

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

BEHÇET HASTALIĞINDA APOLİPOPROTEİN E POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ

Doktora Tezi

T 107654

MELTEM MALKOÇ

MAYIS-2001
TRABZON

KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BIYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

BEHÇET HASTALIĞINDA APOLİPOPROTEİN E POLİMORFİZMİNİN
İNCELENMESİ

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANLASYON MERKEZİ

Meltem MALKOÇ

107654

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi : 01.05.2001

Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 04.06.2001

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. Asım ÖREM

Jüri Üyesi

: Doç. Dr. Eser YILDIRIM SÖZMEN

Jüri Üyesi

: Prof. Dr. Orhan DEĞER

Enstitü Müdürü

: Doç. Dr. Abdülkadir REİS

Haziran-2001

TRABZON

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER	ii
ÖNSÖZ	iv
KISALTMALAR	v
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Behçet Hastalığı Hakkında Genel Bilgiler	3
2.1.1.Tarihçesi	3
2.1.2. Etiyopatolojisi	3
2.1.3. Patogenezi.....	4
2.2. Lipoproteinler Hakkında Genel Bilgiler	7
2.2.1. Lipoproteinlerin Genel Sınıflandırılması ve Yapıları	7
2.2.2. Apolipoproteinler	8
2.3. Apo E Hakkında Genel Bilgiler	9
2.3.1. Apo E'nin Moleküler Biyolojisi	10
2.3.2. Apo E'nin Fonksiyonları	13
2.3.3. Apo E Polimorfizmi ve Lipoprotein Metabolizmasıyla İlişkisi	14
2.3.4. Apo E polimorfizminin Plazma Lipid Düzeylerine Etkisi	15
2.3.5. Apo E'nin Klinik Önemi	16
3. MATERYAL VE METOD	18
3.1. Materyal	18
3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler.....	18
3.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	19
3.1.3. Kullanılan Primerler.....	20
3.2. Metodlar	20
3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması.....	20
3.2.2. Lipid Parametrelerinin Tayini.....	20
3.2.3. Tam Kandan DNA Eldesi.....	21
3.2.4. PCR ile Apo E Geninin Amplifikasyonu	23

3.2.5. Amplifikasyon Koşulları	24
3.2.6.PCR Programı	25
3.2.7. Amplifikasyon Kontrolü.....	25
3.2.8. Restriksiyon Tipleme Yöntemi (RFLP) ile Apo E Genotipinin Belirlenmesi.....	26
3.2.9. Poliakrilamid (PAGE) Elektroforezi.....	27
3.2.10. İstatistiksel Analizler	29
4. BULGULAR.....	30
5. TARTIŞMA.....	37
5.1. Metod Tartışması	37
5.2. Bulguların Tartışması.....	40
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	46
7. ÖZET	47
8. SUMMARY	48
9. KAYNAKLAR	49

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi, yardım ve desteğini her zaman yanımda bulduğum sayın hocam Prof. Dr. Asım ÖREM'e ve Biyokimya Anabilim Dalındaki diğer öğretim üyelerine, çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni aydınlatan, yol gösteren sayın hocam Doç. Dr. Ali Osman KILIÇ'a, materyal temininde büyük özveri ile çalışan Doç. Dr. Gülseren CİMŞİT'e, çalışmam boyunca her zaman destek, yardım ve dostlukları ile yanımda olan Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki asistan arkadaşlarım başta olmak üzere, tüm bölüm arkadaşlarıma, laboratuvar çalışmalarım da tecrübelerinden ve bilgisinden faydalandığım sevgili arkadaşım Ersan KALAY'a, maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme ve eşime sonsuz teşekkürler.

Ayrıca tez çalışmamı Prof. Dr. Asım ÖREM yönetimindeki 97. 114. 001.1 kodlu proje ile destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Meltem MALKOÇ

KISALTMALAR

AH	: Alzheimer Hastalığı
BH	: Behçet Hastalığı
Apo A	: Apolipoprotein A
Apo B	: Apolipoprotein B
Apo E	: Apolipoprotein E
TG	: Trigliserid
TK	: Total Kolesterol
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HDL-K	: HDL-Kolesterol
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LDL-K	: LDL-Kolesterol
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
IDL	: Orta Dansiteli Lipoprotein
ŞM	: Şilomikron
LCAT	: Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
CETP	: Kolesterol Ester Transfer Proteinini
LPL	: Lipoprotein Lipaz
Lp (a)	: Lipoprotein (a)
HLA	: Doku Antijeni
NIDDM	: İnsüline Bağlı Olmayan Diabetes Mellitus
IEF	: İzoelektrik Odaklama
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel Elektroforezi
ASO	: Allele spesifik oligonükleotid
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCP	: Single Strand Conformational Polymorphism
ARMS	: Amplification Refractory Mutation System
AACC	: American Association of Clinical Chemistry
PMN	: Polimorfo Nükleer Lökosit
ESH	: Eritrosit Sedimentasyon Hızı
BMI	: Vücut Kütle Oranı
SLE	: Sistemik Lupus Eritematosus
RA	: Romatoid Artrit

1. GİRİŞ

Behçet hastalığı, göz, cilt ve nörolojik belirtileri olan, mukokütanöz ülserler, artrit ve kardiyovasküler sistemi etkilemesi ile bilinen multisistem bozukluğudur. Behçet hastalığı, akut ataklar ve remisyon dönemleri ile karakterize kronik bir inflamasyon tablosu sergiler. Ayrıca Behçet hastalığında sık olmamakla birlikte, ailevi vakaların gözlenmesi, hastalığın pataogenezinde genetik faktörlerin rol oynayabileceğini gösteren en önemli bulgulardan biridir (1,2). Behçet hastalığının tanısını koyduracak spesifik bir laboratuvar testi yoktur. Kronik ve aktif inflamatuvar tablonun metabolizma üzerindeki etkilerinden birini yansıtan laboratuvar bulgularından lipid ve lipoprotein düzeylerinde değişiklik, Behçet hastalığında görülmektedir. Bu konuda çok fazla çalışma mevcut olmayıp, genel olarak total kolesterol, düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol (LDL-K) düzeyleri, Lipoprotein (a)[Lp (a)] ve apo B düzeylerinde artma, yüksek dansiteli lipoprotein-kolesterol (HDL-K) ve apo AI düzeyinde ise azalma görülmektedir (3,4).

Apo E, lipid metabolizmasında, özellikle de trigliseritten zengin lipoproteinlerin aterojenik kalıntılarının plazmadan uzaklaştırılmasında temel rolü olan bir glikoproteindir. Çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) bir komponenti ve argininden zengin apolipoprotein olarak tanımlanmıştır. Trigliseritten zengin lipoproteinler olarak bilinen şilomikron ve VLDL artıklarının plazmadan uzaklaştırılmasında apo E aracılık etmektedir (5,6). Apo E'nin reseptörlerle olan ilişkisinden dolayı lipoprotein metabolizmasında dolayısıyla plazma lipid düzeylerinde belirleyici bir rol oynadığı bilinmektedir. Erken koroner kalp hastalığının (KAH) 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 alleli vardır. Bu üç allel üçü homozigot ($\epsilon_{2/2}$, $\epsilon_{3/3}$, $\epsilon_{4/4}$), üçü de heterozigot ($\epsilon_{3/4}$, $\epsilon_{2/3}$, $\epsilon_{2/4}$) olmak üzere 6 farklı fenotip gösterir. Çevresel ve genetik faktörler göz önünde bulundurulmadığında, ϵ_3 alleli taşıyan bireylerde normal bir lipid metabolizması

gözlenirken ϵ_2 ve ϵ_4 alleli apo E izoformları farklılıklar görülmektedir (6,7). Üç major apo E alleli ve bunların protein ürünlerinin, plazma lipid parametreleri üzerine önemli etkilerinin bulunmasından yola çıkılarak, apo E polimorfizminin çeşitli hastalıklarla olan ilişkisi araştırılmıştır. Özellikle ateroskleroz da ϵ_2 allelinin koruyucu, ϵ_4 allelinin ise miyokard infarktüsü için bir risk grubu oluşturduğu tespit edilmiştir (8). Nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı (AH) ile ϵ_4 alleli arasında yakın ilişki olduğu, yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (9).

Behçet hastalığı etyopatolojisi bilinmeyen ve bir çok klinik ve laboratuvar bulguyla seyreden bir patolojik olaydır. Ailesel geçişe meyilli olması, nöro-Behçet tablosunun görülmesi ve genel hastalıkla ilgili olarak plazma lipid ve lipoprotein metabolizmasında değişikliklerin olması bizi apo E polimorfizminin bu hastalarda ortaya konulması gerekliliğine inandırmıştır. Mevcut literatür bilgilerin arasında bu konuda hiç bir bulguya rastlanmamıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Behçet Hastalığı Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1.Tarihçesi

Behçet hastalığı (BH) ilk kez 1937 yılında, İstanbul Üniversitesi Dermatoloji öğretim üyesi Prof. Dr. Hulusi Behçet tarafından, tekrarlayan oral ve genital aftöz ülserasyon ve iridosiklit gibi göz lezyonlarından oluşmuş üçlü semptom kompleksi gösteren yeni bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Yaklaşık 2450 yıl kadar önce Hipokrat'ın Behçet Hastalığına benzer klinik bulgulara sahip olguları tanımladığı bilinmektedir. Behçet'in tanımladığı üçlü semptom kompleksine uyan en gerçekçi örnekler 1908 de Bluth ile başlar. Planner ve Remenovsky (1923), Shigeta (1924), Adomantiadis (1931) ve Whitwell (1934) ile devam eder. Tüm bu otörler, BH'ın semptom komplekslerinin, olgularında rastlantısal olarak bir arada bulunduğunu düşünmüşler ve bu semptomların o güne dek tanımlanmamış bir hastalığa bağlı olduğu ayrımına varamamışlardır. Daha sonraları, BH'ın bu üçlü semptom kompleksinden ibaret olmadığı; vasküler, nörolojik, lokomotor, intestinal, ürogenital kardiyo-pulmoner semptomlarla daha yaygın ve kronik bir hastalık olduğu anlaşılmıştır (2,10).

2.1.2. Etyopatolojisi

Behçet Hastalığının olağan başlangıç yaşı 20-40 arasındadır. Çocukluk çağında nadir olarak rastlanır (olguların %1-2'si), 50 yaşın üstündekilerde hastalığın başlaması nadiren görülür. Erkek/kadın oranı yaklaşık olarak eşit olmakla birlikte, hastalık erkeklerde daha şiddetli olarak seyretmektedir (11).

BH'ın coğrafik dağılımı oldukça dikkat çekicidir. Hastalık Kuzey yarım kürede ve dikkat çekici şekilde tarihsel "İpek yolu" sınırı ülkelerde oldukça sık görülmektedir. Uzak

Doğu ve Orta Doğu ülkeleri, (Japonya, Çin, Kore, İran, Türkiye) hastalığın en sık görüldüğü ülkeler iken, Güney Avrupa ve Kuzey Afrika ülkelerinde (İtalya, Portekiz, Cezayir, Tunus, Fas) daha az sıklıkla görülmektedir. Japonya’da prevalans 7-8.5/100.000 olarak bildirilmektedir. Öte yandan bu ülkedeki körlüğün en önemli nedenlerinden birisidir. BH’nın Türkiye’deki sıklığı konusunda bir değer vermek zor olsa da, Yurdakul ve arkadaşları 5131 olguda yaptıkları bir alan çalışmasında, 19 Behçet bulgusu saptamış, 10 yaş üstündeki prevalans 37/10.000 olarak hesaplanmıştır (11). BH, bugün için; akut alevlenme ve iyilik dönemleri ile seyreden, çok değişik tipte, çapta ve lokalizasyonda damar tutulumları gösteren ancak günümüze kadar tipik bir histopatolojik özelliği tanımlanmayan bir vaskulit olarak kabul edilmektedir (12).

BH’ında gözlenen lezyonların ve damar biyopsi örneklerinin histolojik incelemelerinde, karışık (miks) bir hücre infiltrasyonunun olduğu, farklı lezyonlarda farklı hücrelerin rol oynayabildiği ve ayrıca lezyon yaşının hücre tipini etkileyebildiği söylenebilmektedir (2). Hastalık lezyonlarının incelenmesinden de anlaşılacağı gibi, hastalık seyrinde 3 aşama dikkat çekmektedir.

- İlk faz (preaktif, erken faz) :Tip IV immün yanıt (Hücre-aracılıklı immünite, gecikmiş aşırı duyarlılık yanıtı)
- İkinci faz :Tip III immün yanıt (immün kompleks)
- Üçüncü faz : Kronik organ yıkımı

Behçet hastaları arasında çok sık olmamakla birlikte ailevi vakaların gözlenmesi hastalığın patogenezinde genetik faktörlerin rol oynayabileceğini gösteren en önemli bulgulardan biridir. 1970’li yıllarda yapılan çalışmalarda majör histokompatibilite genlerinden bazılarının BH’a yakalanma riskini artırdığı yönünde veriler toplanmaya başlanmıştır (2).

2.1.3. Patogenezi

BH’ın temel fizyopatolojisinde immün komplekslerin yol açtığı bir immün kompleks vaskülit olduğu görüşü giderek artan bir önem kazanmaktadır. Özellikle hastalığın immünopatolojisi üzerinde çalışan araştırmacılar bütün sistemlerdeki ortak bulgunun bir vaskülit olduğunu savunmaktadırlar. Gürler ve arkadaşlarının yaptığı derleme ile Behçetli hastaların patogenezinde rol alabilecek faktörler toparlanmaya çalışılmıştır (13).

Behçet hastalığında immün komplekslerin gelişimine yol açan antijenin ne olduğu henüz belirlenememiştir. Hastalığın ortaya çıkışını muhtemelen bir dış etken indüklemektedir. Genetik yatkınlığı olan bireylerde çeşitli çevresel faktörlerin etkisiyle hücrel ve humoral immunitede meydana gelen bozukluklar ve bunun sonucunda efektör mekanizmalarla gelişen immunolojik inflamasyon, BH'nın patogenezinde sorumlu görülmektedir. Özellikle spesifik olarak lenfosit poliferasyonuna yol açan 65 kDa'lık ısı şoku proteinlerinin patogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (12). Ayrıca Behçet hastalığı patogenezinde önemli rol aldığı düşünülen artmış nötrofil aktivitesinde, genetik faktörlerle birlikte uyarılmış lenfomononükleer hücrelerden artmış veya kontrolsüz sitokin salınmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Behçet hastalarında ağız mukozası hücrelerine karşı antikorların yanısıra, antikardiolipin antikorları, antinötrofil sitoplazması antikorları ve anti-endotel hücresi antikorlarında artma gözlenmektedir. Genellikle bu antikorların hastalık aktivitesiyle ilişkili olduğu ve doku hasarına ikincil olarak geliştiği düşünülmektedir. Ayrıca hastalığın aktivitesi ile serum immün kompleks düzeyleri arasında ilgi olduğuna dikkat çekilmiş, Behçet hastalığının aktif döneminde serum immün kompleks düzeylerinde artma saptanırken serum kompleman düzeylerinde düşme kaydedilmiştir (14).

Hastalarda HLA haplotiplerinde yapılan çalışmalar HLA-B5 oranının yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Japon ve Türk hastalarında gözlenen HLA-B5 sıklığı herediter ve belki de bölgesel faktörlerin hastalık gelişmesinde rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Hastalığın ayrıca ailevi olduğuna dair örnekler de bilinmektedir (15).

Behçet Hastalığına ait Bulgu ve Semptomlar

1-Ağızda nüks : Aftlar; olguların % 100'unda mevcut olup % 70-80'ninde hastalığın ilk belirtisi olarak karşımıza çıkar. BH'da nükslü aftlar 3 tip olarak değerlendirilmektedir.

a) Minör aftlar: Olguların % 80'ninde minör tiptedir. 15-20 yaş grubu hastalarda daha çok görülmektedir. Lezyonlar yuvarlak veya oval olup, 10 mm çapa kadar genişlerler. Çevresi eritemli, ve ödemlidir. Aftlar 5-10 gün içinde skatris bırakmadan iyileşirler.

b) Majör aftlar : Lezyonlar 1-3 cm çapında olup, zemini nekrotik, derin ve son derece ağrılı aftlardır. Behçet'li olguların %10'unda görülür. Lezyonlar çoğunlukla dudak, yanak mukozası, dil, sert damak ve tonsillerde görülür. Yerlerinde skatris bırakarak iyileşirler.

c) Herpetiform aftlar, en çok damak, diş etleri ve dil sırtında lokalize olurlar. Behçet'li olguların % 10' unda bulgulara rastlanmaktadır. Kadın hastalarda daha çok görülür. 5-7 gün içinde aftlar iyileşirken hecmeler halinde yenileri gelişmektedir (16).

2-Deri lezyonları: Behçetli olguların % 84' ünde görülmektedir. Bunlar başlıca: eritema-nodozum'a benzer deri lezyonları, süperfisyonel thromboflebit, papülo-püstüller eripsiyonlar, afta benzer ekstrasjenital ülserasyonlar, derinin hiperirritabilitesi (Paterji testi).

Paterji testi; BH'nın tanısında kullanılan bir testtir. Olguların % 60-70 'inde bu test müspettir. Deri nonspesifik stimülasyona anormal hiperirritabilite göstermektedir. Hastaya intravenöz ve intradermal paterji testi yapıldıktan 48 saat sonra, test yerinde tüberkülin reaksiyonuna benzer eritem ve intifiltre aseptik püstül gelişir. Bu testin oluş mekanizması kesin olarak belli değildir. Aynı zamanda BH'nın aktivasyonunu değerlendirmede de kullanılır (17).

3-Göz bulguları : BH'ın % 50'sinde görülmektedir. Tipik semptomu iritis olup anterior ve posterior üveit gelişir. Bazı olgularda optik sinir atrofisine ikincil glokom ve katarakt oluşmaktadır (18).

4-Genital ülserler : BH'ın % 67'sinde görülür. Oral lezyonlara göre daha derindir. İyileştiklerinde ortası çökük, kenarı hafif kalkık ve keskin, depigmente skatrisler oluşur. Erkeklerde ülserlerin en çok görüldüğü bölge, skrotumun alt ve yan yüzleri, daha az olarak peniste, kadınlarda ise en çok vulva, labium majör, minör, serviks ve vajinadadır (19).

5-Artritik semptomlar : BH'ın % 50-60' ında artralji veya periferik artrit şeklinde görülür. Diz-ayak bileği, el bileği, dirsek en çok tutulan bölgelerdir. Tutulan eklem şiş, sıcak, ağrılı ve kısıtlı olmakla birlikte eklem üzerinde ve ciltte eritem yoktur (20).

6-Gastrointestinal semptomlar : BH'ın % 50' sinde görülür. Hastanın şikayeti kusma, karın ağrısı, diare ve konstipasyon şeklinde başlar, malabsorbsiyon hastalarda görülen başlıca bulgulardır (21).

7-Epididimit : BH'da nadir görülen bir özelliktir. Olguların % 4-8'inde izlenen bir semptom olup 1-2 hafta kadar devam eder (21).

8-Santral sinir sistemi bulguları : BH'ın takriben % 10'unda nörolojik bulgular gelişmektedir. Hastalarda motor ve sensorial sinirlere ait patolojik değişiklikler gelişmektedir. Motor değişikliklere daha sık rastlanır (21).

9-Böbrek tutulması : Böbrek tutulması nadir olmakla beraber, hastalarda alt ekstremitelerde, yüzde ödem ve idrarda albümin tespit edilmektedir (21).

10-Vasküler lezyonlar : BH'da vasküler lezyonlar, sıklıkla ven okluzyonu, anevrizma gelişimi ve arteryal okluzyon şeklindedir. Hastaların %20-40'ında yüzeysel tromboflebit ve/veya derin ven trombozu şeklinde ven tutulumuna rastlanır. Tıkanma en sık bacak venlerinde ve daha sonra venacava inferior ve superiorda görülmekle birlikte dural sinuslar, vena axillaris, vena brachialis, vena hepatica, vena porta gibi diğer venlerde tıkanabilir. Arter tutulumu, venöz tutulumu göre daha seyrek olmakla birlikte (%1-3,5) sonuçları daha ciddidir. En sık aorta, daha sonra sırası ile pulmoner arterler, femoral, popliteal, subklaviyan ve karotis arterler tutulur (12,21).

Tromboz gelişiminin etyopatolojisinde rol oynayan çeşitli faktörler vardır. Bunlardan en önemlisi endotel fonksiyon bozukluğu ve koagülasyon sistem bozukluklarıdır. Endotel fonksiyon bozuklukları, doku plazminojen aktivatörü (t-PA) sentezi ve salınımının eksikliğine ve muhtemelen endoteliyal heparin benzeri aktivite eksikliğine yol açan immunolojik mekanizmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda BH'da t-PA'nın endotel hücreleri tarafından üretiminin azaldığı plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1)'nin arttığı bulunmuştur. Ayrıca, tromboz oluşumunda protein S ve protein C'nin düşük seviyelerinde sorumlu tutulmuştur. Koagülasyon sistem bozukluklarından azalmış fibrinolizisin trombotik olaylara indirekt olarak etkili olduğu düşünülmektedir. Apo (a)'nın plazminojene olan benzerliğinden dolayı, Lp (a)'nın antifibrinolitik etkili olabileceği ileri sürülmüştür. Yüksek plazma Lp (a) seviyesinin artmış tromboz riskine yol açabileceği ileri sürülmüştür (3,4).

BH'da kronik aktif inflamatuvar tablonun bir özelliği de bu hastalarda lipid metabolizmasında gözlenen değişikliklerdir. Genel bir değişim olarak lipid parametreleri aterojenik bir yapı kazanmaktadır (22).

2.2. Lipoproteinler Hakkında Genel Bilgi

2.2.1. Lipoproteinlerin Genel Sınıflandırılması ve Yapıları

Lipidler kanda lipoprotein adı verilen, suda çözünebilen makromolekül kompleksleri halinde taşınırlar. Lipoproteinler, lipidlerin kanda çözünebilir lipid ve protein kompleksleri halinde taşınması için bir araç görevi üstlenir. Bu lipidler arasında başlıca trigliserid, serbest ve ester kolesterol ve fosfolipidler bulunmaktadır. Çeşitli lipoproteinlerin yapısında apolipoprotein adı verilen yaklaşık on değişik protein

bulunmaktadır. Apolipoproteinler A, B, C gibi harflerle adlandırılırlar (23). Apolipoproteinler (Apo), lipoprotein metabolizmasında: enzim kofaktörü olarak, lipid transfer proteinleri gibi davranarak ve dokularda lipoprotein reseptörleri ile ilişkide ligand olarak önemli fonksiyonlar görürler. Lipoproteinlerin yüzeyinde apolipoproteinlerin yer alması bu lipoproteinlerin metabolik akibetini belirlemektedir. Dolayısıyla lipoprotein metabolizmasını ve lipid anomalileri ile ilişkili hastalıkları anlayabilmek için her apolipoproteinin lipid metabolizmasının düzenlenmesindeki rolünü dikkatle incelemek gerekmektedir. Lipoproteinlerin genel yapısı, hidrofobik lipidlerin (trigliserid ve ester kolesterol) bir çoğunu kapsayan bir çekirdek ile protein, serbest kolesterol ve fosfolipidlerden oluşan bir yüzey tabakasından meydana gelen küresel bir partikül şeklindedir (24).

Lipid taşınmasında çeşitli roller üstlenen başlıca 6 lipoprotein sınıfı bulunmaktadır. Bu sınıflandırma lipoproteinlerin yoğunlukları (dansite) göz önüne alınarak yapılmıştır. Lipoproteinlerin dansitesi, boyutları ile ters bir ilişki göstermektedir. Artan dansitelere göre lipoproteinler; şilomikronlar (ŞM), çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL), ara dansiteli lipoproteinler (IDL), düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) olarak sınıflandırılmaktadır. Lipoprotein(a) [Lp(a)], son 30 yıl içinde tanımlanmış ve diğer lipoproteinlerden yapısal ve fonksiyonel farklılık gösteren bir lipoproteindir. Plazma lipoproteinlerinin sentez edildiği başlıca yerler arasında bağırsak ve karaciğer bulunmaktadır (25).

2.2.2. Apolipoproteinler

Lipoproteinlerin protein kısmına apolipoprotein (apo) denir. Apolipoproteinler, lipoproteinlerin metabolizmasında önemli görevlere sahiptirler. Çeşitli apolipoproteinler mevcuttur (26).

Apo A-I, HDL'nin esas proteinidir. Ayrıca şilomikronlarda da bulunur. Apo A-I, karaciğerde ve bağırsakta sentezlenir. Lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) için kofaktördür ve kolesterolün ters taşınımında görevi vardır. Hücrelerden kolesterol alınmasını kolaylaştırdığı *in vitro* deneylerle saptanmıştır. HDL'deki diğer ana apolipoprotein, apo A-II dir. Fizyolojik görevi bilinmemesine rağmen fazla miktarda lipid bağlama kapasitesine sahip olduğu saptanmıştır. Apo IV ise esas olarak HDL ve şilomikronlarda, ayrıca serbest apolipoprotein olarak da plazmada bulunur. Apo A-IV'ün

sentezi karaciğer ve barsakta yapılmaktadır. LCAT aktivatörü olarak görev yaptığı ve kolesterol ters taşınımında fonksiyonu olduğu düşünülmektedir (23).

Apo B LDL'nin esas apolipoproteinidir. VLDL ve şilomikronlarda bulunur. Apolipoprotein B'nin iki alt grubu vardır. Karaciğerde sentezlenen apo B100, VLDL, IDL ve LDL'de bulunur. Apo B-48 ise bağırsakta sentezlenir ve şilomikronlarda bulunur. Apolipoproteinlerin sentezinde oluşan bozukluk, çeşitli lipid metabolizması hastalıklarına neden olur. Abetalipoproteinemide, apo B, genetik bir bozukluk nedeni ile sentez edilemez. Apo B'nin esas görevi, LDL reseptörleri için tanımlayıcı ligand olmasıdır. Bu görevi sayesinde periferik dokulardaki kolesterol metabolizmasında önemli bir role sahiptir (27).

Apo C HDL'nin esas proteinidir. Sentezi karaciğerde yapılır. Apo C'lerden sadece apo CII' nin görevi kesin bilinmektedir. Apo CII, lipoprotein lipaz (LPL) enziminin aktivatörüdür (23).

Apo D, ester kolesterol transfer kompleksinin (CETP) bir parçasıdır ve ester kolesterol moleküllerinin HDL'den diğer lipoproteinlere aktarımında görev alır (28).

Apo E ise, şilomikronlarda, şilomikron bakiyelerinde, VLDL'de ve HDL'de bulunur. Karaciğer, beyin dahil periferik dokularda sentezlenir. Apo E, şilomikron bakiye reseptörleri ve LDL reseptörleri için tanımlayıcıdır ve ters kolesterol taşınmasında naklinde görev alır. (29).

2.3. Apo E Hakkında Genel Bilgiler

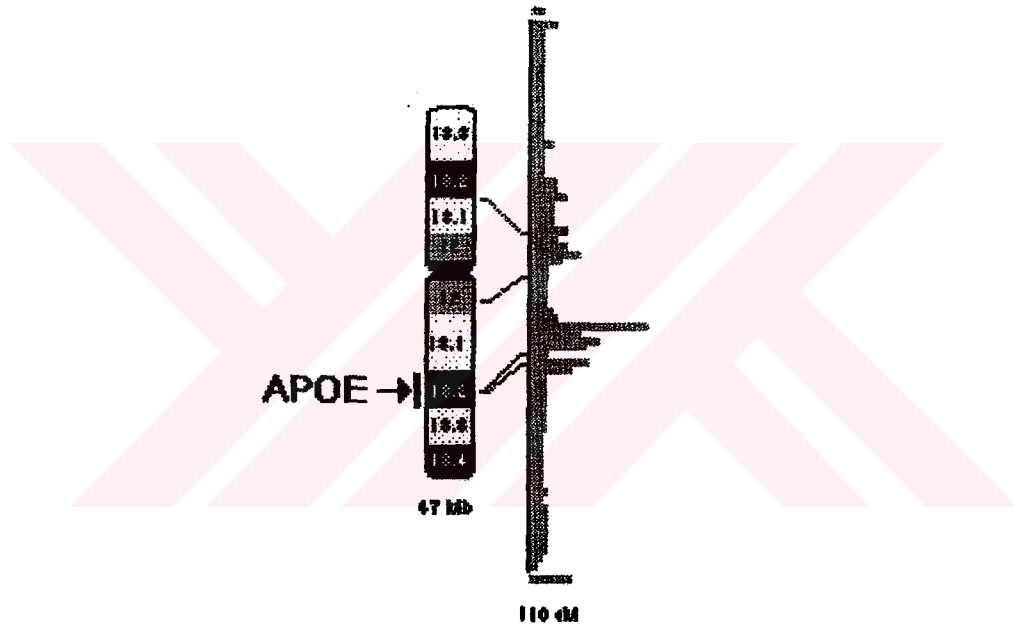
Apo E, lipid metabolizmasında, özellikle de trigliseridten zengin lipoproteinlerin aterojenik kalıntılarının plazmadan uzaklaştırılmasında temel rolü olan bir glikoproteindir. Diyetle alınan ve karaciğerde sentezlenen lipidlerin plazmada transportu sırasıyla, şilomikron ve VLDL ile yapılmaktadır. Apo E, bu lipoprotein kalıntılarının plazmadan uzaklaştırılmasında ligand olarak fonksiyon görmektedir. Periferik dokulardan karaciğere kolesterol transportunda görev alan HDL'nin, periferik dokularda kolesterol içeriğinin artmasında apo E'nin belirleyici rolü olduğu deneysel olarak gösterilmiştir. Ayrıca, apo E içeren HDL, LDL reseptörüne bağlanarak plazmadan uzaklaştırılabilmektedir (30,31).

İlk olarak 1973 yılında Shore ve arkadaşları tarafından VLDL'den izole edilerek, direkt amino asit dizisinin tanımlanmasıyla primer yapısı ortaya çıkmıştır (32). Bu araştırmacılar tarafından "argininden zengin apolipoprotein" olarak tanımlanmıştır. Daha

sonra Uterman ve arkadaşları, tip III hiperlipoproteinemili hastalarda erken kronik kalp hastalığının gelişmesi ile apo E polimorfizmi arasında bağlantı kurmuşlardır (33). Bu dönemde yapılan çalışmalar protein düzeyinde gerçekleştirilirken, Mc Lean ve arkadaşları apo E mRNA'sından cDNA nükleik asit dizisini belirlemişlerdir (34). Apo E'nin yirmi yıldan daha uzun süredir ateroskleroz ile olan ilgisi bilinmesine karşın, Alzheimer hastalığı ve yaşlanma ile olan ilgisinin saptanmasından dolayı 1993'den sonra araştırmaların yoğunlaştığı bir konu haline gelmiştir (35-37).

2.3.1. Apo E'nin Yapısı

Apo E geni 19. Kromozomun uzun kolu üzerinde lokalize olup apo AI, apo AII, apo CI, apo CII, apo CIII ve insülin genlerine oldukça yakındır. LDL reseptörü geni bu kromozomun kısa kolundadır (38). (Şekil 1).

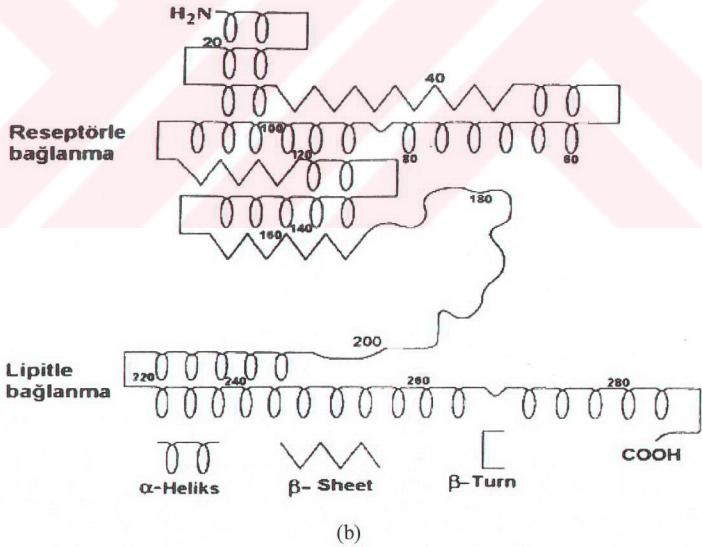
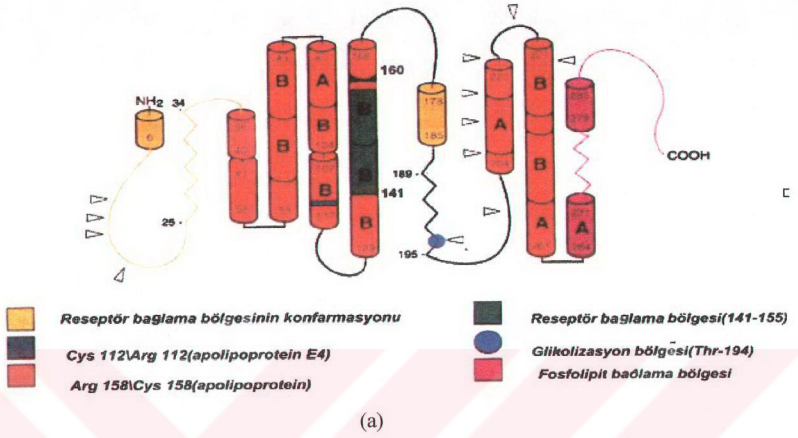


Şekil 1. Kromozom 19'un gösterimi

Plazma Apo E'si 299 amino asitlik, molekül ağırlığı 34200 dalton olan arginince zengin bir glikoproteindir. Apo E gen organizasyonu, apoB geni hariç diğer apolipoprotein genleri ile benzeşmektedir. Apo E'nin sekonder protein yapısı, %62 α -heliks, %9 β -tabaka, %11 β -kırmalı tabaka, %18 gelişigüzel katlanmalardan oluşur. Apo E'nin amfipatik α heliks yapısı muhtemelen lipidlerin bağlanmasından sorumludur (39). Dört ekson ve üç introndan oluşan genden 1163 nükleotidlik mRNA sentezlenmektedir. Benzer intron ve

eksonların yapısı ve benzer sekansların tekrarlayan elemanlarının varlığı güçlü bir şekilde apolipoprotein genlerinin ortak bir orjinden köken aldığı kavramını destekler. Burada ortaya çıkan primer translasyon ürününden, 18 amino asitten oluşan sinyal peptidin ko-translasyonel olarak uzaklaştırılması ile 299 amino asitlik olgun apo E proteini oluşmaktadır (40). Bu proteinin amino ucunda globüler bir bölge, 130. ve 150. amino asitler arasında reseptöre bağlanma bölümü (kristal yapının 4. Heliksi), proteaza duyarlı bir bölgesi, 194. rezidüde bir glikozillenme alanı (treonin), karboksi ucunda da lipid bağlayan bir bölümü (216-299) vardır (Şekil 2). En yüksek düzeyde reseptöre bağlanma etkinliği için 1-184. amino asitler gereklidir. 112. ve 158. amino asitlerdeki değişiklik apo E'nin polimorfizminden sorumludur. Yapılan çalışmalar sonucunda reseptöre bağlanma bölgesinin bazik amino asitlerden oluştuğu ve bağlanmanın iyonik etkileşimle olduğu saptanmıştır. Bu bölgedeki bazik amino asitlerin nötral amino asitlerle yer değiştirmesi sonucunda reseptöre ilgi azalmaktadır (41-43).

Apo E proteini sinyal peptidi, protein sentezledikten sonra uzaklaştırılır ve Apo E glikozillenir. Doku kültürlerinde Apo E ilk olarak sialik asid içeren şekilde salgılanır. Buna rağmen plazmadaki Apo E'nin yalnız %10'u sialik asid içerir. Muhtemelen ApoE'den sialik asid bir sialidaz enzimi ile tam olarak uzaklaştırılır. Bu glikolizasyonun ve asetillenmenin mekanizması tam olarak bilinmemektedir (5,44).



Şekil 2. (a) ve (b) Apo E'nin sekonder yapısı

2.3.2. Apo E'nin Fonksiyonları

Apo E'nin normal plazma düzeyi 3-25mg/dl'dir. Plazma apo E miktarının 2/3 kadarı karaciğer kaynaklıdır. Ayrıca vücutta, dalak, böbrek, adrenaller, keratinositler, gonodlar, beyin, makrofajlar ve astrositik glia gibi farklı doku ve hücrelerde sentezlenir (45,46). Apo E'nin mRNA düzeyinde en yüksek olduğu ikinci organ beyindir. Beyinde apo E sentezinden sorumlu olan asıl hücre astrositlerdir ve beyin omurilik sıvısının (BOS) majör apolipoproteinini oluşturmaktadır (47).

Apo E barsaktan sentezlenen şilomikron ve karaciğerden sentezlenen VLDL'nin yapı taşı olarak plazmada dolaşır. Ayrıca kolesterolce zengin HDL'nin alt sınıfında, apo E-HDL içerenlerde (HDL-1=HDL-E)de bulunur. Periferik dokulardan karaciğere kolesterol transportunda görev alan HDL'ler makrofajlar gibi kolesterol ile yüklü hücrelerden interstisiyel sıvıya salınan kolesterolü yapılarına alırlar. Bunlar fosfolipidten 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 kazanılmasıyla deneysel olarak HDL'lerin kolesterol içeriğinin daha da arttığı gösterilmiştir. Yine deneysel olarak, apo E içeren bu HDL'lerin LDL reseptörlerine bağlanmasında apo E'nin aracılık ettiği sonucu çıkarılmıştır (48). Çok az miktarda LDL'nin yapısında da apo E bulunmaktadır. HDL kolesterolü hücrelerden alarak ya karaciğere yada kolesterole gereksinim duyan diğer hücrelere taşırlar. Bu işlem ters kolesterol taşınımı olarak adlandırılır (49). Apo E, serbest veya ester kolesterolün metabolizmasında ve transportunda gerek santral gerekse periferik sinir sistemine kolesterolün taşınmasında önemli rol oynar. Apo E iki lipoprotein reseptörü için bir ligand gibi görev görür. Bu reseptörler LDL (veya apoB/E) ve karaciğer apo E reseptörü (veya LDL reseptörü ile ilişkili protein LRP/ α 2-makroglobulin reseptörü) dür. Bu reseptörler için ligand görevi gördüğünden, plazma lipoproteinlerinin metabolizma sonucunu belirlemede kritik bir rol oynar. Dolayısıyla, kolesterol metabolizmasında önemli görevi vardır. Buna ek olarak, kolesterolün, proliferasyon ve onarım işlevine giren hücrelere taşınmasına katıldığı sanılmaktadır. Ayrıca apo E'nin lenfosit yanıtının modülasyonu ve düz kas hücresi proliferasyonu ile yakından ilişkisi olabilir (50-52).

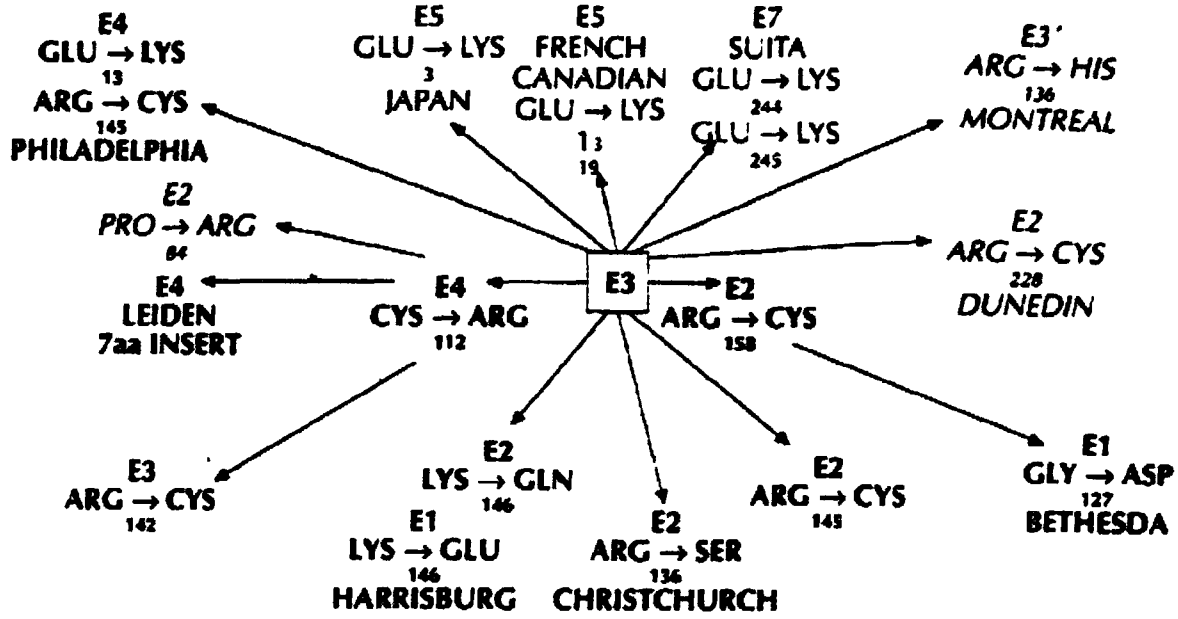
2.3.3. Apo E Polimorfizmi ve Lipoprotein Metabolizmasıyla İlişkisi

Apo E'nin polimorfik yapısı ilk olarak 1970'lerde tanımlanmıştır. İnsan Apo E gen yapısı polimorfiktir. Üç yaygın aleli (ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4) vardır. Bu üç alelin altı farklı fenotipi tayin edilmiştir. Üçü homozigot ($\epsilon_{2/2}$, $\epsilon_{3/3}$, $\epsilon_{4/4}$), üçü heterozigot ($\epsilon_{4/3}$, $\epsilon_{3/2}$, $\epsilon_{4/2}$) dur. Bu alellerin fenotipik gösterimi $E_{4/4}$, $E_{3/3}$, $E_{2/2}$, $E_{4/3}$, $E_{3/2}$ ve $E_{4/2}$ şeklindedir. Bu üç izoformun en yaygın olanı $E_{3/3}$ fenotipidir. Çeşitli toplumlarda bu alellerin görünme sıklığı $\epsilon_2 \sim 0.0073$; $\epsilon_3 \sim 0.783$; $\epsilon_4 \sim 0.1434$ dir (53). Apo E polimorfizminin moleküler temeli 112. ve 158. amino asitlerin sistein-arginin değişimine dayanır. Apo E_2 'de 112. ve 158. amino asit sisteindir ve net yük (0) dır. Apo E_4 'de 112. ve 158. amino asit arginindir ve net yük (+2) dir. Apo E_3 'de 112. amino asit sistein, 158. amino asit arginindir net yük (+1) dir (Tablo 1).

Tablo 1. Apo E alelinin amino asit değişimi ve molekülün net yükü ile ilişkisi

Allel	Amino asit değişikliği		Kodon Değişikliği		Net Yük
	112	158	112	158	
ϵ_2	SİSTEİN	SİSTEİN	TGC	TGC	0
ϵ_3	SİSTEİN	ARGİNİN	TGC	CGC	+
ϵ_4	ARGİNİN	ARGİNİN	CGC	CGC	++

Bu özelliklerinden dolayı Apo E alelleri LDL reseptörleri için farklı afinite gösterirler. Apo E'nin bilinen başka mutantları da vardır (Şekil 3). Bu aleller elektrik yükünü değiştirerek farklı elektroforez hareketleri gösteren E_7 (54), E_5 (55), E_1 (56) dir. Elektrik yükündeki değişiklik ancak yüksek çözümleme gücüne sahip yöntemlerle belirlenebilir (57). Bir mutasyon, apo E'nin net elektrik yükünü değiştirerek varyant proteinin normal izoformla birlikte hareket etmesine yol açabilir. Reseptöre bağlanma bölgesindeki amino asit farklılıkları, iyonik etkileşimi değiştirdiğinden, reseptöre olan ilgi de değişmektedir. 1992 yılında yapılan bir çalışmada apo E_5 ve apo E_7 mutantlarının farklı afinite ile LDL reseptörlerine bağlandığı gösterilmiştir. Apo E_5 , reseptöre afinitesi apo E_3 'e göre iki katıdır. Apo E_7 ise apo E_2 'ye benzer etki göstermiştir. Bu sonuçlara göre Apo E_5 'in hiperkolesterolemi ve ateroskleroz için bir risk oluşturduğu bulunmuştur (58).



Şekil 3. Apo E'nin Mutantları

2.3.4. Apo E polimorfizminin Plazma Lipid Düzeylerine Etkisi

Bir çok populasyon çalışmasında apo E alellerinin plazma lipid konsantrasyonları üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Özellikle ϵ_4 alellerinin sağlıklı kişilerde plazma total kolesterolü artırdığı ve nisbeten ateroskleroza yatkınlık sağladığı gösterilmiştir. Tersine ϵ_2 alelinin, ϵ_4 'e göre plazma total kolesterolünde iki-üç kat azaltıcı etki gösterdiği belirlenmiştir. Sonuçta apo E polimorfizminin plazma total kolesterol düzeyi üzerinde % 8'e varan bir değişiklik etkisine sahip olduğu vurgulanmıştır. Apo E polimorfizminin bu etkisi çeşitli reseptörlere, apo E izoformunun farklı afinite göstermesinden kaynaklanmaktadır (59).

Apo E₄ izoformunu içeren şilomikron ve VLDL kalıntılarının reseptöre bağlanma aktivitesinin yüksek olduğu ve karaciğer tarafından daha hızlı hücre içine alındığı bilinmektedir. Ayrıca apoE'nin aracılık ettiği VLDL kalıntılarının LDL'ye dönüşüm hızını artırmaktadır. Karaciğere kolesterol transportu ve LDL oluşum hızındaki artma, LDL reseptör sentezini baskılamakta (down-regülasyon) ve sonuç olarak da LDL düzeyi daha yüksek olurken, şilomikron ve VLDL kalıntılarının düzeyi daha düşük olmaktadır (60).

Apo E₂ allelini içeren şilomikron ve VLDL kalıntılarının reseptöre bağlanma aktivitelerinin düşük olması nedeniyle katabolizmalarının daha yavaş olduğu bilinmektedir. E₄ alelinin tersine, E₂ allelini içeren VLDL'lerin LDL'ye dönüşüm hızları

daha yavaştır. Karaciğere azalmış kolesterol transportu ve LDL oluşum hızındaki azalma, LDL reseptör sentezini uyarır (up-regülasyon). E₂ alleleline sahip bireylerde daha düşük LDL düzeyleri bulunurken şilomikron ve VLDL kalıntılarının düzeyleri daha yüksek olur. Dolayısıyla artmış plazma trigliserid düzeyleriyle birliktedir. E₂ alleli düşük apo B düzeyi, E₄ alleli ise yüksek apo B düzeyi ile birliktedir (60,61).

Apo E polimorfizminin total apo B düzeyindeki değişikliklere %12 katkısı vardır. Plazma HDL ve apo AI konsantrasyonları üzerine apo E polimorfizminin aşikar bir etkisi gösterilmemiştir. Apo E genotipinin, plazma apo E konsantrasyonu üzerine önemli etkisi vardır. ε₂ yüksek ε₄ ise düşük apo E konsantrasyonu ile birliktedir (62,63).

Apo E'nin, kolesterolün taşınmasında ve lipoprotein partiküllerindeki rolüne ilaveten insanlarda bir çok fonksiyonu vardır. Örneğin İmmünoregülasyon, sinir rejenerasyonu ve bir çok lipolitik enzimlerin aktivasyonunu (hepatik lipaz, lipoprotein lipaz, LCAT) artırır. Apo E₂, apo E₃ ile karşılaştırıldığında hepatik lipaz aktivitesi ve lipoprotein lipaz aktivitesi üzerine daha az etkidir (64).

Apo E'nin fizyolojik sonuçlarını özetlersek;

1-LDL (ApoB/E) ve apo E (LRP) reseptörleri için ligand görevi görür.

2-Apo E, VLDL, şilomikronlar, şilomikron kalıntıları gibi trigliseridlerce zengin lipoproteinlerin temizlenmesinde aracı bir anahtar gibidir. Ayrıca VLDL'nin LDL'ye dönüşmesinde de rol oynar. Apo E'nin dolaşımında apo E içeren HDL'nin ayrılmasından sorumlu olduğu tespit edilmiştir.

3-Apo E, lipoproteinler için kolesterol ester transfer proteinin (CETP) afinitesini artırır. HDL aracılıklı ters kolesterol transportunun düzenlenmesine yardım eder.

4-Makrofajlardan salgılanan apo E, çöpçü reseptörler vasıtasıyla okside-VLDL'nin alınımını inhibe eder ve makrofajların köpük hücrelerine dönüşmesini engeller. Bundan dolayı makrofajlardan salgılanan apo E ilave bir yol olarak ters kolesterol taşınımını sağlar.

5-Apo E sinir rejenerasyonu ile ilgilidir (İmmun cevabın hafifleşmesi, düz kas hücrelerinin ve nöronun farklılaşması ve /veya büyümesi gibi).

2.3.5. Apo E'nin Klinik Önemi

Apo E polimorfizminin çeşitli hastalıklarla olan ilişkisi araştırılmıştır. En çok araştırılan hastalıklardan biri Alzheimer hastalığı(AH) olup apo E₄ allel frekansının sıklığı tespit edilmiştir (9,36,37). Schachter ve ark. 1994'de ilk olarak yüz yaşını aşanlarda E₂

allel sıklığını tespit etmişlerdir (65). Bu son belirleme uzun ömürlülük ile sağlık arasındaki ilişkiye önemli bir açıklama getirmiştir. Hipertrigliseridemili hastalarda da apo E izoformları belirlenmiş ve E₃ ve E₄ alelleri sıklıkla gözlenmiştir (66). Kardiyovasküler hastalarda apo E polimorfizminin belirlenmesi ateroskleroza yatkınlığın ortaya konulmasında önemli bir genetik risk faktörü olarak değerlendirilmektedir (39,52).

Menzel ve arkadaşları (35) ε₂ alellinin koroner ateroskleroz gelişiminde koruyucu rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ayrıca bir çok klinik çalışma ile ε₄ alellinin yaşıyan miyokard enfarktüsli kişilerde ve anjiyografik bulgulara göre bir risk grubunu oluşturduğu tespit edilmiştir. Apo E 4/3 heterozigot fenotipinin E 3/2 ve E 3/3 fenotipine göre erken miyokard infarktli kişilerde daha yaygın olduğu görülmüştür (8,39,52).

Eto ve arkadaşları (67), ε₂ alellinin NIDDM'li hastalarda tip III ve V hiperlipidemiyle, ε₄ alellinin ise tip IIb ve V hiperlipidemiyle ilişkisini göstermiş ve her iki alelin hipertrigliseridemi dolayısıyla ateroskleroz gelişimine meyilli olduğunu vurgulamıştır.

Günümüzde apo ε₄ allel sıklığının AH'da 3-4 kat belirgin arttığı yapılan bir çok çalışma ile ortaya konulmuştur. Astrositlerde artmış apo E yapımının olması ve apo E'nin amiloid plaktaki amiloid öncül protein Aβ'e olan afinitesi gelişen patolojik olayda temel bozukluk olarak vurgulanmıştır (68,69). Apo E'nin AH'daki bu spesifik rolü ortaya konulduktan sonra, diğer nörodejeneratif hastalıklarda da apo E alleli incelenmiştir.

Aterosklerozun kronik arterlerde görülme mekanizmasıyla, serebral arterlerdeki aynı temele dayandığından, ε₄ allel sıklığı serebrovasküler olaylarda da tespit edilmiştir. Ayrıca vasküler hasarlar, Kortikal Lewy body hastalığında da ε₄ allel sıklığının arttığı tespit edilmiştir (70). Buna rağmen, Creutzfeldt-Jakob hastalığı (68), ailesel amiloidik polinöropati (69), Down sendromu (71), amiotrofik lateral sklerozis (72), Huntington hastalığı ve Parkinson hastalığında (73) ε₄ allel sıklığında önemli bir artış gözlenmemiştir.

Behçet hastalığı patolojisi bilinmeyen ve bir çok klinik bulguyla seyreden bir patolojik olaydır. Ailesel genetik olarak meyilli olması, Nöro-Behçet tablosunun görülmesi ve genel hastalıkla ilgili olarak plazma lipid ve lipoprotein metabolizmasında değişikliklerin olması bizi apo E polimorfizminin bu hastalarda ortaya konulması gerekliliğine inandırmıştır. Günümüzde bu ilişkiyi gösteren bir literatür çalışmasına rastlayamadık.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar, Aletler ve Malzemeler

Otoklav (Kermanlar)
37°C inkübatör (NÜVE 500)
Mikrosantrifüj (Eppendorf 5810)
Manyetik karıştırıcı (IKA Labortechnik)
Hassas terazi (MP-300, Elektronik Balance, Chyo)
Derin dondurucu (-85° Cultra/sw Freezer, NUAIRE)
Buz makinesi (Scotsman AF-10)
pH metre (Hanna Instruments 8416)
Mikrodalga fırın (Beko 1550)
Sıcak bloklar (hot dry block)
Su banyosu (BM 402, Nüve)
Karıştırıcı (Autovortex Mixer SA2)
Çalkalayıcı (Thermolyne Type 65800)
Güç kaynağı (E C 105)
Elektroforez tankı (OWL)
UV ilüminatör (Vilber Loutmat)
Polaroid kamera (Poloroid Gel Cam)
PAGE aparatı (Embi Tec)
Termocycle (Techne)
Spektrofotometre (Shimadzu UV-1601)
Otoanalizör (Hitachi 917, Behring BN II)
Deiyonize su cihazı (Burnstead)
Cam, plastik ve eppendorf tüpler, çeşitli cam malzemeler,

3.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler

Adı	Firma	Ürün Kodu
Proteinaz K	SIGMA	P0390
Deoksi Adenin Trifosfat (dATP)	PROMEGA	U1330
Deoksi Sitozin Trifosfat (dCTP)	PROMEGA	U1330
Deoksi Guanozin Trifosfat (dGTP)	PROMEGA	U1330
Deoksi Timidin Trifosfat (dTTP)	PROMEGA	U1330
Taq Polimeraz	PROMEGA	M1861
Primerler (TRB1 ve TRB2)	GENEMED	20046248
Afl III Restriksiyon Enzimi	ROCHE	1209183
Hae II Restriksiyon Enzimi	BOEHRINGER	693910
pUC 19 DNA/MspI (HpaII) Marker	MBI	SM0221
Agaroz	SIGMA	A-6877
Etidyum Bromür	SIGMA	83H3634
Tris baz	SIGMA	58H5423
Sodyum klorür	MERCK	K837600
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	SIGMA	115F-0004
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	MERCK	822050
Absolut etanol	TEKEL	
%70 etanol	TEKEL	
Akrilamid	SIGMA	107H0273
N-N-metil bisakrilamid	SIGMA	88H0478
N,N,N,'N' tetrametilen diamin (TEMED)	SIGMA	T9281
Amonyumpersulfat (APS)	SIGMA	127H10601
Ksilen siyanol	SIGMA	75H3728
Bromfenol mavisi	MERCK	L961422
Asetik asit	MERCK	R10-35

3.1.3. Kullanılan Primerler

Apolipoprotein E'ye spesifik Zivelin ve ark. (74) tarafından tanımlanan her biri 23bp olan oligomerler kullanıldı.

TRB1; 5' TCC AAG GAG CTG CAG GCG GCG CA 3'

TRB2; 5 'GCC CCG GCC TGG TAC ACT GCC A 3'

3.2. Metodlar

3.2.1. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması

KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Dermatoloji ABD'na 1998-2000 döneminde başvuran çeşitli yaş ve cinsiyette 30 Behçet hastası çalışmaya alındı. Çalışmaya alınan hastaların klinik değerlendirilmesi sırasında bir kısmının aktif dönemde iken, bir kısmı da inaktif dönemde olduğu belirlendi. Hastanede sağlık kontrolünden geçen kontrol grubunun anemnez, fizik muayene ve rutin klinik laboratuvar incelemeleri sonucu hiçbir patolojik bulgu tespit edilemedi. Kan örnekleri bir gecelik (12 saat) açlık dönemini takiben, brakial venden alındı. Kan hücre sayımı, eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), DNA izolasyonu için antikoagülanlı (1mg/mL EDTA) vakumlu tüpler, total kolesterol (TK), trigliserid (TG), HDL-Kolesterol (HDL-K), LDL-Kolesterol (LDL-K), apo AI, apo B, apo E için ise antikoagülantsız vakumlu tüpler kullanıldı. 20 dakikalık oda sıcaklığında inkübasyonu takiben 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmalar elde edildi. Günlük rutin analizler dışında kullanılacak örnekler -85°C'de saklandı. DNA izolasyonu ise en geç bir hafta içinde yapıldı.

3.2.2. Lipid Parametrelerinin Tayini

Total kolesterol, trigliserid, HDL-K, LDL-K tayinleri Hitachi 917 analizöründe, Roche kitleri kullanılarak yapıldı. Trigliserid ve kolesterol tayini için enzimatik-kolorimetrik yöntemler kullanıldı. HDL-K tayini için dekstran sülfat ile presipitasyondan sonra enzimatik kolesterol tayin yöntemi kullanıldı. LDL-K düzeyi Friedewald formülüne göre hesaplandı.

$$\text{LDL-K} = (\text{Total kolesterol}) - (\text{TG}/5 + \text{HDL-K})$$

Apo E, apo AI ve apo B tayini monoklonal immunopresipitasyon metoduna göre nefelometrik olarak yapıldı. Bu amaçla Dade Behring (BNII) nefelometrisi ve orijinal kitler kullanıldı. Tüm analizler günlük kalite kontrol çalışmalarını takiben yapıldı.

Lökosit sayımları otomatik kan sayım cihazında yapıldı (STKS,Coulter). Eritrosit sedimentasyon hızı klasik Westergren metoduyla bir saatlik olarak belirlendi.

3.2.3. Tam Kandan DNA Eldesi

Prensibi: Tam kandan DNA eldesi yüksek tuz konsantrasyonunda gerçekleştirildi (salting-out). Tam kandan eritrositler hipotonik bir ortamda patlatıldıktan sonra santrifüj edilerek lökositler ayrıştırıldı. Sodyum klorür-tris-EDTA (STE) çözeltisi ile lökosit pelleti süspanse edildi. Sodyum dodesil sülfat (SDS) ve proteinaz K eklenerek, hücre zarlarının ve proteinlerin hidrolizi gerçekleştirildi. Bir gece inkübasyondan sonra protein ve hücre artıkları yüksek tuz konsantrasyonunda çöktürüldü. Saflaştırılan DNA etanolde çöktürülerek, genomik DNA elde edildi (75).

Çözeltiler:

1. Nuclei Lizis tamponu (STE): 400 mM NaCl, 10 mM Tris, 2 mM Na₂EDTA (pH:8.2) sterilizasyondan sonra 4°C'de saklandı.
2. %10 SDS Çözeltisi (pH 7.2): Whatman filtreden süzöldükten sonra oda sıcaklığında saklandı.
3. Proteinaz K Çözeltisi: 10 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı. -20°C'de saklandı.
4. Amonyum Asetat: 9 M hazırlandı. Whatman kağıdı ile süzöldü. 4°C'de saklandı.
5. Tris-EDTA (TE) Tamponu: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA hazırlandı ve sterilizasyon yapıldı.
6. Yükleme Tamponu (loading buffer): % 50 Sukroz, % 0.1 bromfenol mavisi, % 0.1 ksilen siyanol, 50 mM EDTA (pH:8.0)
7. 10X'lik TAE tamponu (yürütme tamponu): 2 M Tris baz, % 5.7 glasiyal asetik asit, 100 mM Na₂EDTA-2.H₂O (pH:8.5). Elektroforezde 1X'lik kullanıldı.
8. Etidyum bromid (0,5 µg/ml)

Yöntem

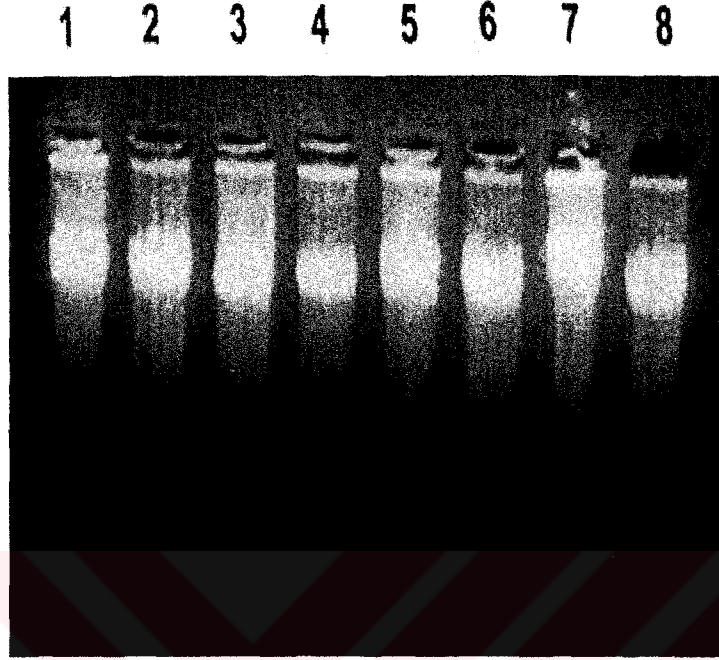
1. 10 mL kan 50 mL'lik tüpe alındı ve üzerine 40 mL soğuk steril distile su ilave edildi.
2. 2-3 dakika hızlı olarak çalkalandı.
3. 15 dakika 2500 rpm'de oda sıcaklığında santrifüj edildi.
4. Süpernatant atılıp pelletin üzerine 30 mL soğuk distile su ilave edildi ve pellet yıkandı.
5. 15 dakika 2500 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant yavaş ve dikkatli bir şekilde dökülüldü.
6. Pellet üzerine 3 mL nuclei lizis tamponu eklendi ve hücreler vortex ile resüspanse edildi.
7. 200 µL %10 SDS, 150 µL proteinaz K ilave edildi (en son SDS ilave edilerek, köpürmemesine dikkat edilir).
8. Tüp aşağı yukarı hafifce alt-üst edilerek bir gece 37°C etüvde inkübe edildi.
9. 1 mL amonyum asetat ilave edilip 30 saniye hızlıca çalkalandı.
10. Oda sıcaklığında 15 dakika bırakıldı ve iki katı oranında 4°C'de bulunan absöü etanol eklendi. Dikkatli olarak alt-üst edilerek DNA toplandı.
11. Toplanan DNA pipet ucu ile ependorf tüpe aktarıldı ve % 70'lik etanolde 2 dakika santrifüj edilerek yıkandı.
12. DNA, pelleti üzerine 250 µL TE çözeltisi eklenerek oda ısısında bir gece inkübe edildi.

DNA pelleti üzerine TE çözeltisi eklenerek, 37°C'de bir gece inkübe edildi. DNA tamamen çözölünce 20 µl'si 980 µl saf suyla karıştırıldı. 260 nm'deki absorbans ölçölerek, konsantrasyonu hesaplandı.

$$\mu\text{g/ml konsantrasyon} = \text{OD}_{260} \times \text{sulandırma katsayısı} (50) \times 50$$

DNA'nın 260 ve 280 nm'deki absorbansı da ölçölerek $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ oranından verimi hesaplandı. Optik dansitenin 1.8'e yakın olması saflık açısından iyi değeriendirildi. Metodun hassasiyetinden dolayı izolasyon sonunda birbirine yakın saflıkta DNA'lar elde edildi. Bundan dolayı TE'de çözölünen DNA'lardan direkt 10 µl alındı ve yükleme tamponu ile karıştırıldı. % 0.8'lik agaroz jelle yüklendi ve 60 volt akımda TAE elektroforez tamponunda bir saat yürütölüldü. Jel etidyum bromid ile boyandı. DNA UV

kromozomal DNA'ların konsantrasyonlarına göre PCR reaksiyonunda kullanılmak üzere 100-200 ng/ μ l olacak şekilde dilüsyonları hazırlandı.



Resim 1: İzole edilen insan kromozomal DNA'ların %0.8 'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

3.2.4. PCR ile Apo E Geninin Amplifikasyonu

Prensip: Genomik DNA'nın çoğaltılmak istenen bölgesinin iki ucuna özgü, bu bölgedeki DNA dizisine komplementer, bir çift sentetik primer kullanılarak, o bölgenin enzimatik olarak çoğaltılması esasına dayanır. İlk aşamada, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısıda birbirinden ayrılması sağlanır (Denaturasyon). İkinci aşamada, sıcaklık düşürülerek, primerlerin kendilerine komplementer olan DNA dizilerine bağlanması sağlanır (Annealing). Son aşamada ise taq polimeraz enzimi ortamda bulunan deoksi nükleotit trifosfatları (dNTP) kullanarak DNA zincirlerinin sentezini gerçekleştirir (Extension). Bu işlem 25-30 kez tekrarlandığında, istenilen bölge yaklaşık bir milyon kez çoğaltılmış olur (74).

Çözeltiler

1. 10 X Taq Polimeraz Tamponu
 - 100 mM Tris-HCl (pH 9.0)
 - 500 mM KCl
 - %1 Triton X-100
2. 10 mM dNTP karışımı:
 - 100 mM dTTP
 - 100 mM dCTP
 - 100 mM dGTP
 - 100 mM dATP'en hazırlandı.
3. 25 mM MgCl₂
4. Primer karışımı (6 µM)
5. Taq DNA Polimeraz (5 U/µl)
6. %50'lik dimetil sülfoksit (DMSO)

3.2.5. Amplifikasyon Koşulları

PCR reaksiyonu toplam 50 µl hacimlerde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı; 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl₂, 0.36 µM her bir primerden, 400 µM her bir deoksinükleotit trifosfattan (dNTP), 1U Taq polimeraz, %50'lik DMSO ve deiyonize sudan oluşan reaksiyon karışımı buz üzerinde hazırlandı.

20 reaksiyonluk ana karışım (master mix) şu şekilde hazırlandı.

10X Taq DNA polimeraz	100µl
MgCl ₂ (25mM)	60µl
dNTP (10mM)	40µl
TRB1 + TRB2 (6µM)	60µl
Distile su	436µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	4µl
DMSO	100µl

Buz üzerinde 250 µl kapasiteli PCR tüplerine bu ana karışımdan 40 µl bölüştürüldü ve her bir tüpe 100-200 ng/µl konsantrasyonda hazırlanan 10 µl kromozomal DNA ilave edildi. Negatif kontrol olarak steril distile su kullanıldı. Örnekler termocycle'a yerleştirilerek amplifikasyon gerçekleştirildi.

3.2.6.PCR Programı

94°C’de 1 siklus 5 dakika ön denaturasyon yapıldı.

94°C’de 1 dakika denatürasyon

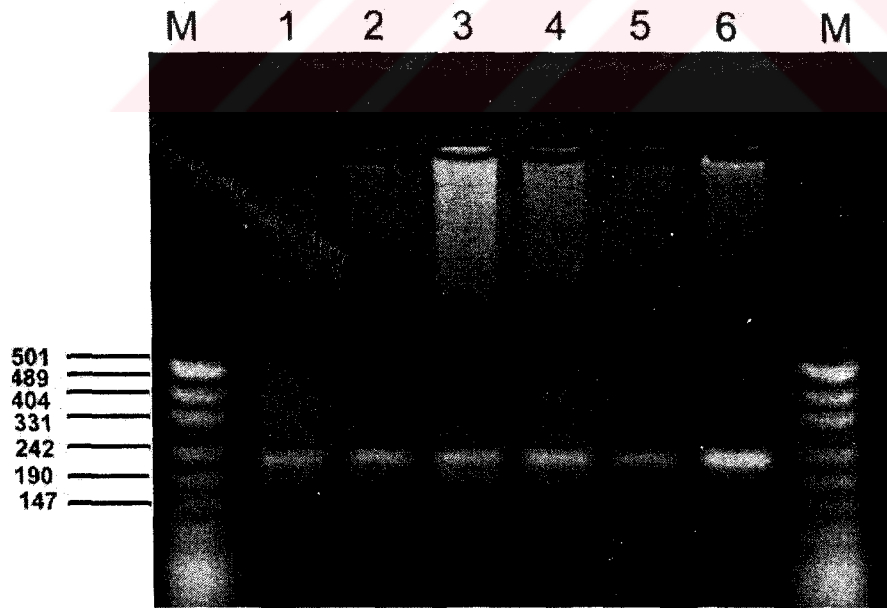
55°C’de 1 dakika yapışma (annealing)

70°C’de 1.5dakika uzama (extension) olmak üzere 40 siklus olarak

gerçekleştirildi. Tamamlanmamış zincirlerin polimerizasyonu için 70°C’de 5 dak daha bekletildi ve cihaz açılıncaya kadar 4°C’de bekletildi.

3.2.7. Amplifikasyon Kontrolü

Restriksiyon tipleme yöntemi için enzimle kesme aşamasından önce amplifikasyon kontrolünün yapılması gerekmektedir. Bu amaçla PCR ürününden 10-20 µl alınarak %2’lik agaroz jelde yürütüldü. PCR ürünü 218 bp büyüklüğündedir. Bu üründen 10 µl alarak yükleme tamponu ile karıştırıldı ve jele yüklenerek 60 voltta 30 dakika yürütüldü. Ultraviyole lamba altında ürünler kontrol edildi (resim 2).



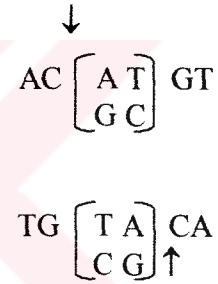
Resim 2: Apo E ’nin amplifikasyon kontrolü. M; Moleküler ağırlık standartı puC19 DNA / MspI (HpaII) kullanıldı.

3.2.8. Restriksiyon Tipleme Yöntemi (RFLP) ile Apo E Genotipinin Belirlenmesi

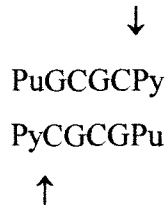
Prensip: Restriksiyon enzimleri, kendileri için özgün baz dizilimlerini tanıyıp, bu bölgeden çift sarmallı DNA'ları keserek, farklı uzunlukta DNA parçacıklarının oluşumuna neden olurlar. Bir restriksiyon enzimi, aynı DNA dizisine sahip farklı örneklerde, aynı uzunlukta DNA parçacıklarının oluşumunu gerçekleştirir. Ancak, DNA dizisindeki bir mutasyon, restriksiyon enzime özgü tanıma bölgesinde değişikliğe neden oluyorsa, bu durumda farklı uzunlukta DNA parçacıkları oluşacaktır. Apo E geninin, polimorfik yörelerini içeren 218 bp'lik dizisinin amplifikasyon ile çoğalmasından sonra, Afl III ve Hae II restriksiyon enzimleri ile inkübasyonu, polimorfik bölgelerdeki farklı baz dizilimi nedeniyle, farklı uzunluklarda DNA parçacıklarının oluşumuyla sonuçlanacaktır (74).

Çözeltiler:

1. Afl III restriksiyon enziminin özgün kesim noktası:



2. Hae II restriksiyon enziminin özgün kesim noktası:



3. Hae II tamponu; (Cat. No. 693910)

33 mM Tris asetat

66 mM K asetat

10 mM Mg asetat

0.5 mM Dithiotheitol (pH 7.9)

Yöntem: Amplifikasyon kontrolünden sonra, her örnek için aşağıdaki gibi pipetleme yapıldı.

Amplifikasyon ürünü	26 μ l
Afl III (5U/ μ l)	0.5 μ l
Hae II (5U/ μ l)	0.5 μ l
Hae II tamponu	3 μ l
TOPLAM	30 μl

PCR ürünleri 37°C'de 4 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra oluşan DNA parçacıklarının görüntülenmesi aşamasına geçildi.

3.2.9. Poliakrilamid (PAGE) Elektroforezi

Prensip: Elektriksel alanda poliakrilamid jel üzerine aplike edilen DNA'ların katotdan anoda doğru göç etmesi esasına dayanır. Örneklerin yanına uygun baz çiftine sahip DNA marker kullanılması ile de belirli uzaklıklara yürümüş olan DNA bantlarının moleküler ağırlığı saptanabilir.

Çözeltiler:

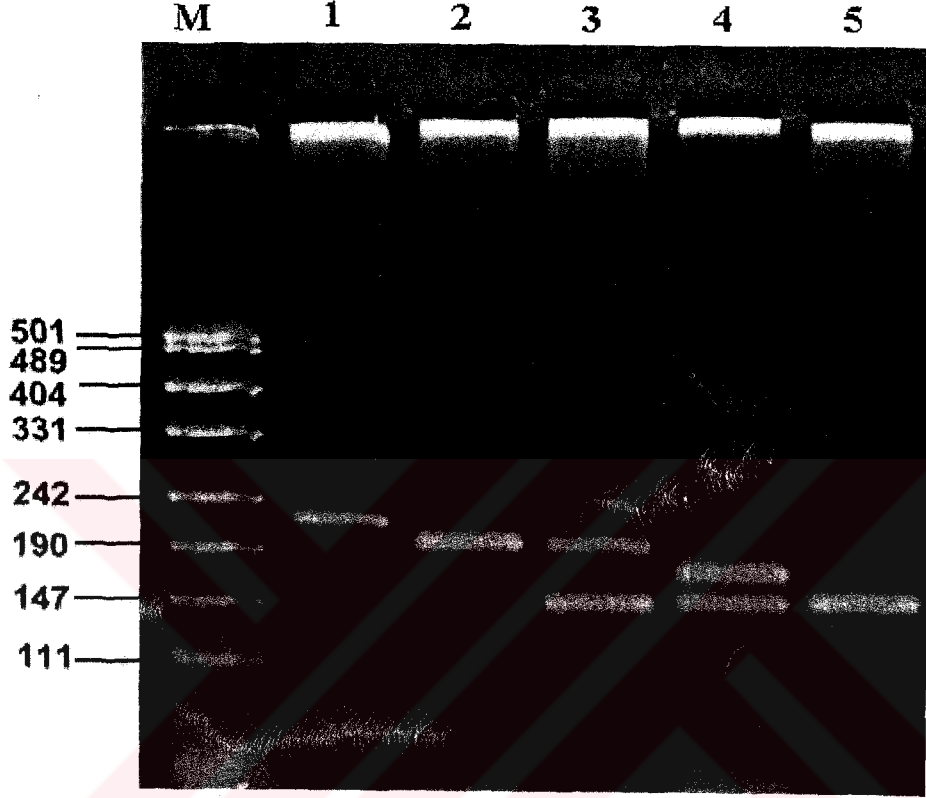
1. (% 40) Akrilamid:Bisakrikamid: (29:1) oranında hazırlandı.
2. TEMED
3. % 10 APS:Günlük hazırlandı.
4. 1X Yürütme tamponu

Yöntem: % 7.5'luk jel aşağıdaki gibi hazırlandı.

Jel (%)	% 40 Akrilamid (ml)	TEMED(μ l)	% 10 APS(μ l)	1 X Yürütme tamponu (ml)
7.5	4.5	24	240	19.2

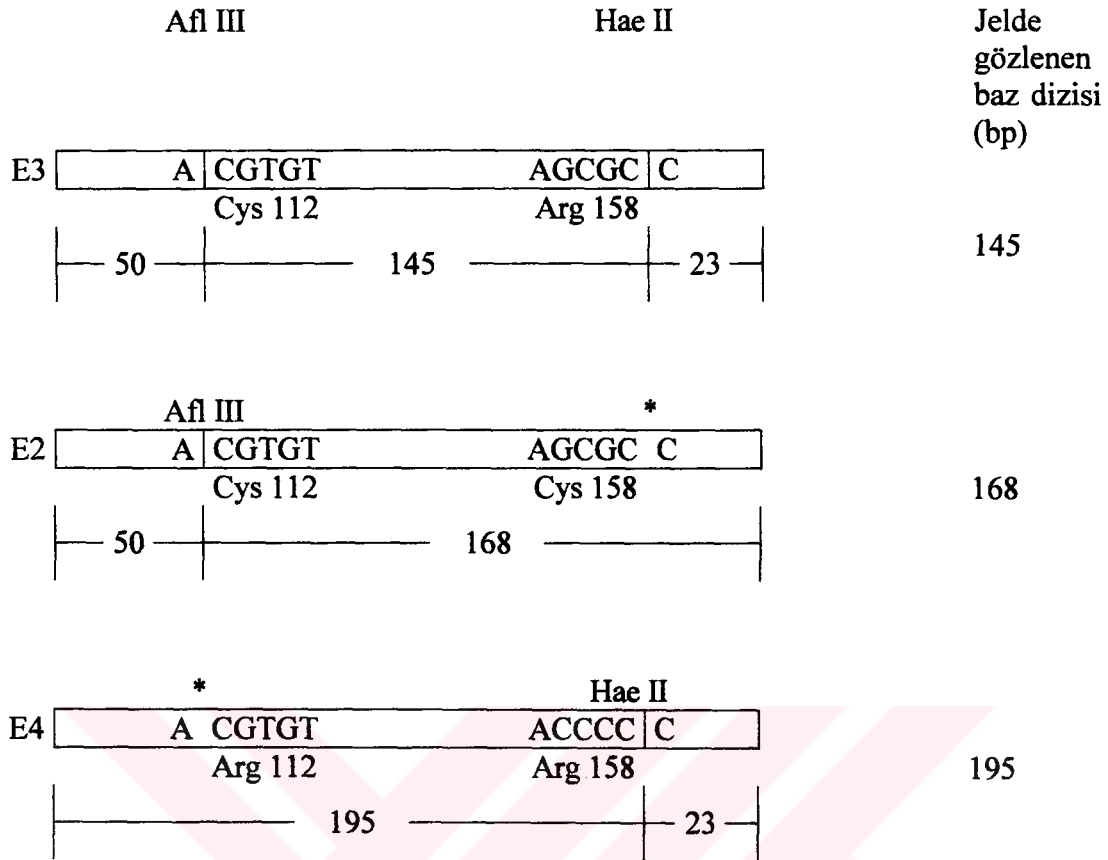
Homojen olarak hazırlanan bu jel yavaşca cam plakalar arasına bir enjektör yardımı ile döküldü. Uygun bir tarak koyularak polimerize olması beklendi. Polimerize olan jel, 1X'lik yürütme tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi ve tarak çıkarıldı. Enzimle muamele edilen ürünler inkübasyon sonrası 3 μ l yükleme tamponu ile karıştırılıp 65°C'de 10 dakika bekletilerek reaksiyon durduruldu. Afl III ve Hae II restriksiyon enzimleriyle kesilmiş her örnekten 15 μ l alınarak kuyucuklara yerleştirildi. Ayrıca uygun

bir marker da kuyucuklardan birine konuldu. Aplikasyon tamamlandığında elektroforez işlemi başlatıldı. 50 V akımda bir saat yürütüldü. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel dikkatli bir şekilde etidyum bromür içeren bir kaba alındı. Çalkalayıcıda 10 dakika boyandı. Daha sonra 10 dakika su içinde bekletilerek jelin artık boyalardan temizlenmesi sağlandı. UV ışık altında bantlar görüntülenerek apo E genotipi belirlendi (resim 3).



Resim 3: Apo E'nin restriksiyon enzimleri ile kesim sonuçlarının gösterilmesi. M; Moleküler Ağırlık Standartı, 1; 218 (bp) ürün, 2; E 4/4 genotipini, 3; E3/4 genotipini, 4; E 2/3 genotipini, 5; E 3/3 genotipini göstermektedir.

Afl III ve HaeII restriksiyon enzimiyle apo E geninin ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4 , alellerinin restriksiyon haritası Şekil 4'de verilmektedir (74).



Şekil 4. Afl III ve Hae II restriksiyon enzimiyle apo E geninin ϵ_2 , ϵ_3 ve ϵ_4 allellerinin restriksiyon haritası.

3.2.10. İstatistiksel Analizler

Bütün değerler aritmetik ortalama ve standart sapma olarak ifade edildi. Grupların normal dağılım uygunluğu Kolmogorov- Smirnov testi ile değerlendirildi. Bağımsız iki grubun karşılaştırılması unpaired two-tailed (eşleşmemiş iki yönlü) student t testi ile yapıldı. Apo E fenotiplerinin dağılım sıklığındaki farklılık χ^2 -testi ile değerlendirildi. Parametreler arasındaki ilişki Spearman testi ile incelendi. Farklı apo E fenotipindeki lipoprotein değerleri arasındaki farklılık none-parametrik Kruskal-Wallis testi ile incelendi. $P < 0.05$ düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı alındı.

4. BULGULAR

Behçet hastaları ile sağlıklı kontrol grubu yaş, cins ve vücut kütle indeksi açısından anlamlılık göstermedi (Tablo 2).

Tablo 2. Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna ait demografik bulgular

	Behçet hastaları	Kontrol grubu
N	30	51
Yaş,yıl	38±8,6	35±7,7
Cins(E/K)	18/12	29/22
BMI	25,0±3,8	23,8±3,3

BMI: Body mass index (Vücut Kütle Oranı, kg/m²)

Hasta ve kontrol grubuna ait serum lipid, lipoprotein, apolipoprotein, ESH ve lökosit düzeyleri tablo 3’de görülmektedir. Behçet hastalarında serum total kolesterol, LDL-K, apo B düzeyi ve ESH kontrol grubuna göre anlamlı yüksek gözlenirken, diğer parametreler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi.

Tablo 3. Behçet hastaları ve sağlıklı kişilerde biyokimyasal parametreler

	Behçet hastaları X±SD	Kontrol grubu X±SD	P
Apo A (mg/dL)	120±22	129±18,7	0,600
Apo B (mg/dL)	91±22	78±21,0	0,009
Apo E (mg/dL)	3,7±0,7	3,9±0,9	0,312
Total kolesterol (mg/dL)	200±41	178±28	0,005
Trigliserid (mg/dL)	133±51	114±45	0,078
HDL-K (mg/dL)	45±8,2	47±8,5	0,302
LDL-K (mg/dL)	128±38	111±32	0,030
Lökosit (10 ³ /µL)	8,1±4,8	6,0±2,0	0,067
ESH (mm/h)	18,6±17,4	7,5±5,3	0.000

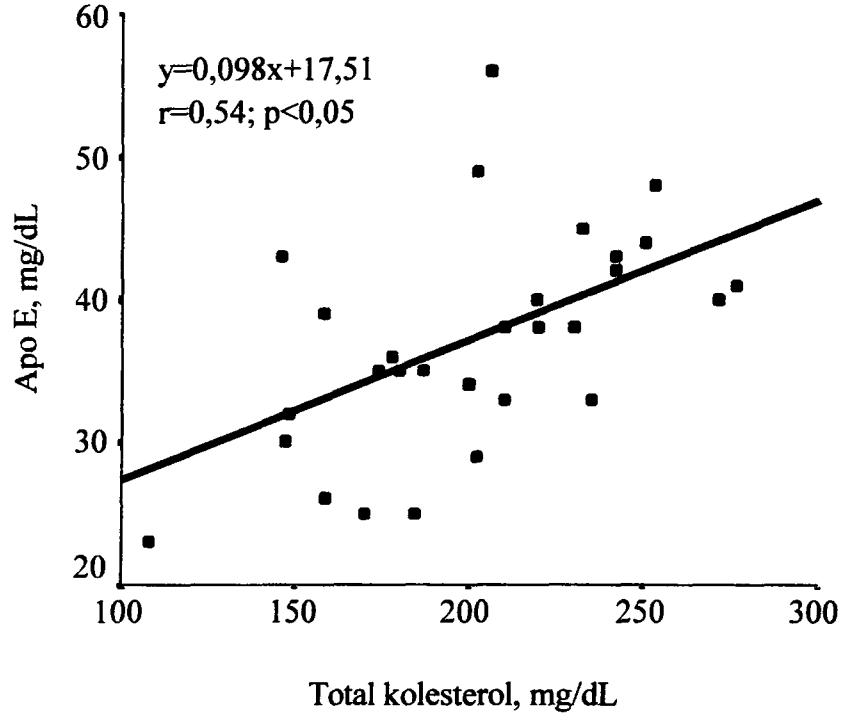
Her iki çalışma grubunda elde edilen lipid, lipoprotein ve apolipoproteinler arasındaki ilişkiler tablo 4’de görülmektedir.

Tablo 4. Hasta ve Kontrol grubuna ait lipid, lipoprotein ve apolipoprotein parametreleri arasındaki anlamlı ilişkiler: r(P)

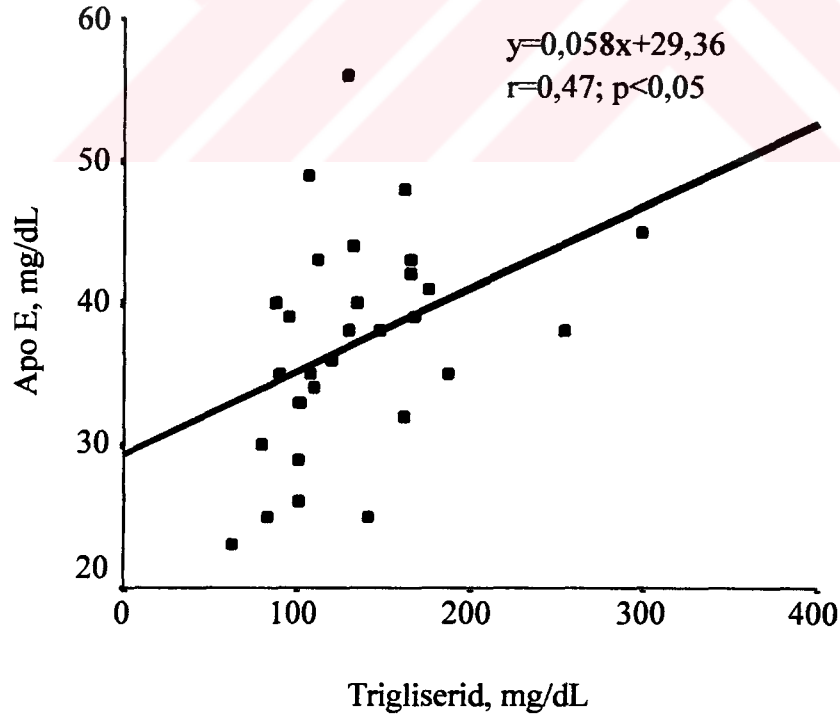
Hasta grubu				
	Apo E	Apo B	Apo AI	Total kolesterol
Total kolesterol	0,54 (0,002)	0,68 (0,001)	-	-
Trigliserid	0,47 (0,008)	0,47 (0,009)	-	-
LDL-K	0,48 (0,007)	0,62 (0,001)	-	0,94 (0,001)
HDL-K	-	-	0,65 (0,001)	-
Apo B	0,53 (0,002)	-	-	-
Kontrol grubu				
Total kolesterol	0,44 (0,001)	0,48 (0,001)	-	-
Trigliserid	-	0,37 (0,007)	-0,31 (0,026)	-
LDL-K	0,31 (0,025)	0,53 (0,001)	-	0,31 (0,025)
Apo B	-	-	-0,30 (0,031)	-

Behçet hastalarında apo E düzeyi, total kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, ve apo B düzeyleri ile anlamlı korelasyon göstermiştir. Ayrıca total kolesterol ve LDL-kolesterol ile apo B arasında ve HDL-kolesterol ile apo AI arasında da anlamlı ilişkiler tespit edilmiştir.

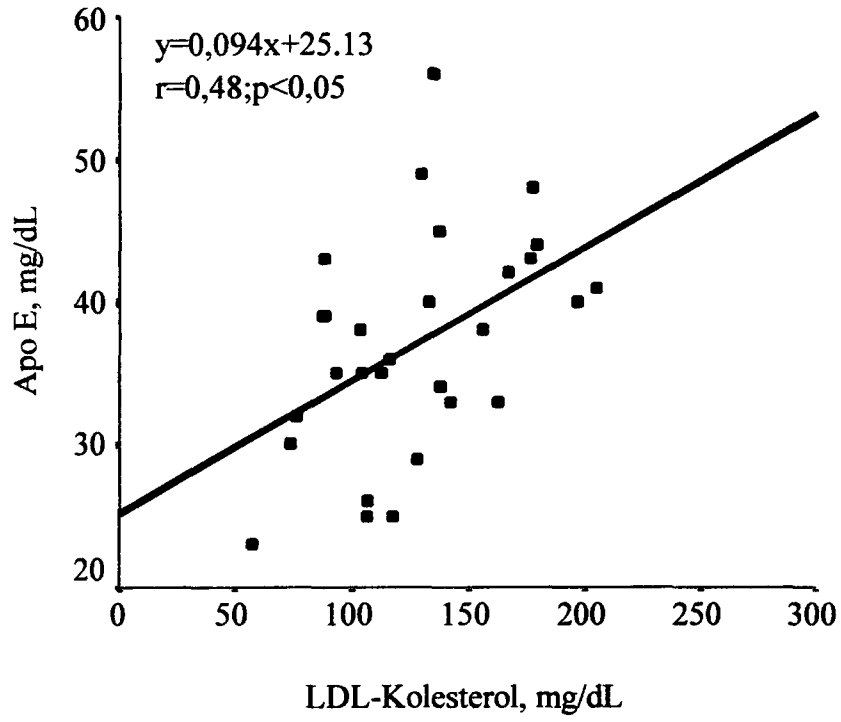
Kontrol grubunda ise apo E, total kolesterol ve LDL-K ile hasta grubuna göre daha zayıf bir ilişki göstermektedir. Diğer parametreler arasındaki ilişkiler daha zayıf olmakla birlikte hasta grubundakine benzemektedir. Apo E’nin hasta grubunda total kolesterol, trigliserid, LDL-K, ve Apo B ile olan ilişkisi şekil 5, 6, 7 ve 8’de görülmektedir. Kontrol grubunda ise Apo E’nin total kolesterol ve LDL-K ile olan ilişkisi şekil 9 ve 10’da görülmektedir.



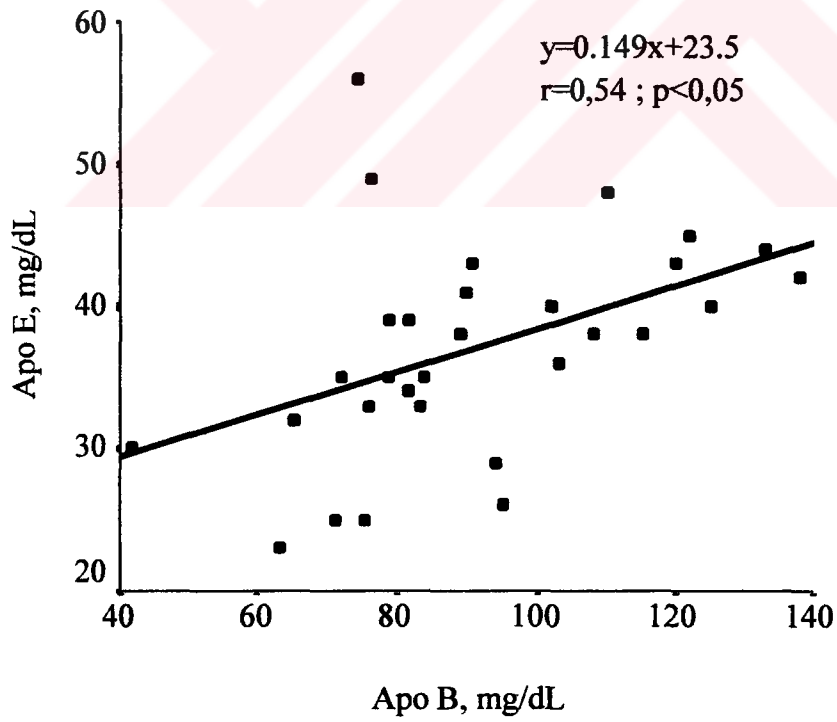
Şekil 5. Behçet hastalarında Apo E ile Total kolesterol arasındaki ilişki



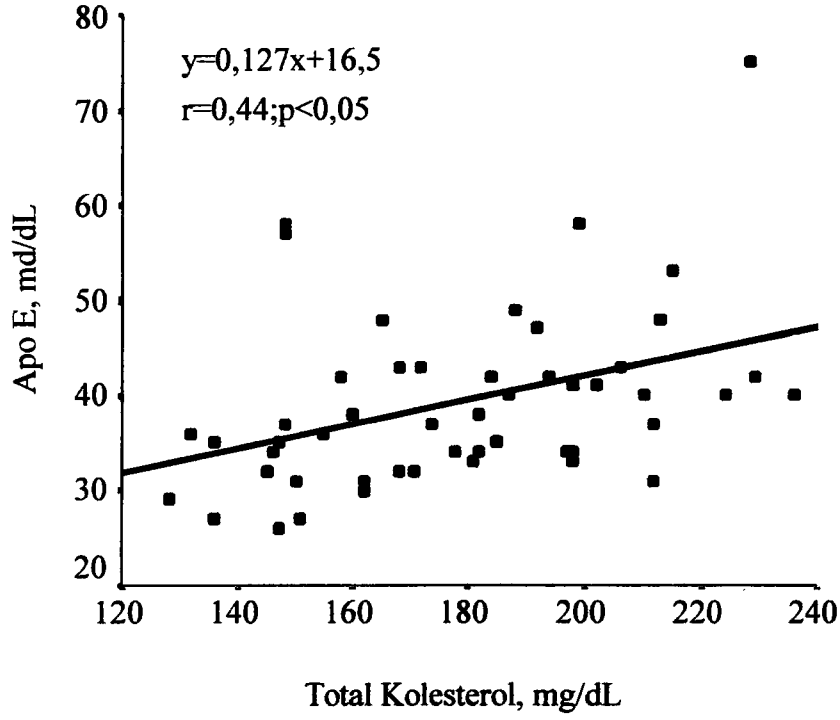
Şekil 6. Behçet hastalarında Apo E ile Trigliserid arasındaki ilişki



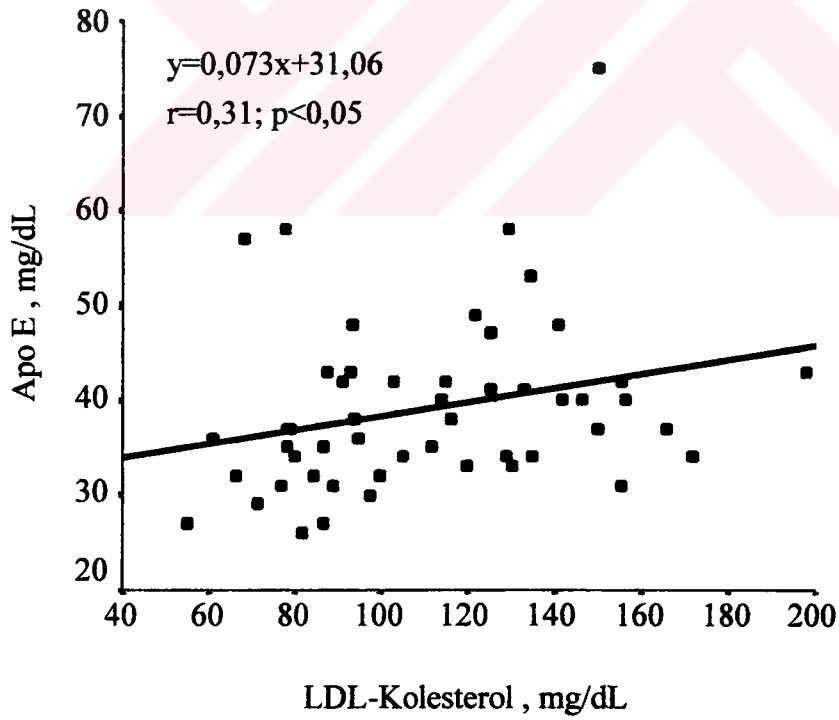
Şekil 7. Behçet hastalarında Apo E ile LDL-K arasındaki ilişki



Şekil 8. Behçet hasralarında Apo E ile Apo B arasındaki ilişki



Şekil 9. Kontrol grubunda Apo E ile total kolesterol arasındaki ilişki



Şekil 10. Kontrol grubunda Apo E ile LDL-K arasındaki ilişki

Behçet hastaları ve kontrol grubuna ait allel sıklığı ve fenotip dağılımı tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 5. Behçet hastalığında ve sağlıklı kontrol grubunda Apo E fenotipi ve alel sıklığı

Fenotip	Behçet hastalığı		Kontrol grubu	
	n=30	Görülme sıklığı (%)	n=51	Görülme sıklığı (%)
E3/3	15	50	29	56,9
E3/4	8	26.7	13	25,5
E2/3	6	20	9	17,6
E4/4	1	3.3	-	-
Alel sıklığı				
ϵ_2		10		8,8
ϵ_3		73.3		78.4
ϵ_4		16.7		12.4

Gerek hasta grubunda gerekse kontrol grubunda E_{3/3} fenotipi sırayla % 50 ve % 56.9 ile en yüksek oranda gözlemlendi. ϵ_3 allel sıklığı ise hastalarda 73.3, kontrol grubunda ise 78.4 oranında gözlemlendi. Hasta grubunda bir kişide E_{4/4} fenotipi gözlenirken sağlıklı kontrollerde E₄ fenotipi gözlenmedi. E_{2/2} ve E_{2/4} fenotipleri her iki grupta da tespit edilmedi. Her iki grup fenotipik dağılım sıklığı açısından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark gözlenmedi. ($\chi^2=1.930$, df=3). Her iki grubun lipid ve lipoprotein değerleri tespit edilen fenotiplere göre incelendiğinde tablo 6 ve 7’deki değerler elde edildi.

Tablo 6.Behçet hastalarının fenotipi ile lipid parametrelerinin karşılaştırılması

	E3/3 (n=15)	E3/4 (n=8)	E2/3 (n=6)	E4/4 (n=1)	P
Apo E (mg/dL)	3,6±0,7	3,9±0,8	3,7±0,5	2,5	0,46
Apo A (mg/dL)	121±27,9	124±16,2	118±8,7	91	0,41
Apo B (mg/dL)	92±20,2	93±15,0	90±37,5	75	0,75
Total kolesterol (mg/dL)	209±46,3	191±30,9	192±43,2	185	0,66
Trigliserid (mg/dL)	137±58,5	134±25,8	124±38,2	141	0,94
HDL-K (mg/dL)	44±8,0	45±10,2	46±7,3	39	0,89
LDL-K (mg/dL)	137±42,8	119±25,8	120±42,86	118	0,65

P<0.05 istatistiksel anlamlı (Kruskal-wallis testine göre)

Tablo 7. Sağlıklı kişilerin fenotipi ile lipid parametrelerinin karşılaştırılması

	E3/3 (n=29)	E3/4 (n=13)	E2/3 (n=9)	P
Apo E (mg/dL)	4,0±0,9	3,8±0,9	3,7±0,7	0,39
Apo A (mg/dL)	128±19,7	130±15,4	130±21,4	0,84
ApoB (mg/dL)	80±21,8	78±22,4	69±15,2	0,35
Total kolesterol (mg/dL)	182±31,3	173±24,7	170±22,3	0,55
Trigliserid (mg/dL)	119±49,8	119±42,1	94±23,9	0,31
HDL-K (mg/dL)	46±7,7	47±10,3	47±9,22	0,98
LDL-K (mg/dL)	115±34,7	106±33,3	104,3±24,1	0,72

P<0.05 İstatiksel olarak anlamlı (Kruskal-wallis testine göre)

Bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, $\epsilon_{3/3}$ fenotipinde diğer iki tipe oranla total kolesterol, LDL-K, düzeyinde hafif yükseklik, HDL-K düzeyinde ise hafif düşüklük göze çarpmaktadır. Her iki grubun fenotiplerine göre lipid düzeylerini karşılaştırdığımızda $E_{3/3}$ fenotipinde, total kolesterol ve LDL-K düzeyi hastalarda kontrol grubuna göre yüksek tespit edildi ($P<0,05$). Diğer parametreler arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

Behçet hastaları ve kontrol grubundaki lipid parametrelerini apo E fenotipine göre ayırıp incelediğimizde gerek hasta grubunda gerekse kontrol grubunda fenotipler arası lipid düzeylerinde anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir (Kruskal-wallis testine göre) .

5. TARTIŞMA

5.1. Metod Tartışması

Apolipoprotein E plazma lipoproteinlerinde bulunan bir çok apolipoproteinden biri olup plazma kolesterol ve trigliserid metabolizmasında çok önemli rolü vardır. Aterojenik lipoproteinlerin başında gelen LDL ve şilomikron kalıntıları için ligand görevleri gösterildikten sonra önemi daha da artmıştır. Apo E proteinin polimorfik oluşu çeşitli hastalıklarda özellikle kronik arter hastalığı ve Alzheimer hastalığı için risk oluşturmaktadır. Apo E polimorfizmindeki gelişmeler de bu araştırmalara hızlı bir şekilde eşlik etmiştir.

Apo E izofomları çeşitli araştırmacılar tarafından önerilen fenotipleme ve genotipleme yöntemleri ile ayırt edilebilmektedir.

Fenotipleme: Proteinin yükündeki farklılıktan dolayı apo E izoformları izoelektrik odaklama (isoelectric focusing=IEF) ile ayırt edilebilmektedir (76). Bu metod da IEF'la ayırımdan önce, VLDL'nin ultrasantrifugasyonla izolasyonunu gerektirmektedir. IEF'dan sonra protein bantları protein boyası ile görülür hale getirilir. Fakat bu metod yoğun bir laboratuvar çalışması ve büyük hacimlerde plazma gerektirmektedir. Ayrıca ultrasantrifüj gibi özel bir cihazın VLDL izolasyonu için kullanılması nedeniyle, bu metod her laboratuvar şartları için uygun değildir. Ultrasantrifugasyonla çalışmanın getirdiği bir dezavantaj da sınırlı sayıda numunenin incelenebilmesidir. Son zamanlarda IEF ile fenotipleme işlemi apoE'ye karşı antikorların kullanılmasıyla basitleştirilmiştir (PAG-IEF Immunoblotting). Plazma örnekleri direkt IEF'e konur ve sonra nitroselüloz membrana transfer edilir. Apo E yapısı immunoblot işlemiyle gösterilir (77). Bu amaçla bir çok elektroforez yöntemi farklı araştırmacılar tarafından uygulanmıştır.

- 1) Poliakrilamid jel-Izoelektrik focusing (PAG-IEF) (77)
- 2) IEF-İmmobiline (78)
- 3) SDS-PAGE (79)
- 4) PAG-IEF Immunoblotting (80)
- 5) IEF-Agaroz (81)

Bu metodlar izoelektrik odaklama yöntemine göre çalıştığı için, bilinen üç allelin dışında olan ve net yükü bu allellere benzeyen nadir amino asit değişikliklerini belirleyemezler. Ayrıca Apo E'nin yapısına enzimatik olarak sialik asit birimlerinin takılması ve nonenzimatik glikolizasyon gibi, post translasyonel modifikasyonlar proteinin izoelektrik noktasını değiştirdiğinden, fenotipin yanlış yorumlanmasına neden olabilmektedir. Özellikle $E_{4/4}$ 'den, $E_{4/3}$ 'ü ve $E_{3/3}$ 'den $E_{3/2}$ 'yi ayırmak çok zor olur (82).

İmmunoblot işleminin IEF'le birleşmesiyle plazma hacmi mikrolitre düzeylerine kadar azaltıldı ve tüm işlemin süresi bir günde tamamlanacak düzeye getirildi. Ayrıca, serum örneklerinin -70°C 'de 15 yıl gibi saklanması apo E fenotipinin belirlenmesine etki etmediği de gösterilmiştir. Böylece İmmunoblot-IEF metodunun ilk tanımlanan IEF metoduna göre bir çok avantajları vardır. Bunlar:

- 1-Küçük miktarda serum veya plazma kullanılması
- 2-VLDL izolasyonu için ultrasantrifüj kullanma ihtiyacının olmaması
- 3-Aynı anda büyük miktarlarda nümünenin çalışılabilmesi
- 4-Donmuş numunelerin de bu yöntemle çalışılabilmesidir.

Genotipleme: Apo E geninin belirlenmesinden sonra PCR temeline dayalı metodlar geliştirilmiştir. Amplifikasyon basamağı başarılı bir şekilde yapıldığında DNA metodları doğru sonuçlar sağlarken, bunlar her zaman protein ayırma metodlarına (Fenotipleme) üstün değildirler. Genotipleme özellikle $E_{3/3}$ 'ü $E_{3/2}$ 'den ayırmanın zor olduğu durumlarda çok yararlı olur (64). Ayrıca genotipleme metodu, özellikle üç allelle aynı net yüke sahip bilinen farklı bir varyantı ortaya koymada çok önemlidir. Fakat genotipik metodların çoğu net yükünde farklılık sergileyen ve IEF ile tespit edilebilecek yeni nadir bir varyantı yakalayamaz.

Apo E genotiplemesi nükleotid dizi değişikliğini belirlemeye dayanır. Apo E genotipinin direkt belirlenmesi farklı yöntemlerle gösterilebilir.

- 1) Allele spesifik oligonükleotidler (ASO) ile hibridizasyon (83)
- 2)PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) (84)
- 3) PCR-Dotting metod (85)
- 4) PCR- DNA melting metod (86)
- 5) Single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) (87)
- 6) Amplification Refractory Mutation System (ARMS) (88)

PCR-DNA melting metodu tek baz değişikliğini belirleyebildiğinden daha çok yeni bir varyantın belirlenmesinde çok faydalı olur. PCR-SSCP tekniği çok hassas olup nadir mutasyonları tespit edebilir. Fakat bu metod tuz konsantrasyonu ve sıcaklık gibi deney şartlarına oldukça hassastır (87).

Southern blott tekniğinin büyük miktarda genomik DNA gerektirmesi ve radyoaktif işaretli problemleri kullanmasından dolayı PCR düzenine dayalı metodlar bu metodun yerini almıştır.

Bu metodlar (83,84,85,86,87,88) içinde American Association of Clinical Chemistry (AACC)'in tavsiye ettiği ve en yaygın kullanılan PCR- RFLP (84) çalışmamızda kullanılmıştır.

Hixon ve arkadaşları (89) tarafından ilk olarak 1990'da Hha I restriksiyon endonüklazları ile genomik DNA'nın kesilmesi ve PCR ile çoğaltılması sonucu oluşan fragmentlerin elektroforetik analizine dayalı metodu (PCR Restriksiyon Fragment Length Polymorphism=PCR-RFLP) geliştirmişlerdir ve yaygın olarak günümüzde de kullanılmaktadır. Hha I enzimi ile kesimden sonra 5 restriksiyon fragment (91, 83, 72, 48 ve 35 bp) oluşur. Apo E-ε₄'ün Hha I ile kesimi sonucu oluşan altıncı fragmentin çok küçük olmasından (19bp) dolayı bu ürünün değerlendirilmesi çok zordur (89). Ayrıca Hha I ile inkomplet kesimlerin oluşması istenmeyen sonuçların ortaya çıkmasına neden olur. Bu nedenle Zivelin ve arkadaşları 1997'de daha spesifik kesim yapabilen iki farklı restriksiyon endonükleazı kullanmıştır (Afl III ve Hae II) (71). Şekil 4'de görüldüğü gibi Afl III 112. kodonu, Hha II ise 158. kodonu tanır ve keser. Oluşan büyük fragmentler (145 bp = ε₃, 168 bp = ε₂, 195 bp =ε₄) daha kolay bir şekilde PAGE veya agaroz jelde belirlenebilmektedir. Çalışmamızda diğerlerine göre avantajlı olması nedeniyle, Zivelin ve arkadaşlarının (74) önerdiği metod laboratuvar şartlarımızda optimize edilip kullanılmıştır.

Optimizasyon Tartışması: DNA izolasyonu literatürde belirtildiği gibi yüksek tuz konsantrasyonunda gerçekleştirildi. DNA izolasyonunda kullandığımız metodun hassasiyetinden dolayı birbirine yakın saflıkta DNA'lar elde etmeyi başardık (resim 1).

Literatürde önerilen master mix karışımındaki bazı parametreler değiştirilerek en iyi ürün veren konsantrasyonları bulmaya çalıştık. PCR protokolüne göre bizim modifikasyon yaptığımız parametreler dNTP, primer konsantrasyonu ve Taq DNA polimeraz konsantrasyonu oldu. Yaptığımız pek çok deneme sonucunda gördük ki; Literatürde önerilen 0.2 mmol/L dNTP yerine 0.4 mmol/L, 500nmol/L primer karışımı yerine 360 nmol/L, 0.6 U taq polimeraz yerine 1 U kullandığımızda yoğun ve görüntü açısından simirli olmayan, temiz ürünler elde etmeyi başardık (resim 2). Tüm bu denemeler neticesinde elde ettiğimiz ürünlerin konsantrasyonu bir sonraki aşamada kullanacağımız restriksiyon enzimleri ile kesilebilecek miktara getirdik PCR programı ise denatürasyon, yapışma ve uzama süreleri literatürden farklı olarak 30 sn daha uzatılarak (Bölüm 3.2.6'da verildiği gibi) yapıldı.

Restriksiyon enzim miktarı literatürde önerilenden farklı olarak, Afl III'den ve Hae II'den 2.5 U, alınarak yapıldı. Yaptığımız denemeler de ürünler enzim ile 2, 4 ve 24 saat inkübasyona bırakıldığında en iyi görüntünün 4 saat sonraki kesimde olduğu görüldü (resim 3). Zaman avantajı nedeniyle literatürde önerilen 24 saat yerine 4 saatlik inkübasyon tercih edildi.

5.2. Bulguların Tartışması

Behçet hastalığı akut ataklar ve remisyon dönemleri ile karakterize kronik inflamasyon tablosudur. Multisistemik bir tutulum ve organ patolojisi söz konusu olup primer histopatolojik olay genel bir vaskülit tablosudur. Yapılan çalışmalarda inflamasyonun tipik bulguları hastalığın aktif döneminde daha belirgin olmak üzere ortaya konmuştur. PMN lökositlerin fonksiyonlarında (kemotaksiz, fagositoz, süperoksit anyon üretimi(O_2^-) ve lizozomal enzim aktivitesi gibi) artışlar gösterilmiştir (90,91).

Yapılan çalışmalar aterosklerozun gelişiminin bir kronik inflamasyon tablosuna benzediğini göstermektedir. Romatoid artrit (RA), sistemik lupus eritematosus (SLE) gibi kronik inflamatuvar hastalıkların, yüksek kardiovasküler mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (92). Bu oranlara bakıldığında, SLE'nin miyokard infarktüsü için 50 kat, RA'nın kardiovasküler hastalıktan ölüm oranının ise iki kat arttığı görülmektedir (93).

Ayrıca vasküler endotelial hasarın aterosklerozda ilk olay olduğu ve aterosklerotik bir çok risk faktörünün endotelial disfonksiyonla ilişkisi olduğu vurgulanmıştır (94). Bu nedenle BH hem kronik inflamatuvar seyri hem de genel vaskülit tablosundan dolayı aterosklerotik bir zemine sahiptir. Ayrıca yapılan bir çok çalışmada Behçet hastalığında endotelial disfonksiyon (95) ve inflamatuvar aktivite gösterilmiştir (96,97).

Behçet hastalığındaki lipid düzeylerini inceleyen ilk çalışmalardan biri 1982'de Ohguchi M. ve arkadaşları (98) tarafından yapılmış ve β -lipoproteinlerin hastalarda yükseldiğini göstermişlerdir. Daha sonra 1988 yılında Mitamura ve arkadaşları (99) Behçet hastalığında kan lipid düzeylerini araştırmışlar ve HDL-K, apo AI seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulmuşlardır. Total kolesterol ve trigliserid düzeylerini ise istatistiksel olarak anlamsız bulmuşlardır. Lipid ve lipoproteinlerle ilgili yapılan çalışmaların bir çoğunda kan kolesterol düzeyi ile HDL düzeyleri arasında ters ilişki olduğu gösterilmiştir. Bu ilk iki çalışma da bu açıdan birbirini desteklemektedir. Bu konudaki laboratuvarımızdaki ilk çalışmalar 1994 yılında başladı ve yeni bir lipoprotein olan Lp(a) üzerine yoğunlaştı (100). Bu çalışmalarda Lp (a)'nın BH'larında artmış olduğu ve bu artışında hastalığın klinik aktivitesiyle ilişki gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, total kolesterol, LDL-K ve apo B düzeylerinde Behçet hastalarında kontrol grubuna göre yüksek gözlenirken, trigliserid düzeylerinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir. Yine önceki çalışmalarımızda HDL-K ve apo AI düzeyleri hasta grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı düşük değerler gözlenmiştir (6,7). Bu bulgular Mitamura ve Ohguchi bulgularıyla uyumlu görülmektedir. İlerleyen çalışmalarımızda, BH'da lipid ve lipoprotein düzeyindeki değişikliklerin, hastalığın aktivitesiyle ilişkili olduğu gözlenmiştir (101). İnaktif BH'nın lipid profili hemen hemen kontrol grubuyla benzerdi. Bu bulguların ışığı altında kronik aktif inflamasyon tablosu sergileyen BH'nın bu inflamatuvar süreç içinde lipid metabolizmasını etkilediği görüşü bizde hakim olmuştur. Bu nedenle diğer kronik inflamatuvar hastalıklarda gözlenen artmış aterosklerotik meyilin BH'da olabileceği görüşü ileri sürülmüştür.

Bu çalışma da, plazma lipid, lipoprotein ve apolipoprotein düzeyine baktığımızda, total kolesterol, LDL-K ve apo B konsantrasyonları Behçet hastalarında kontrol grubuna göre yüksek gözlenmiştir (Tablo 3.). Trigliserid düzeyleri her iki grupta diğer parametrelere göre daha fazla dağınık sonuçlar gösterdiğinden, Behçetli hastalarda yüksek olmasına rağmen istatistiki olarak anlamsız gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarımızda total kolesterol, LDL-K ve apo B düzeylerinde benzer sonuçlar elde edilirken, trigliserid

düzeylerinde mevcut çalışmanın aksine Behçet grubunda düşük değerler gözlenmiştir. Yine önceki çalışmamızda HDL-K ve apo AI düzeyleri hasta grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı düşük bulunurken bu çalışmada iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir. Bu çalışmada gözlenen lipid düzeylerindeki değişikliklerin daha önce tespit ettiğimiz değişikliklerle bazı parametrelerin uyuşmamasını, bu çalışmada seçilen BH'nın klinik aktivitelerinin farklı derecede olmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Apo E düzeyleri BH'da ilk olarak bu çalışmada değerlendirilmiştir. BH'da kontrol grubuna göre anlamlı fark gözlenmemiştir.

Hasta ve kontrol grubundaki lipid ve lipoproteinlerin, apo E ile olan ilişkisi tablo 4'de verilmiştir. Behçet hastalarında apo E düzeyi, total kolesterol, LDL-K, trigliserid ve apo B düzeyleri ile anlamlı korelasyon göstermiştir. Ayrıca total kolesterol ve LDL-K ile apo B arasında ve HDL-K ile apo AI arasında da anlamlı ilişkiler tespit edilmiştir. Kontrol grubunda ise apo E, total kolesterol ve LDL-K ile hasta grubuna göre daha zayıf bir ilişki göstermektedir. Diğer parametreler arasındaki ilişki daha zayıf olmakla birlikte hasta grubundakine benzemektedir.

Çalışma grubuna aldığımız hastalar klinik olarak değişen derecelerde aktiviteye sahiptiler. Hastaların PMN lökosit düzeylerine baktığımızda, kontrol grubuna göre yaklaşık % 30 artmış olmasına rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Hastaların klinik aktivitelerindeki geniş dağılım, PMN lökosit düzeylerinde de gözlenmektedir.

Behçet hastaları ve sağlıklı kontrol grubuna ait apo E fenotip ve allel dağılım sıklığı tablo 5'de görülmektedir. $E_{3/3}$ fenotipi her iki grupta da en sık görülürken, $E_{4/4}$ fenotipi hasta grubunda bir kişide ($n=30$), sağlıklı kontrol grubunda rastlanmamıştır ($n=51$). Fenotip dağılım sıklığına baktığımızda istatistiksel olarak anlamlı fark gözükmemektedir. Yine allel sıklığı açısından değerlendirdiğimizde, her iki grup arasında anlamlı farklılık yoktur. Sağlıklı grupta allel sıklığı; $\epsilon_2:8.8$ $\epsilon_3:78.4$ ve $\epsilon_4:12.7$, şeklindedir. Bu konuda daha geniş çapta yapılmış çalışmalara baktığımızda Mahley ve arkadaşları (102) 8366 kişilik Türk popülasyonu üzerinde yaptığı çalışmada bu frekansı sırayla, $\epsilon_2:6.1$, $\epsilon_3:86.0$ ve $\epsilon_4:7.9$ şeklinde bulmuştur. Malle ve arkadaşları Almanyada yaşayan Türkler üzerinde yaptığı çalışmada ($n=240$) bu dağılım sıklığını sırayla, $\epsilon_2:4.8$, $\epsilon_3:88.5$ ve $\epsilon_4:6.7$ olarak bulmuştur (103). Sağlıklı kontrol grubumuzun büyüklüğünün böyle bir dağılım sıklığını yansıtmaya açısından diğer çalışmalara göre yetersiz olduğunu düşünmekteyiz.

Behçet hastalığı ile sağlıklı kontrol grubunun apo E allel sıklığı arasında istatistiksel olarak farklılık gözlenmemesine rağmen, hasta grubunda (n=30) bir kişinin E_{4/4} olması ve ϵ_4 allel sıklığının %16.7 gözlenmesi vaka sayıları artırıldığında bu oran nasıl değişir sorusunu akla getirmektedir. Behçet hastalığının çok yaygın görülmemesi bu sayıyı artıramamızdaki en önemli nedendir. Ayrıca Mahley ve Malle'nin yaptığı çalışmalarda ϵ_4 allel sıklığına göre (sırayla %7.9 ve % 6.7) hastaların ϵ_4 allel sıklığını karşılaştırdığımızda (%16.3) belirgin bir yükselişten söz etmek mümkündür.

Eskandari ve arkadaşları (104) 1997'de Adana bölgesinde yaptıkları 75 kişilik sağlıklı populasyon taramasında ϵ_4 allel sıklığını %11.3 olarak belirlemiştir. Bu değer bizim çalışmamızdaki hasta ve sağlıklı kontrol değerlerine daha yakın görülmektedir.

Apo E'nin genetik polimorfizmi tek bir gen lokusunda ϵ_2 , ϵ_3 ve ϵ_4 gibi üç allel tarafından kontrol edilir. Bu da üç majör izoprotein (E₂, E₃ ve E₄) amino asit değişimi ile sonuçlanır. Bu izoproteinler, lipoprotein reseptörleri için apo E taşıyan lipoproteinlerin afinitesini belirler. Bu izoproteinleri reseptör afinitesi en düşükten yükseğe sıraladığımızda E₂, E₃ ve E₄ şeklindedir. Sonuçta afinite farklılığına bağlı olarak bireyler arasında apo E polimorfizmine bağlı olarak plazma lipid ve lipoprotein konsantrasyonlarında da farklılık gözlenmektedir. ϵ_2 alleli düşük plazma kolesterol, LDL-kolesterol ve apo B konsantrasyonları ile birlikte iken, ϵ_4 allelinde ise bu konsantrasyonlar en yüksek düzeydedir (59).

Manke ve arkadaşları (105) familial defektif apo B-100'lü hastalarla normal populasyonu, apo E genotipleri açısından karşılaştırmışlar ve kontrol grubunda E 2/2 genotipi düşük, total ve LDL-K, E 4/4 genotipi yüksek, total ve HDL-K düzeyleriyle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca trigliserid konsantrasyonunun E 2/2 genotipli bireylerde yüksek olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada apo E allellerinin lipid parametreleri üzerine olan etkisi de incelenmiştir. Genel olarak ϵ_2 allelinin LDL ve HDL kolesterolü, ϵ_3 allelinin trigliseridi düşürücü ve ϵ_4 allelinin ise total ve LDL kolesterolü yükseltici etkisinin bulunduğu sonucuna varılmıştır.

İlk olarak 1989'de Shimano ve arkadaşları (106) E₄ alleli ile Alzheimer hastalığı (AH) arasındaki ilişkiyi tanımlamıştır. Yaklaşık ϵ_4 allel sıklığının AH'de iki kat arttığını göstermiştir. İki yıl sonra Dicdrick ve arkadaşları (107) AH'da astrositlerin artmış apo E sentezini göstermiştir. Daha sonra bir seri çalışma dizisi apo E₄ allel sıklığı ile AH arasındaki bu ilişkiyi teyid edici bulgular sunmuşlardır (69,73) Buna rağmen bazı

nörodejeneratif hastalıklarda Creutzfeldt-jakob hastalığı (68), ailesel amiloidik polinoropati (69), Down sendromu (71), amiyotropik lateral sklerosis (72), ve Huntington hastalığı (73) gibi hastalıklarda ϵ_4 allel sıklığında artış tespit edilmemiştir Parkinson hastalığında ise tartışmalı bulgular mevcuttur (70,72). Multiple sklerosis (108) ve Romatoid artrit (109)'de ise ϵ_3 alleli en yaygın allel olarak bulunmuştur. Epilepsi (110) ve gut hastalığında (111) ise apo E polimorfizminin etkili olmadığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Hastaları ve kontrol grubunu mevcut gözlenen fenotiplere göre ayırıp, bu gruplara göre lipid, lipoprotein ve apolipoprotein düzeylerini incelediğimizde tablo 6 ve 7'deki bulguları gözlemekteyiz. Lipidlerle ilgili bu parametreleri incelediğimizde, sağlıklı kontrol grubunda gözlenen $E_{3/3}$ (n=29); $E_{3/4}$ (n=13); ve $E_{2/3}$ (n=9) fenotiplerine göre lipid düzeylerinde gözlenen değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yapılan çalışmalara göre $E_{3/3}$ genotipindeki kolesterol değerlerine göre diğer genotipler değerlendirildiğinde $E_{2/2}$, $E_{2/3}$ ve $E_{2/4}$ 'de total kolesterol, LDL-K, apo B düzeylerinde azalma $E_{3/4}$ ve $E_{4/4}$ genotipinde ise total kolesterol ve LDL-K'de ise belirgin artışlar görülmektedir (63,112-114). $E_{3/3}$ 'e göre total kolesterol düzeylerine baktığımızda $E_{3/4}$ 'de beklenenin aksine 8 mg/dl, $E_{2/3}$ 'de ise beklenen yönde 11 mg/dl'lik bir azalma söz konusudur. Yine plazma trigliserid düzeyi açısından değerlendirdiğimizde $E_{2/3}$ 'de artış beklenmesine rağmen belirgin bir düşüş (21 mg/dl) görülmektedir. Bu sonuçların ortaya çıkmasında yine $E_{2/3}$ grubunda dokuz kişinin bulunmasının önemli bir faktör olabileceğini düşünmekteyiz. HDL ve Apo AI konsantrasyonlarında belirgin bir değişikliğin olmaması literatür bilgileri ile uyusmaktadır (114-116).

Apo E düzeyleri her üç genotipte de birbirine çok yakın ortalama değer elde edilmesine rağmen bireyler arasında oldukça dağınık sonuçlar elde edilmesi yine literatürün tersine fazla etkilenmediğini bize düşündürmektedir (106-107).

Behçetli grupta total kolesterol ve LDL-K düzeyleri Kontrol grubuna göre yüksek olmasına rağmen genotiplere göre aralarında anlamlı fark gözlenmemektedir. Trigliserid konsantrasyonu yine sağlıklı grupta olduğu gibi $E_{3/3}$ 'e göre $E_{2/3}$ grubunda 14 mg/dl'lik bir düşüklük göstermektedir.

Bu sonuçlardan da anlaşıldığı gibi hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubunda genotiplere göre plazma lipid ve lipoprotein konsantrasyonlarında literatür bilgilerinin aksine anlamlı değişiklikler gözlenmemektedir. Bu sonucun ortaya çıkmasındaki en önemli faktörlerin, çalışmaya alınan gruplardaki sayının düşük olması ve özellikle hasta grubundaki bireylerin klinik şiddetlerinin değişikliğinden dolayı plazma lipid

düzeylerindeki değişikliğin olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, 51 kişilik sağlıklı kontrol grubunda $E_{4/4}$ alleleline rastlanmamasına rağmen 31 kişilik hasta grubunda 1 tane $E_{4/4}$ alleleline rastlanmasının tesadüfi olup olmadığı çalışma gruplarının sayılarındaki artışlarla ortaya konabilecek bir durumdur. Behçetli hastaların lipid düzeylerindeki değişikliklerin gözlenmesi ve vakaların bir kısmında nörolojik bozuklukların gözlenmesi bizi literatürde mevcut olmayan Behçet hastalığı ve apo E polimorfizmi incelemeye yönelten en önemli nedenlerdi.

Çalışmamızda Behçet hastalarının apo E genotiplemesinin ve apo E allel dağılımının sağlıklı kontrol grubundan anlamlı farklı olmadığı, fakat lipid ve lipoprotein düzeylerinde anlamlı farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Daha önceki çalışmalarımızda BH'nın aktif ve inaktif dönemleri arasında lipid ve lipoprotein metabolizması yönünden farklılıklar gözlenmiştir (6,7). Bu çalışmada hasta grubunun klinik aktivitelerinin farklı olması, literatürle uyumsuz sonuçların ortaya çıkmasına neden olan en önemli faktördür. BH'nın toplumda görülme sıklığının düşük olması çalışmaya alınan kişi sayısını kısıtlamıştır. Fakat, hasta grubunda görülen $E_{4/4}$ genotipinin ($n=1$), sağlıklı grupta görülmemesinin tesadüfi olup olmadığı hasta grubunun vaka sayısı artırılarak ortaya koyulmalıdır. Ayrıca ailesel Behçet'li vakalarda apo E genotiplemelerinin belirlenmesi bu konuya daha fazla ışık tutabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. Behçet hastalarında plazma lipid, lipoprotein ve apo E polimorfizmi, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında hastalarda;

a) Total kolesterol, LDL-K, Apo B seviyeleri yüksek

b) Trigliserid, HDL-K, Apo AI ve Apo E seviyeleri arasında fark görülmedi.

c) BH'da bir kişide $E_{4/4}$ alleli görülürken, sağlıklı kontrol grubunda hiç görülmedi. $E_{3/3}$ alleli her iki grupta da en sık görülen alleldi. $E_{2/2}$ alleli her iki grupta da gözlenmedi.

d) BH'da apo E allelinin görülme sıklığı ϵ_2 : 10, ϵ_3 : 73.3 ve ϵ_4 : 16.7 dir. Sağlıklı kontroller de ϵ_2 : 8.8, ϵ_3 : 78.4 ve ϵ_4 : 12.7 dir. Bu dağılımlar arasında anlamlı farklılık gözlenmedi.

e) Apo E fenotiplerine göre lipid parametreleri her iki grupta da anlamlı farklılık gözlenmedi.

2. Hasta sayısı artırılarak, daha anlamlı istatistiksel veriler ortaya konmalı

3. Ailesel Behçetli hastalarda apo E polimorfizmi değerlendirilmeli

7. ÖZET

Behçet hastalığı başlıca göz, cilt ve nörolojik belirtilerde etkili olan multisistem bozukluğudur. Akut ataklar ve remisyon dönemleri ile karakterize kronik bir inflamasyon tablosu sergiler. Bu nedenle multisistemik bir tutulum ve organ patolojisi söz konusu olup, laboratuvar bulgularına serum lipid ve lipoprotein seviyesinde bir çok değişiklik eşlik etmektedir. Ailesel geçiş son yıllarda üzerinde durulan önemli bir faktördür.

Apolipoprotein E lipoprotein metabolizmasında esansiyel öneme sahip, özellikle trigliseritten zengin lipoprotein kalıntılarının, düşük dansiteli lipoprotein (B, E) reseptörü ve hepatik kalıntı (E) reseptörüne bağlanmasında ligant olarak fonksiyon gören bir glikoproteindir. Apo E geni polimorfiktir ve üç alelli tanımlanmıştır. Farklı üç izoformun 112. ve 158. amino asid dizisinde farklılık vardır. Farklı apo E izoformları lipoprotein seviyeleri üzerinde bireyler arası varyasyon'da önem kazanmaktadır. Hipergliseridemili hastalarda apo E izoformları belirlenmiş ve apo E3, apo E4 allelleri sıklıkla gözlenmiştir. Kardiyo vasküler hastalarda apo E polimorfizminin belirlenmesi ateroskleroza yatkınlığın ortaya konulmasında önemli bir genetik risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Nörodejenertif bir hastalık olan Alzheimer hastalığı ile ϵ_4 alleli arasında ilişki olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur.

Bu çalışmada 30 Behçet hastası ve 51 sağlıklı gönüllüden kan örnekleri alınarak plazma lipid ve lipoprotein düzeyleri ve apo E genotipleri belirlendi. Behçet hastalarında total kolesterol, LDL-Kolesterol, apo B seviyeleri anlamlı şekilde yüksek bulundu. Trigliserid, HDL-Kolesterol, apo AI, apo E seviyeleri sağlıklı kişilere göre anlamlı değildi. Apo E allel sıklığı açısından her iki grupta anlamlı farklılık yoktur. Sağlıklı grupta ϵ_2 :4.8, ϵ_3 :78.4 ve ϵ_4 :12.7 dir. Behçet hastalarında ϵ_2 :10, ϵ_3 :73.3 ve ϵ_4 :16.7 dir. Apo E fenotiplerine göre lipid parametreleri her iki grupta da anlamlı farklılık göstermedi.

Sonuç olarak Behçet hastalığında apo E allel sıklığının ve polimorfizminin sağlıklı kontrol grubuna göre farklı olmadığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Behçet hastalığı, apolipoprotein E polimorfizim, lipid, lipoprotein

8. SUMMARY

Behçet's disease is a multisystem disorder which is characterized by ocular and skin manifestations and neurologic findings and by relapsing systemic inflammatory process and remission periods. In addition to multisystemic retention and organ pathology, Behçet's disease is associated with changes in serum lipid and lipoprotein levels. Recently, familial inheritance have been considered as an important factor in etiology of the disease.

Apolipoprotein E is a glycoprotein that functions essentially in lipoprotein metabolism as a ligand in binding particularly triglyceride-rich lipoprotein remnant to low-density lipoprotein (B,E) receptor and hepatic remnant (E) receptor. Apo E gene is polymorphic and its three alleles are defined. Amino acid sequence 112. and 158. of different three isoforms are different, that is important in variation of individuals according to lipoprotein levels. In the patients with hypertriglyceridemia, apo E isoforms have been determined and generally apo ϵ_3 and ϵ_4 alleles were observed. The determination of apo E polymorphism in the patients with cardiovascular disease is evaluated as an important risk factor for atherosclerosis. A correlation between ϵ_3 allele and neurodegenerative Alzheimer disease have been found in many studies.

In the present study, the study group included 30 patients with Behçet's disease and 51 healthy control subjects. Their plasma lipid and lipoprotein levels and apo E genotypes were determined. Total cholesterol, LDL-Cholesterol and apo E levels in the patients were found to be significantly higher than those of control group. However the levels of triglyceride, HDL-Cholesterol, apo AI and apo E levels were not significantly different. No significant difference was not found in frequencies of apo E alleles ϵ_2 : 4.8, ϵ_3 : 78.4 and ϵ_4 :12.7 in healthy individuals and ϵ_2 : 10, ϵ_3 : 73.3 and ϵ_4 :16.7 in Behçet's disease. Lipid parameters according to Apo E phenotypes were not found statistically different.

In conclusion, the frequencies of apo E allele and polymorphism were not different in Behçet's disease than those in healthy individuals.

9. KAYNAKLAR

1. Behçet, H.: Über rezidivierende, aphtöse, durch ein virus verursachte Geschwüre am Mund am Auge und an den Genitalien. Derm Wochenshr, 105: 1152-7, 1937.
2. Doğanavşargil, E., Keser, G.: Behçet hastalığı. Gümüşdiş G (Ed) Klinik Romatoloji. Deniz matbaası, s.423-439, 1999.
3. Örem, A., Değer, O., Memiş, Ö., Bahadır, S., Ovalı, E., Çimşit, G.: Lp (a) lipoprotein levels as a predictor of risk for thrombotic events in patients with Behçet's disease. Ann Rheum Dis, 54:726-729, 1995.
4. Örem, A., Değer, O., Çimşit, G., Karahan, S. C., Akyol, N., Yıldırım, S.: Plasma lipoprotein (a) and its relationship with disease activity in patients with Behçet's disease. Eur J Clin Chem Biochem, 33: 473-478, 1995.
5. Mahley, R. W., Innerarity, T.L.: Apolipoprotein E : Cholesterol transport protein with expanding roles in cell biology. Science, 240: 622-30, 1988.
6. Siest, G., Pillot, T., Regis-Bailly, A., Leininger-Muller, B., Steinmetz, J., Galteau, M., Visvikis, S.: Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. Clin Chem, 41 (8): 1068-1086, 1995.
7. 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, 128 (1): 67, 1997.
8. Getz, G. S., Mazzone, T., Soltys, P., Bates, S. R.: Atherosclerosis and apoprotein E. Arch Pathol Lab Med, 112: 1048-1055, 1988.
9. Siest, G., Visvikis, S., Lucotte, G., Jeandel, C.: Apolipoprotein E in Alzheimer's disease. The Fats of Life, p: 8-11, 1994.
10. Dilşen, H.:Behçet hastalığının tarihçesi. Aktüel Tıp Dergisi.Behçet Hastalığı sayısı. Nisan, 2 (2): 62-65, 1997.
11. Yurdakul, S., Tüzün, Y., Mat, M. C., Özyazgan, Y., Yazıcı, H.: Behçet sendromu. Tüzün, Y., Kötayyan, A., Aydemir, E. H., Baransü, O.: Dermatoloji. Nobel Tıp Kitapevleri, 2.Baskı, 1994,s : 393-399.
12. Akoğlu, T.: Behçet Hastalığı Patogenezi. Aktüel Tıp Dergisi. Behçet Hastalığı Sayısı. 2 (2): 80-86, 1997.

13. Gürler, A.: Behçet Hastalığında Tanı Kriterleri. MN Klinik Bilimler. 5: 85-97, 1995.
14. Gül A.: Behçet Hastalığı'nın İmmünolojisi. Aktüel Tıp Dergisi. Behçet Hastalığı Sayısı. 2 (2): 76-78, 1997.
15. Fresko, İ.: Behçet Hastalığı ve Genetik. Aktüel Tıp Dergisi. Behçet Hastalığı Sayısı. 2 (2): 68-69, 1997.
16. Akkaya, S., Kölemen, F., Akan, T., Atakan, D.: Dermatoloji El Kitabı. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, s. 219-224, 1990.
17. Azizler, G.: Behçet Hastalığında Deri Bulguları. Aktüel Tıp Dergisi. 2 (2): 94, 1997.
18. Tutkun, T.İ.: Göz Tutulumunun İmmünolojisi ve Klinik Özellikleri. Aktüel Tıp Dergisi. 2 (2): 89-93, 1997.
19. Gürler, A.: Oral ve Genital Aftlar. Aktüel Tıp Dergisi. 2 (2): 87-88, 1997.
20. Aral, O.: Behçet Hastalığında Eklem Tutulumu. Aktüel Tıp Dergisi. 2 (2). 99-100, 1997.
21. Öcal, L.: Behçet Hastalığında Diğer Organ Tutulumları. Aktüel Tıp Dergisi. 2 (2): 104, 1997.
22. Dixon, J. S., Yurdakul, S., Surrall, K. E., Yazıcı, H., Chamberlain, M. A.: A study of serum biochemistry in Behçet's syndrome. Br J Rheuma, 23: 283-287, 1984.
23. Bhagavan, N. V.: Medical Biochemistry, USA, Jones and Barlett Publishers Inc., 1992,ed 2 p: 384-419
24. Champe, P. C., Harvey, R. A.: Biyokimya lippincott's Illustrated reviews. T. Asuman., M. Dirican., E. Ulukaya (Editörler), Nobel Tıp Kitap, II. baskı, 1997.
25. Mayes, P. A.: Lipids of Physiologic significance. In Murray R. K., Granner D. K., Mayes P A., Rodwell V. W. (Eds): Harpers Biochemistry USA, Prentice-Hall International Inc, 1993, 23ed, pp 250-265.
26. Roheim, P. S.: Atherosclerosis and lipoprotein metabolism: Role of reverse cholesterol transport. Am J. Cardiol, 57: 3-10, 1986.
27. Thompson, G. R.: Hiperlipoproteinemi El Kitab. Merc Sharp and Dohme (Çev. Enis Tamuğur), İstanbul, 1989, s: 87-99.
28. Rifai, N., Bachorik, P. S., Albers, J. J.: Lipids, Lipoproteins and Apolipoproteins. In Burtis, C. A., Ashwood E. R. (Ed.). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W B. Saunders company, Philadelphia, 1999, 3rd edition, pp: 809-861.
29. Rosenfelt, M. E.: Fatty streak initiation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. Arteriosclerosis. 7 (1): 9-23, 1987.

30. Eichner, J. E., Kuller, L. H., Orchard, T. J., Grandits, G. A., McCallum, L. M., Ferrell, R. E., Neaton, J. D.: Relation of apolipoprotein E phenotype to myocardial infarction and mortality from coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 71: 160-165, 1993.
31. Boerwinkle, E., Sing, C. F.: 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.* 51: 211-226, 1987.
32. Shore, V. G., Shore B.: Heterogeneity of human plasma very low density lipoproteins: Separation of species differing in protein components. *Biochemistry* 12: 502-507, 1973.
33. Utermann, G., Jaeschke, M., Menzel, J.: Familial hyperlipoproteinemia type III. Deficiency of a specific apolipoprotein (apo E III) in the very low density lipoproteins. *FEBS Lett.* 56: 352-355, 1975.
34. Mc Lean, J.W., Fukazawa, C., Taylor, J. M.: Rat apolipoprotein E mRNA cloning and sequencing of double-stranded cDNA. *J. Biol Chem.* 264: 8993-9000, 1983.
35. Menzel, H. J., Kladetzky, R. G., Assmann, G.: Apolipoprotein E polymorphism and coronary artery disease. *Arteriosclerosis.* 3: 310-315, 1985.
36. Tsai, M-S., Tangalos, E. G., Petersen, R. C., Smith, G. E., Schald, D. J., Kokmen, E., Ivnik, R. J., and Thibodeau, S. N.: Apolipoprotein E: risk factor for Alzheimer disease. *Am J Hum Genet* 54: 643-649, 1994.
37. Weisgraber, K. H., Mahley, R. W.: Human apolipoprotein E the Alzheimer disease connection *FASEB J.* 10 (13): 1485-1494, 1996.
38. Shaw, D. J., Brook, J. D., Meredith, A.L., Harley, H. G., Sarfarazi, M., Harper, P. S.: Gene mapping and chromosome 19. *Journal of Medical Genetics.* 23: 2-10, 1986.
39. Davignon, J., Gregg, R. E., Sing, C. F.: Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis,* 8: 1-21, 1988.
40. Wilson, C., Wardell, M. R., Weisgraber, K. H.: Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science* 252: 1817-1822, 1991.
41. Utermann, G., Langenbeck, U., Beisiegel, U.: Genetics of the apolipoprotein E system. *Am J Hum Genet.* 32: 339-347, 1980.
42. Zannis, V. I., Breslow, J. L.: Human very-low-density-lipoprotein apolipoprotein E izoprotein polymorphism is explained by genetic variation and post-translational modification. *Bichemistry,* 256: 9077-9083, 1981.

43. Weisgraber K.H., Rall S. C., Mahley R. W.: Human E apoprotein heterogeneity cyctein-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo E isoforms. *J Biol Chem.* 256: 9077-9083, 1981.
44. McLean, J. W., Elshourbagy, N. A., Chang, D. J., Mahley R. W., Taylor J. M.: Human apolipoprotein E mRNA, cDNA cloning and nucleotide sequencing of a new variant. *J Biol Chem*, 259: 6498-6504, 1984.
45. Blue M. L., Williams D. L., Zucker S., Khan S. A., Blum C.: Apolipoprotein E synthesis in human kidney, adrenal gland and liver. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 80: 283-287, 1983.
46. Basu S. K., Ho Y. K., Brown M. S., Bilheimer D. W., Anderson R. G. W., Goldstein J. L.: Biochemical and genetic studies of the apoprotein E secreted by mouse macrophages and human monocytes. *J Biol Chem.* 257: 9788-9795, 1982.
47. Roheim P. S., Carey M., Forte T., Vega G. L.: Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 76: 4646-4649, 1979.
48. Walden C. C., and Hegele R. A.: Apolipoprotein E in hyperlipidemia. *Ann Intern Med.* 120: 1026-1036, 1994.
49. Mahley R. W., Innerarity T. L.: Lipoprotein receptors and cholesterol hemostasis. *Biochim Biophys Acta.* 737: 197-222, 1983.
50. Mazzone T.: Apolipoprotein E secretion by macrophages: its potential physiological functions. *Curr Opin Lipid.* 7: 303-307, 1996.
51. Zannis V. I., Breslow J. L.: Genetic mutations affect human lipoprotein metabolism. *Adv Hum Gene.* 14: 125-215, 1985.
52. Getz G. S., Mazzone T., Soltys P., Bates S. R.: Atherosclerosis and apoprotein E. *Arch Pathol Lab Med.* 112: 1048-1055, 1988.
53. Weisgraber, K. H.: Apolipoprotein E: structure-function relationships. *Adv Protein Chem.* 45:249-302, 1994.
54. Tajima S., Yamamura T., Menju M.: Analysis of apolipoprotein E7 (apolipoprotein E-Suita) gene from a patient with hyperlipoproteinemia. *J Biochem (Tokyo)*, 105:249-253, 1989.
55. Dong L. M., Yamamura T., Yamamoto A.: Enhanced binding activity of an apolipoprotein E mutant, apo E5, to LDL receptors on human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 168:409-414, 1990.
56. Steinmetz, A., Asserbarkhi, N., Eltze, C.: Normolipemic dysbetalipoproteinemia and, hyperlipoproteinemia type III in subjects homozygous for a rare genetic apolipoprotein E variant (apo E1). *J Lipid Res.* 31: 1005-1013, 1990.

57. Gregg, R.E., Ghiselli G., Brewer, H.B., Jr.: Apolipoprotein E-Bethesda: a new variant of apolipoprotein E associated with type III hyperlipoproteinemia. *J. Clin Endocrinol Metab.* 57: 969-974, 1983.
58. Yamamura, Taku., Dong, L. M., and Yamamoto, A.: Apolipoprotein E polymorphism and coronary heart disease. *Chinese Medical Journal.* 105 (9): 738-741, 1992.
59. Eto, M., Watanabe, K., Ishii, K.: Reciprocal effects of apolipoprotein E alleles (ϵ_2 and ϵ_4) on plasma lipid levels in normal lipidemic subjects. *Clin Genet.* 29: 477-484, 1986.
60. Utermann G.: Apolipoprotein E polymorphism in health and disease. *Am Heart J.* 1987;113-433.
61. Gregg R. E., Ronan R., Zech L., A., Ghiselli G., Schaefer E., J., Brewer H., B.: Abnormal metabolism of apolipoprotein E4. *Circulation* 1982; (suppl 2):160.
62. Reilly S., L., Ferrel R., E., Kottke B., A., Kamboh M., I., Sing C., F.: The gender-specific apolipoprotein E genotype influence on the distribution of lipids and apolipoproteins in the population of Rochester, Minnesota. I. Pleiotropic effects on means and variances. *Am J Hum Genet.* 49:1155-66, 1991.
63. Havekes L., De Knijff P., Smit M., Frants R., R.: The effects of apolipoprotein E allele substitutions on plasma lipid and apolipoprotein levels. *Adv Exp Med Biol.* 243:87-93, 1988.
64. Wu, H. L., Wu, T. J., and Hopkins, P. N.: Apolipoprotein E: Laboratory Determinations and Clinical Significance. In Rifal, N., Warning, G. R., Dominiczak, M. H. (Eds.), *Handbook of Lipoprotein Testing*, AACC Press, Washington, 1997, pp:329-356.
65. Schachter, F., Faure-Delanef, L., Guenot, F., Rouger, H., Frogvel, P., Lesueur-Ginot L.: Genetic associations with human longevity at the apo E and ACE loci. *Nat Genet.* 6:29-32, 1994.
66. Moorjani, S., Gaudet, D., Laberge, C., Thibault, C. M., Mathieu, J., Morissette, J., Lupien, J. P., Brun, D., Gagne, C.: Hypertriglyceridemia and lower LDL cholesterol concentration in relation to apolipoprotein E phenotypes in myotonic dystrophy. *Can J Neurol Sci.* 16:129-133, 1989.
67. Eto, M., Watanabe, K., Makino, I., Ishi, K.: Apolipoprotein E allele frequencies in non-insulin-dependent diabetes mellitus with hypertriglyceridemia (type IIb, III, IV and V hyperlipoproteinemia). *Metabolism.* 40:776-80, 1991.
68. Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., Ikeda, K.: Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* 541:163-6, 1991.

69. Strittmatter, W. J., Weisgraber, K. H., Huang, D. Y., Dong, L. M., Salvesen, G. S., Pericak-Vance M, et al.: Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta-peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90:8098-102, 1993.
70. Benjamin, R., Leake, A., Edwardson, J. A., McKeith, I. G., Ince, P. G., Perry, R. H.: Apolipoprotein E genes in lewy body and Parkinson's disease. *Lancet*. 343:1565, 1994.
71. Hardy, J., Crook, R., Perry, R., Raghavan, R., Roberts, G.: Apo E genotype and Down's syndrome. *Lancet*. 343:979-80, 1994.
72. Waring, S. C., O'Brien P. C., Kurland, L. T., Thibodeau, S. N., Tsai, M. S., Petersen, R. C.: Apolipoprotein E allele in chamorros with amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex. *Lancet*. 343:611, 1994.
73. Saunders, A. M., Roses, A. D.: Apolipoprotein E4 allele frequency, ischemic cerebrovascular disease and Alzheimer disease. *Stroke*. 24:1416-7, 1993.
74. Zivelin, A., Rosenberg, N., Peretz, H., Amit, Y., Kornbrot, N., and Seligsohn, U.: Improved method for genotyping apolipoprotein E polymorphisms by a PCR-based assay simultaneously utilizing two distinct restriction enzymes. *Clin Chem*. 43(9):1657-1659, 1997.
75. Miller, S. A., Dykes, D. D., and Polesky, H. F.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16(3):1215, 1988.
76. Warnick, G. R., Mayfield, C., Albers, J. J., Hazzard, W. R.: Gel isoelectric focusing method for specific diagnosis of familial hyperlipoproteinemia type 3. *Clin Chem*. 1979:279-84, 1979.
77. Eto, M., Watanabe, K., Ishii, K.: A rapid flat gel isoelectric focusing method for the determination of apolipoprotein E phenotypes and its application. *Clin Chim Acta*. 149:21-8, 1985.
78. Mailly, F., Davignon, J., Nestruck, A., C.: Analytical isoelectric focusing with immobilized pH gradients of human apolipoprotein E from very low density lipoproteins and total plasma. *J Lipid Res*. 31:149-55, 1990.
79. Utermann, G., Weisgraber, K., H., Weber, W., Mahley, R. W.: Genetic polymorphism of apolipoprotein E: a variant form of apolipoprotein E2 distinguished by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J Lipid Res*. 25:378-82, 1984.
80. Kataoka, S., Paidi, M., Howard, B. W.: Simplified isoelectric focusing/immunoblotting determination of apoprotein E phenotype. *Clin Chem*. 40:11-3, 1994.

81. McDowell, I. F. W., Wisdom, G. B., Trimble, E. R.: Apolipoprotein E phenotype determined by agaros gel electrofocusing and immunoblotting. *Clin Chem.* 35:2070-3, 1989.
82. Eichner, J. E., Kuller, L. H., Ferrel, R. E., Kamboh, M. E.: A simplified method for screening the apolipoprotein E polymorphism. *Human Heredity.* 41:61-4, 1991.
83. Smeets, B., Poddighe, J., Brunner, H., Ropers, H. H., Wieringa, B.: Tight linkage between myotonic dystrophy and apolipoprotein E revealed with allele specific oligonucleotides. *Hum Genet.* 80:49-52, 1988.
84. Richard, P., Thomas, G., Zulueta, M. P.: Common and rare genotypes of human apolipoprotein E determined by specific restriction profiles of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Clin Chem.* 40:24-9, 1994.
85. Emi, M., Wu, L. L., Robertson, M. A.: Genotyping and sequence analysis of apolipoprotein E isoforms. *Genomics.* 3:373-9, 1988.
86. Funke, H., Rust, S., Assman, G.: Detection of apolipoprotein E variants by an oligonucleotide melting procedure. *Clin Chem.* 32:1285-9, 1986
87. Tsai, M. Y., Suess, P., Schwichtenberg, K.: Determination of apolipoprotein E genotypes by single-strand conformational polymorphism. *Clin Chem.* 39:2121-4, 1993.
88. Main, B. F., Jones, P. J. H., Macgillivray, R. T. A., Banfield, D. K.: Apolipoprotein E genotyping using the polymerase chain reaction and allele specific oligonucleotide primers. *J Lipid Res.* 32:183-7, 1991.
89. Hixson, J. E., Vernier, D. T.: Restriction isotyping of human apolipoprotein E by gene amplification and cleavage with HhaI. *J Lipid Res.* 31:545-548, 1990.
90. Pronai, L., Ichikawa, Y., Nakazawa, H., Arimori, S.: Enhanced superoxide generation and the decreased superoxide scavenging activity of peripheral blood leukocytes in Behçet's disease-effects of colchicine. *Clin Exper Rheumat.* 9:227-233, 1991.
91. Değer, O., Örem, A., Bahadır, S., Yıldırım, S.: PMN elastase levels in patients with Behçet's disease. *Clin Chim Acta.* 236:129-134, 1995.
92. Raza, K., Thambyrajah, J., Townend, J. N., Exley, A. R., Hortas, C., Filer A., Carruthers, D. M., Bacon, P. A.: Suppression of inflammation in primary systemic vasculitis restores vascular endothelial function : Lessons for atherosclerotic disease. *Circulation.* 102:1470-1472, 2000.
93. Prior, O., Symmons, D., Scott, D.: Cause of death in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol.* 23: 92-99, 1984
94. Celermajer, D. S., Sorensen, K. E., Gooch, V. M.: Noninvasive detection of

- endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis. *Lancet*. 340:1111-1115, 1992.
95. Örem, A., Çimşit, G., Değer, O., Vanizor, B., Karahan, S. C.: Autoantibodies against oxidatively modified low-density lipoprotein in patients with Behçet's disease. *Dermatology*. 198:243-246, 1999.
 96. Fries, J. F., Hunder, G. G., Bloch, D. A.: The American collage of rheumatology 1990 criteria for the classification of vasculitis: summary. *Arthritis Rheum*. 33:1135-1136, 1990.
 97. Luqmani, R., Bacon, P., Moots, R.: Birmingham vasculitis activity score (BVAS) in systemic necrotizing vasculitis. *QJM*. 87:671-678, 1994.
 98. Ohguchi, M., Ohno, S., Tanaka, K., Matsuda, H., Sugiura, S.. Studies on serum lipids in patients with Behçet's disease. In Inaba G. (Ed). *Behçet' disease*. Tokyo: University of Tokyo Press. 1982, pp177-181.
 99. Mitamura, T., Shigeaki, O., Atiga, H., Ohsaka, T., Iwasaki, N., Matsuda, H., Matsumiya, H.: Lipoprotein cholesterol concentrations in patients with Behçet's disease. *Clin Chim Acta*. 175:277-284, 1988.
 100. Örem, A., Değer, O., Memiş, Ö.: High lipoprotein (a) levels as a thrombogenic risk factor in Behçet's disease. *Ann Rheum Dis*. 53(5):351-352, May 1994.
 101. Örem, A., Efe, H., Değer, O., Çimşit, G., Uydu, H. A., Vanizor, B.: Relationship between lipid peroxidation and disease activity in patients with Behçet's disease. *J Derma Sci*. 16:11-16, 1997.
 102. Mahley, R. W., Palaoğlu, K. E., Atak, Z., Dawson-Pepin, J., Langlois, A-M., Cheung, V., Onat, H., Fulks, P., Mahley, L. L., Vakar, F., Özbayrakcı, S., Gökdemir, O., Winkler, W.: Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins and apolipoproteins. *J Lipid Res*. 36:839-859, 1995.
 103. Malle, E., Pfeiffer, K. P., Dugi, K., Pfeiffer, C., Glaum, M., Oezcuernemez, M., Kloer, H. U., Steinmetz, A.: Polymorphisms of apolipoproteins A-IV and E in Turkish population living in Germany. *Hum Genet*. 98:285-290, 1996.
 104. Eskandari, H. G.: Çukurova bölgesinde apo E polimorfizminin kan lipid parametreleri üzerine etkisi. *Uzmanlık tezi, Çukurova Üniv. Tıp fakültesi., Adana* 1197.
 105. 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 Invest*. 71:277-280, 1993.
 106. Shimano, H., Ishibashi, S., Murase, T., Gotohda, T., Yamada, N., Takaku, F.: Plasma apolipoproteins in patients with multi-infarct dementia. *Atherosclerosis*. 79:257-60, 1989.

- 107 Diedrich, J. F., Minnigan, H., Carp, R. I., Whitaker, J. N., Race, R., Frey, W., Haase, A. T.: Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin in astrocytes. *J Virol.* 65:4759-68, 1991.
- 108 Ballerini, C., Campani, D., Rombola, G., Gran, B., Nacmias, B., Amato, M., Siracusa, G., Bartolozzi, L., Sorbi, S., Massacesi L.: Association of apolipoprotein E polymorphism to clinical heterogeneity of multiple sclerosis. *Neuroscience Letters.* 296:174-176, 2000.
- 109 Nourhashemi, F., Andrieu, S., Solera, M. L., Rolland, Y., Ousset, P. J., Pous, J., Navaux, F., Vellas, B. J., Albaredo, J. L.: Low Alzheimer 's disease prevalence in rheumatoid arthritis patients is unrelated to Apo E genotype. *E J Internal Medicine.* 10:97-100, 1999.
- 110 Gambardella, A., Aguglia, U., Cittadella, R., Romeo, N., Sibilis, G., LePiane, E., Messina, D., Manna, I., Oliveri, R. L., Zappia, M., Quattrone, A.: Apolipoprotein E polymorphisms and the risk of nonlesional temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 40(12):1804-7, Dec 1999.
- 111 Moriwaki, Y., Yamamoto, T., Takahashi, S., Tsutsumi, Z., Higashino, K.: Apolipoprotein E phenotypes in patients with gout: relation with hypertriglyceridaemia. *Rheum Dis.* 54(5):351-4, may 1995.
- 112 Eggertsen, G., Tegelman, R., Ericsson, S., Angelin, B., Berglund, L: Apolipoprotein E polymorphism in a healthy Swedish population:variation of allele frequency with age and relation to serum lipid concentrations. *Clin Chem.* 39:2125-9.1993.
- 113 Porkka, K. V. K., Taimela, S., Kontula, K., Lehtimäki, T., Aalto-Setälä, K., Akerblom, H. K., Vilkari, J. S. A.: Variability gene effects of DNA polymorphisms at the apo B, apo A1/CIII and apo E loci on serum lipids: the cardiovascular risk in Young Finns study. *Clin Genet.* 45:113-21, 1994.
- 114 Kaprio, J., Ferrell, R. E., Kottke, B. A., Kamboh, M., I., Sing, C. F.: Effects of polymorphisms in apolipoproteins E, A-IV and H on quantitative traits related to risk for cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb.* 11:1130-48, 1991.
- 115 Eto, M., Watanabe, K., Ishii, K.: A racial difference in apolipoprotein E allele frequencies between the Japanese and Caucasian populations. *Clin Genet.* 30:422-7, 1986.
- 116 Hanis, C. L., Hewett-Emmett, D., Douglas, T. C., Bertin, T. K., Schull, W. J.: Effects of the apolipoprotein E polymorphism on levels of lipids, lipoproteins and apolipoproteins among Mexican- Americans in Starr County, Texas. *Arterioscler Thromb.* 11:362-70, 1991.

ÖZGEÇMİŞ

1969'da Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Trabzon'da tamamladı. 1987'de KTÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü kazandı. 1991'de Fen-Edebiyat Fakültesi ikincisi olarak mezun oldu. Aynı yıl KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisansa başladı. 1993'te KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. 1994'te Yüksek Lisansını tamamladı. Aynı yıl KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında Doktora Programını kazandı. Halen Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Tıbbi Laboratuvar Bölümünde Öğretim Görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.