktörleri ve korunma amacıyla yapılması gerekenler konusunda aydınlatılmasını gerekli kılmaktadır.
- Başlangıç olarak düşünülen bu çalışmanın, olgu sayısının artırılması ile lipit parametreleri ile apo E genotipleri arasındaki ilişki açısından daha

anlamli sonuçlar vereceği dşncesi ağırlık taşımaktadır. Bununla birlikte, çalışmaya alınan olguların belirli aralıklarla izlenmesinin de lipit parametrelerinin yaşa göre değişkenliğini görmemize katkıda bulunacağı görüşünü taşımaktayız.



SONUÇ

1. Toplam 75 olgunun lipit parametreleri ve apo E genotipleri saptanmıştır.
2. Aterosklerozun risk faktörleri olarak değerlendirilen lipit parametrelerinin olgularımızdaki dağılımı saptanmıştır.
3. Apo E allellerinin rölatif sıklığı $\epsilon 2$ 0.067, $\epsilon 3$ 0.820 ve $\epsilon 4$ 0.113 olarak tespit edilmiştir.
4. Genel olarak allel sıklığı Asya popülasyonuna uygunluk gösterse de, Yemişli köyü sonuçlarının aterosklerozun daha sık görüldüğü batı toplumuna benzerlik gösterdiği saptanmıştır.
5. Apo E polimorfizminin lipit parametreleri üzerine belirgin bir etkisi saptanamamıştır. Ancak olgu sayısı artırılarak daha anlamlı sonuçlar alınacağı görüşüne varılmıştır.
6. Çukurova Bölgesi'nin tamamını kapsayacak çalışmalar için ön çalışma yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Alberta B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: *Molecular Biology of the Cell*. New York and London, Garland Publishing Inc., 1994, ed 3 p 303-305.
2. Appel E, Eisenberg S, Roitelman J: Improved PCR Amplification/Hha I restriction for Unambiguous determination of apolipoprotein E alleles. *Clin Chem* 1995; 41/2: 187-190.
3. Asakawa J, Takahashi N, Rosenblum BB, Neel JW: Two-dimensional gel studies of genetic variation in the plasma proteins of Amerindians and Japanese. *Hum Genet* 1985; 70: 222-230.
4. Beaudet AL, Scriver CR, Sly WS, Valle D: *Genetics, Biochemistry, and Molecular Basis of Variant Human Phenotypes* in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. USA: Mc Graw-Hill Inc., 1995; ed 7 p 53-118.
5. Berg K: A new serum type system in man: The Lp-system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1963; 59: 369-382.
6. Bhagavan NV: *Medical Biochemistry, USA*, Jones and Bartlett Publishers Inc., 1992, ed 2 p 384-419.
7. Bhatnagar D, and Durrington PN: Clinical value of apolipoprotein measurement. *Ann Clin Biochem* 1991; 28: 427-437.
8. Boerwinkle E, Sing CF: The use of measured genotype information in the analysis of quantitative phenotypes in man. III. Simultaneous estimation of the frequencies and effects on cholesterol, betalipoprotein and triglyceride levels. *Ann Hum Genet* 1987; 51: 211-226.
9. Bouthillier D, Sing CF, Davidnon J: Apolipoprotein E phenotyping with a single gel method-application to the study of informative matings. *J Lipid Res* 1983; 24: 1060-1069.
10. Breslow JL: Apolipoprotein genetic variation and human disease. *Physiol Rev* 1988; 65: 85-132.
11. Brown MS, Goldstein JL: A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.

12. Choe YH, Choi Y, Kim JQ: Lipoprotein (a) in Korean children and a history of coronary or cerebral vascular events in their older family members. **Ann Clin Biochem** 1997; 34: 179-184.
13. Civeira F, Pocovi M, Cenarro A, Casao E, Joven J, Gonzalez J, Garcia-Otin AL, Ordovas JM: Apo E variants in patients with type III hyperlipoproteinemia. **Atherosclerosis** 1996; 127 (2): 273-282
14. Clavel C, Durlach A, Durlach V, Birembaut P: Rapid and safe determination of human apolipoprotein E genotypes by miniaturised SDS-PAGE in non-insulin dependent diabetes mellitus. **J Clin Pathol** 1995; 48: 295-299.
15. Clay MA, Anantharamaiah GM, Mistry MJ, Balasubramaniam A, and Harmony JAK: Localization of a domain in apolipoprotein E with both cytostatic and cytotoxic activity. **Biochemistry** 1995; 34: 11142-11151.
16. Cumming AM, Robertson F: Polymorphism at the apo E locus in relation to risk of coronary disease. **Clin Genet** 1984; 25: 310-313.
17. Dallinga-Thie GM, Trip ML-S, Kock LAW, De Bruin TWA: Apolipoprotein E2/E3/E4 genotyping with agarose gels. **Clin Chem** 1995; 41/1: 73-75.
18. Das KH, McPherson J, Bruns GAP, Karathanasis SK, and Breslow JL: Isolation, characterization, and mapping to chromosome 19 of the human apolipoprotein E gene. **J Biol Chem** 1985; 260: 6240-6247.
19. Davignon J, Gregg RE, and Sing CF: Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. **Arteriosclerosis** 1988; 8: 1-21.
20. Drayna D, Jarnagin AS, McLean J, Henzel W, Kohr W, Fielding S, Lawn R: Cloning and sequencing of human cholesteryl ester transfer protein cDNA. **Nature** 1987; 327: 632-637.
21. Duly EB, Ward AJ, Kirk CW, Nevin NC, Trinick TR, Nicholls DP, Young IS, Graham CA: Apo E genotype and familial hypercholesterolaemia. **Ann Clin Biochem** 1997; 34: 534-536.
22. Edelstein C, Kezdy F, Scanu AM, Shen BW: Apolipoproteins and the structural organization of plasma lipoproteins: Human plasma high density lipoprotein-3. **J Lipid Res** 1979; 20: 143-148.

23. Ehnholm C, Lukka M, Kuusi T, Nikkila E, Utermann G: Apolipoprotein E polymorphism in the Finish population: gene frequencies and relation to lipoprotein concentrations. **J Lipid Res** 1986; 27: 227-235.
24. Eichner JE, Kuller LH, Orchard TJ, Grandits GA, McCallum LM, Ferrell RE, and Neaton JD: Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. **Am J Cardiol** 1993; 71: 160-165.
25. Eisenberg S: High density lipoprotein metabolism. **J lipid Res** 1984; 25: 1017-1025.
26. Eto M, Watanabe K, Ishii K: Reciprocal effects of apolipoprotein E alleles ($\epsilon 2$ and $\epsilon 4$) on plasma lipid levels in normolipidemic subjects. **Clin Genet** 1986; 29: 477-484.
27. Fielding CJ: Lecithin: cholesterol acyltransferase in Esfahanie M, Swaney J (eds): *Advances in Cholesterol Research*. Telford, Caldwell Inc., 1990; p 270-279.
28. Fless GM, Zum Mallen ME, Scanu AM: Physico-chemical properties of apolipoprotein (a) and lipoprotein (a) derived from the dissociation of human plasma lipoprotein (a). **J Biol Chem** 1986; 261: 8713-8719.
29. Friedman G, Ben-Yahuda A, Dabach Y, Ben-Naim M: Scavenger receptor activity and expression of apolipoprotein E mRNA in monocyte-derived macrophages of young and old healthy men. **Atherosclerosis** 1997; 128 (1): 67.
30. Guevara J Jr, Knapp RD, Honda S, Northup SR, Morrisett JD: A structural assessment of the apo (a) protein of human lipoprotein (a). **Proteins** 1992; 12: 188-199.
31. Havekes L, Vermeer BJ, Brugmann T, Emeis J: Binding of Lp(a) to the low density lipoprotein receptor of human fibroblast. **FEBS Lett** 1981; 132: 169-173.
32. Havel RJ, Chao YS, Windler EE, Kotite L, Guo LSS: Isoprotein specificity in the hepatic uptake of apolipoprotein E and the pathogenesis of familial dysbetalipoproteinemia. **Proc Natl Acad Sci** 1980; 77: 4349-4353.
33. Havel RJ, Kane JP: Introduction: Structure and Metabolism of Plasma Lipoproteins in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic*

- and Molecular Bases of Inherited Disease. USA: Mc Graw-Hill Inc., 1995; ed 7 p 1841-1851.
34. Havel RJ: Origin, Metabolic Fate and Metabolic Function of Plasma Lipoproteins in Steinberg D, Oletsky JM (eds): Contemporary Issues in Endocrinology and Metabolism. New York, Churchill Livingstone, 1987; ed 2 p 117-169.
 35. Hixson JE, Vernier DT: Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with Hha I. **J Lipid Res** 1990; 31: 545-548.
 36. Humphries SE: The application of molecular biology techniques to the diagnosis of hyperlipidemia and other risk factors for cardiovascular disease. **Clin Chem Acta** 1993; 216: 5-18.
 37. Innerarity TL, Friedlander EJ, Rall Jr SC, Weisgraber KH, and Mahley RW: The receptor binding domain of human apolipoprotein E: binding of apolipoprotein E fragments. **J Biol Chem** 1983; 258: 12341-12347.
 38. Jackson RL: Lipoprotein Lipase and Hepatic Lipase, in Boyer PD(ed): The Enzymes. New York, New York Academic Sci, 1983; ed 2 p 141-173.
 39. Jialal I, Devaraj S: Antioxidants, LDL oxidation and atherosclerosis. **The Fats of Life** 1995; VIII: 9-14.
 40. Kamboh MI, Ferrell RE, Kottke B: Expressed hypervariable polymorphism of apolipoprotein (a). **Am J Hum Genet** 1991; 49: 1063-1084.
 41. Kraft HG, Menzel HJ, Hoppichler F, Vogel W, Utermann G: Changes of genetic apolipoprotein phenotypes caused by liver transplantation. Implications for apolipoprotein synthesis. **J Clin Invest** 1989; 83: 137-144.
 42. Lahoz C, Osgood D, Wilson PWF, Schaefer EJ, and Ordovas JM: Frequency of phenotype-genotype discrepancies at the apolipoprotein E locus in a large population study. **Clin Chem** 1996; 42/11: 1817-1823.
 43. Lalazar A, Ignatius Ou S-H, and Mahley RW: Human apolipoprotein E: receptor binding activity of truncated variants with carboxyl-terminal deletions. **J Biol Chem** 1989; 264: 8447-8450.
 44. Lalazar A, Weisgraber KH, Rall Jr SC, Giladi H, Innerarity TL, Levanon AZ, Boyles JK, Amit B, Gorecki M, Mahley RW, and Vogel T: Site-specific

- mutagenesis of human apolipoprotein E: receptor binding activity of variants with single amino acid substitutions. **J Biol Chem** 1988; 263: 3542-3545.
45. Mahley RW, Rall Jr SC: Type III hyperlipoproteinemia: The role of apolipoprotein E in normal and abnormal lipoprotein metabolism, in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. USA: Mc Graw-Hill Inc., 1995; ed 7 p 1953-1980.
46. Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity TL, And Rall Jr SC: Genetic defects in lipoprotein metabolism: elevation of atherogenic lipoproteins caused by impaired catabolism. **JAMA** 1991; 265: 78-83.
47. Mahley RW: Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. **Science** 1988; 240: 622-630.
48. Mahley RW: Aterogenezin Hücresel ve Moleküler Biyolojisi, İstanbul, Merck Sharp and Dohme (Çeviri Ed.leri Gökdemir O, Palaoğlu KE), 1993 s iii-iv, 43-78.
49. Manke C, Schuster H, Keller C, Wolfram G: The effect of the apolipoprotein E polymorphism on lipid levels in patients with familial defective apolipoprotein B-100. **Clin Investig** 1993; 71: 277-280.
50. Mayes PA: Lipid Transport and Storage in Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell W (eds): *Harpers Biochemistry*, USA: Prentice-Hall International Inc., 1993, ed 23 p 250-265.
51. Mayes PA: Lipids of Physiologic Significance in Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell W (eds): *Harpers Biochemistry*, USA: Prentice-Hall International Inc., 1993, ed 23 p 142-153.
52. Mc Lean JW, Fukazawa C, Taylor JM: Rat apolipoprotein E mRNA. Cloning and sequencing of double-stranded cDNA. **J Biol Chem** 1983; 264: 8993-9000.
53. Mc Lean JW, Tomlinson JE, Kuang W-J, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM: cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. **Nature** 1987; 300: 132-137.
54. Menzel HJ, Klodetzky RG, Assmann G: Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. **Arteriosclerosis** 1983; 3: 310-315.

55. Morrisett J, Gaubatz J, Nava M, Guyton J, Hoffmann A, Hachey D: Apo (a) apo B100 in human lipoprotein (a) in Copapano AL, Gotto AM Jr, Smith LC (eds): *Drugs Affecting Lipid Metabolism*. Boston, Kluwer Inc, 1993; p 161-193.
56. Ordovas JM, Litwack-Klein L, Wilson PWF, Schaefer MM, Schaefer EJ: Apolipoprotein E isoform phenotyping methodology and population frequency with identification of apo E1 and apo E5 isoforms. *J Lipid Res* 1987; 28: 371-380.
57. Paik Y-K, Chang DJ, Reardon CA, Davies GE, Mahley RW, and Taylor JM: Nucleotid sequence and structure of the human apolipoprotein E gene. *Proc Natl Acad Sci* 1985; 82: 3445-3449.
58. Rall Jr SC, and Mahley RW: The role of apolipoprotein E genetic variants in lipoprotein disorders. *J Internal Med* 1992; 231: 653-659.
59. Rall Jr SC, Newhouse YM, Clarke HRG, Weisgraber KH, McCarthy BJ, Mahley RW, and Bersot TP: Type III hyperlipoproteinemia associated with apolipoprotein E phenotype E3/3. *J Clin Invest* 1989; 83: 1095-1101.
60. Rall SC, Weisgraber KH, and Mahley RW: Human apolipoprotein E: the complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 1982; 257: 4171-4178.
61. Reed GR: Detecting apo E variants. *The Fats of Life* 1994; VII/1, 10-11.
62. Relkin NR, Kwan YJ, Tsai J, Gandy A: The National Institute on Aging/Alzheimer's Association recommendations on the apolipoprotein E genotyping to Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci* 1996; 802: 149-176.
63. Rhoads GG, Dahlen G, Berg K, Morton NE, Dannenberg AL: Lp (a) lipoprotein as a risk factor for myocardial infarction. *JAMA* 1986; 256: 2540-2544.
64. Richard P, Thomas G, Pascual de Zulueta M, Luc de Gennes J, Thomas M, Cassaigne A, Béréziat G, Iron A: Common and rare genotypes of human apolipoprotein E determined by specific restriction profiles of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Clin Chem* 1994; 40/1: 24-29.
65. Ridker PM, Hennekens CH, Stampfer M: A prospective study of lipoprotein (a) and the risk of myocardial infarction. *JAMA* 1993; 270: 2195-2199.
66. Rifai N: Lipoproteins and apolipoproteins: composition, metabolism, and association with coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 1986; 110: 694-701.

67. Rosengren A, Wilhelmsen L, Eriksson E, Risberg B, Wedel-H: Lipoprotein (a) and coronary heart disease: A prospective case-control study in a general population sample of middle aged men. **BMJ** 1990; 301: 1248-1251.
68. Rothblat GH, Mahlberg FH, Johnson WJ, Phillips MC: Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. **J Lipid Res** 1992; 33: 1091-1097.
69. Rubinsztein DC: Apolipoprotein E: a review of its roles in lipoprotein metabolism, neuronal growth and repair and as a risk factor for Alzheimer's disease. **Physiol Med** 1995; 25: 223-229.
70. Saiki RK: Amplification of genomic DNA in Imis MA, Gelford DH, Sninsky JJ, White TJ (eds): PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York, New York Academic Press Inc., 1990, p 13-20.
71. Sandholzer C, Saha N, Kork JD, Rees A, Jaross W, Dieplinger H, Hoppichler F, Boerwinkle E, Utermann G: Apo (a) isoforms predict risk for coronary heart disease: A study in six populations. **Arterioscler Thromb** 1992; 12: 1214-1221.
72. Schaefer EJ, Lamon-Fava S, Jenner JL, McNamara JR, Ordovas JM, David E, Abolafia JM, Lippel K, Levy RI: Lipoprotein (a) levels and risk of coronary heart disease in men. **JAMA** 1994; 271: 999-1003.
73. Schaefer EJ: Overview of the Diagnosis and Treatment of Lipid Disorders. Cambridge, Genzyme Corporation, 1993, p 4-6.
74. Siest G, Pillot T, Régis- Bailly A, Leininger- Muller B, Steinmetz J, Galteau M-M, and Visvikis S: Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. **Clin Chem** 1995; 41/8: 1068-1086.
75. Silberman SR, Butman BT: Lipoprotein (a): Recent progress. **The Fats of Life** 1994; VIII: 8-9.
76. Sing CF, Davignon J: Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. **Am J Hum Genet** 1985; 37: 268-285.
77. Smith JD, Miyata M, Ginsberg M, Grigaux C, Shmolder E, Plumps AS: cAMP induces apolipoprotein E binding activity and promotes efflux from a

- macrophage cell line to apolipoprotein acceptors. **J Biol Chem** 1996; 271 (48): 30647-30655.
78. Snyder SM, Terdiman JF, Caan B, Feingold KR, Hubl ST, Smith RS, and Young SG: Relationship of apolipoprotein E phenotypes to hypocholesterolemia. **Am J Med** 1993; 95: 480-488.
79. Stein EA, Myers LG: Lipids, lipoproteins and apolipoproteins in Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry. USA, Saunders, 1994, ed 2 p 1002-1093.
80. Steinberg D: Lipoproteins and atherosclerosis: a look back and a look ahead. **Arteriosclerosis** 1983; 3: 283-301.
81. Taddei-Peters WC, Jürgens G, Wiklund O, Költringer P, Petek W, Linden T, Chen Q, Greilberger J, Ulström C, macomber PF, Butman BT, Ransom JH: ELISA quantitation of Lp (a) concentration demonstrates that Lp (a) is an important risk factor in cerebro- and cardiovascular disease. **Clin Chem** 1994; 40: 1098-1099.
82. Thompson GR: Hiperlipidemi El Kitabı, İstanbul, Merck Sharp and Dohme (Çeviri ed. Tamuğur E), 1989 s 87-99.
83. Tomlinson JE, Mc Lean JW, Lawn RM: Rhesus monkey Lp (a). Sequence, evolution, and sites of synthesis. **J Biol Chem** 1989; 264: 5957-5963.
84. Tsai M-S, Tangalos EG, Petersen RC, Smith GE, Schald DJ, Kokmen E, Ivnik RJ, and Thibodeau SN: Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. **Am J Hum Genet** 1994; 54: 643-649.
85. Unger ER, Piper MA: Nucleic Acid Biochemistry and Diagnostic Applications in Burtis CA, Ashwood ER (eds): Tietz Textbook of Clinical Chemistry. USA, Saunders, 1994, ed 2 p 594-624.
86. Utermann G, Hees M, Steinmetz A: Polymorphism of apolipoprotein E and occurrence of dysbetalipoproteinemia. **Nature** 1977; 33: 11-24.
87. Utermann G, Jaeschke M, Menzel J: Familial hyperlipoproteinemia type III. Deficiency of a specific apolipoprotein (apo EIII) in the very low density lipoproteins. **FEBS Lett** 1975; 56: 352-355.

88. Utermann G, Pruin N, Steinmetz A: Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man. **Clin Genet** 1979; 15: 63-72.
89. Utermann G, Weber W: Protein composition of Lp (a) lipoprotein from human plasma. **FEBS Lett** 1983; 154: 357-361.
90. Utermann G, Wiegend H: Separation and characterization of a lipoprotein with antigenic activity in the Lp (a) system. **Hum Genet** 1969; 8: 39-45.
91. Utermann G: Apolipoprotein E mutants, hyperlipidemia and arteriosclerosis. **Adv Exp Med Biol** 1985; 183: 173-188.
92. Utermann G: Genetic polymorphism in apolipoprotein E-Impact on plasma lipoprotein metabolism in Crepaldi G, Tiengo A, Baggio G (eds): *Diabetes, Obesity and Hyperlipidemias III*. Amsterdam, Excerpta Medica, 1985, p 1-28.
93. Utermann G: Lipoprotein (a) in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds): *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. USA: McGraw-Hill Inc., 1995; ed 7 p 1887-1912.
94. Utermann G: The mysteries of lipoprotein (a). **Science** 1989; 246: 904-910.
95. van Holde KE, Mathews C: *Biochemistry*. The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., USA, 1990: 571-603.
96. Walden CC, and Hegele RA: Apolipoprotein E in hyperlipidemia. **Ann Intern Med** 1994; 120: 1026-1036.
97. Wang K: Studies of human apolipoprotein E genetic isoforms and their phenotypes among the Chinese population. **Acta Acad Med Sinicae** 1986; 8: 198.
98. Weisgraber KH, Innerarity TL, Harder KJ, Mahley RW, Milne RW, Marcel YL, and Sparrow JT: The receptor binding domain of human apolipoprotein E: monoclonal antibody inhibition of binding. **J Biol Chem** 1983; 258: 12348-12354.
99. Weisgraber KH, Mahley RW: Human apolipoprotein E the Alzheimer's disease connection. **FASEB J** 1996; 10 (13): 1485-1494.
100. Wenham PR, Price WH, Blundell G: Apolipoprotein E genotyping by one stage PCR. **Lancet** 1991; 337: 1158-1159.

101. Wenham PR, Sedky A, and Spooner RJ: Apolipoprotein E phenotyping: a word of caution. **Ann Clin Biochem** 1991; 28: 599-605.
102. Westerlund JA, and Weisgraber KH: Discrete carboxy-terminal segments of apolipoprotein E mediate lipoprotein association and protein oligomerization. **J Biol Chem** 1993; 268: 15745- 15750.
103. Williams KJ, Fless GM, Petrie KA, Synder ML, Brocia RW, Swenson TL: Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein (a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. **J Biol Chem** 1992; 267: 13284-13291.
104. Wilson PWF: Relation of high-density lipoprotein subfractions and apolipoprotein E isoforms to coronary disease. **Clin Chem** 1995; 41/5: 165-169.
105. Yüregir GT, Arpacı A, Tuli A: Temel ve Klinik Biyokimya'da İleri Teknoloji ve Yöntemleri. Adana, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 1995, p 45-47.
106. Zannis VI, and Breslow JL: Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein is explained by genetic variation and posttranslational modification. **Biochemistry** 1981; 20: 1033-1041.
107. Zhao S-P, Van Den Maagdenberg MJM, Vroom TFFP, Hooft FMV, Leuven JAG, Havekes LM, Frants RR, Van Der Laarse A, and Smelt AHM: lipoprotein profiles in a family with two mutants of apolipoprotein E: possible association with hypertriglyceridemia but not with dysbetalipoproteinemia. **Clin Sci** 1994; 86: 323-329.
108. Zioncheck TF, Powell LM, Rice GC, Eaton DL, Lawn RM: Interaction of recombinant apolipoprotein (a) and lipoprotein (a) with macrophages. **J Clin Invest** 1991; 87: 767-772.
109. Zubay G: Biochemistry. USA, Wm. C. Brown Publishers Inc., 1993, ed 3 p 635- 658.