



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GAZİANTEP VE ÇEVRESİNDE YAŞAYAN
AİLESEL HİPERKOLESTEROLEMİ HASTALARINDA LDLR VE APOB
GENLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

Murat KORKMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

GAZİANTEP

2016

**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİANTEP VE ÇEVRESİNDE YAŞAYAN
AİLESEL HİPERKOLESTEROLEMİ HASTALARINDA LDLR VE APOB
GENLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

Murat KORKMAZ

Tez Savunma Tarihi: 13.07.2016
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi İmzası

Prof. Dr. Ahmet ARSLAN

Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Yrd. Doç. Dr. Önder YUMRUTAŞ

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlamasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün akademik bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

13.07.2016

Murat KORKMAZ

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve çalışmamın bütün aşamalarında bilgi, tecrübe, destek ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans dönemim boyunca bilgi ve önerileri ile bize yol gösteren Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocamız Prof. Dr. Ahmet ARSLAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince katkı ve yardımlarını esirgemeyen hocalarımız Prof. Dr. Ecir Ali ÇAKMAK, Doç. Dr. Mustafa ULAŞLI, Yrd. Doç. Dr. Yusuf Ziya İĞCİ, Doç. Dr. Mehri İĞCİ, Yrd. Doç. Dr. Shameem Saadat ve Yrd. Doç. Dr. Önder YUMRUTAŞ'a teşekkür ederim.

Laboratuvarda beraber çalıştığımız, iyi ve kötü günlerimde her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım, Arş. Gör. Sevil KIRKBEŞ, Ebru TEMİZ, Yunus ŞAHİN, Seçil DEMİRAL, Zekiye ALTAN, İbrahim Halil ÇİTÇİ, Esra BOZGEYİK, İbrahim BOZGEYİK ve Seçil EROĞLU'na teşekkür ederim.

Bugünlere gelmeme vesile olan, beni yetiştirip büyüten, maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli AİLEM'e teşekkür ederim.

SİMGE VE KISALTMALAR

ACAT: Ail Kolesterol Ail Transferaz,
AH: Ailesel Hiperkolesterolemi
APOB: Apolipoprotein B,
AUG: Başlama Kodonu,
cDNA: Complementary DNA,
CRP: C Reaktif Protein,
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit,
EGF: Epidermal Growth Factor,
HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein,
HMG-CoA: Hidroksi Metil Glutaril-Koenzim A,
IDL: Ara (orta) Yoğunluklu Lipoprotein,
ISP: Ion Sphere Particles,
KAH: Koroner Arter Hastalığı,
KKH: Koroner Kalp Hastalığı,
KV: Kardiyovasküler,
LCAT: Lesitin Kolesterol Ail Transferaz,
LDL-K: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterolü,
LDLR: Low Density Lipoprotein Receptr (Düşük yoğunluklu lipoprotein almacı),
LP: Lipoprotein,
LPL: Lipoprotein Lipaz,
LRP: LDL reseptörü ile ilişkili protein,
NGS: Next Generation Sequencing (Yeni Nesil Dizileme)
OFR: Open Reading Frames (Okuma erevesi),
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu,
PGM: Personal Genomic Machine
RNA: Ribo Nükleik Asit,
UTR: Untranslated Region (Proteine Dnşmeyen Bölgeler)

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
SİMGE VE KISALTMALAR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ateroskleroz.....	5
2.1.1. Epidemiyoloji.....	5
2.1.2. Etiyoloji	6
2.1.3. Aterosklerozun Biyolojik ve Genetik Yapısı.....	12
2.2. Ailesel Hiperkolesterolemi	15
2.2.1. Epidemiyoloji.....	15
2.2.2. Etiyoloji	16
2.2.3. Biyolojisi ve Genetik Yapısı.....	17
2.2.4. Ailesel Hiperkolesterolemi Tanısı	19
2.2.5. Ailesel Hiperkolesterolemi Tedavisi	22
2.3. Lipoproteinler	24
2.3.1. Şilomikronlar	26
2.3.2. VLDL.	26
2.3.3. IDL....	27
2.3.4. LDL... ..	27
2.3.5. HDL... ..	27

2.3.6. LDL Almacı	28
2.3.7. LDLR Geni	29
2.4. Apolipoproteinler	29
2.4.1. Apo B-100.....	30
2.4.2. Apo B-48.....	30
2.4.3. Apo C-I, apo C-II, apo C-III	30
2.4.4. Apo E.	31
2.4.5. Apo A-I.....	31
2.4.6. Apo (a)	31
2.5. APOB Geni	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Örneklerin Toplanması	34
3.2. DNA Eldesi.....	34
3.3. DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	35
3.4. Primer Havuzlarının Tasarımı	35
3.5. Kütüphane Hazırlanması.....	36
3.5.1. Primer Dizinlerini Kısmi Olarak Kesme	38
3.5.2. Amplikonlara Adaptörleri Bağlama ve Saflaştırma.....	38
3.5.3. Bağlanma Reaksiyonu	39
3.6. Amplifiye Edilmemiş Kütüphanenin Saflaştırılması.....	40
3.6.1. Saflaştırma Basamakları	40
3.7. Çoğalmış kütüphaneleri Qubit® 2.0 Fluorometer Cihazı İle Ölçme	41
3.7.1. Kütüphaneyi Çoğaltma	41
3.7.2. Çoğalmış Kütüphaneyi Saflaştırma	42
3.8. Qubit® 2.0 Fluorometer: Kütüphaneyi Ölçme ve Sulandırma Faktörünü Hesaplama.....	43
3.9. Template Hazırlama.....	44

3.10. Template-Pozitif Ion PGM™ Hi-Q™ ISP'lerin Enrichment Sistemiyle Eldesi ...	46
3.11. Yeni Nesil Dizileme.....	48
3.12. Verilerin Analizi	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Çip Yükleme Görüntüsü	52
4.2. Çip Yükleme Özeti	53
4.3. Çip İyon Küre Parçacıkları (ISP) Özeti	54
4.4. Okuma Uzunluğu Detayları	55
4.5. Okuma Eşleşme Oranları	56
4.6. Ham Veri Doğruluğu	57
4.7. Okuma Eşleşme Kalitesi.....	58
4.8. Ortalama Okuma (Coverage) Değerleri.....	59
4.9. LDLR Mutasyonları.....	60
4.10. APOB Mutasyonları	61
4.11. LDLR Geninde Yeni Mutasyonlar	62
4.11.1. Aynı Aile Bireylerinde Yeni Homozigot Delesyon.....	62
4.11.2. Bir Hastada Yeni İki Bazlık Heterozigot Delesyon.....	63
5. TARTIŞMA	64
6. KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. TEKHARF’de ölüm sebebi dağılımı.....	6
Şekil 2.2. Aterosklerotik lezyonların gelişim evreleri.....	13
Şekil 2.3. LDL’nin damar intima kılıfında oksitlenmesi ve aterom oluşumu	14
Şekil 2.4. LDLR yolağı ve taşınımı	18
Şekil 2.5. Ailesel Hiperkolesterolemi’nin farklı klinik bulguları	19
Şekil 2.6. Bir lipoprotein yapısı.....	24
Şekil 2.7. LDLR geni.....	29
Şekil 2.8. APOB geni.	33
Şekil 3.1. Kütüphane saflaştırma basamakları.....	40
Şekil 3.2. Template reaksiyonu aşamalarının şematize edilmiş hali.	46
Şekil 4.1. Yeni Nesil Dizileme aşamasına ait çip görüntüsü.....	52
Şekil 4.2. Yeni Nesil Dizileme aşamasına ait çip yükleme özeti.	53
Şekil 4.3. Yeni Nesil Dizileme aşamasında kullanılan ve okunmuş olan ampliconların uzunluk detay grafiğı.	55
Şekil 4.4. Yeni Nesil Dizileme sonrası gerçekleştirilen okumaların eşleşme grafiğı.....	56
Şekil 4.5. Yeni Nesil Dizileme sonrası elde edilen ham veri doğruluk detay grafiğı. ...	57
Şekil 4.6. LDLR Geninde tespit ettiğimiz aynı aileye mensup 4 hastadaki yeni bir bazlık homozigot delesyon.	62
Şekil 4.7. LDLR Geninde tespit ettiğimiz bir hastadaki yeni iki bazlık heterozigot delesyon.	63

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Aterosklerozun kalıtsal tahminleri, risk faktörleri ve genetik çeşitlilik yüzdeleri.....	11
Tablo 2.2. Ailesel hiperkolesteroleminin klinik tanısı için kullanılan kriterler	21
Tablo 2.3. Lipoproteinlerin özellikleri	25
Tablo 2.4 Başlıca Apolipoproteinler.	32
Tablo 3.1. Hedef Gen Bölgelerinin çoğaltılması için gerekli reaksiyon karışımının içerikleri.	36
Tablo 3.2. Hedef Gen Bölgelerinin çoğaltılması için gerekli ısı döngüleyici ayarları. .	37
Tablo 3.3. Hedef Gen Bölgelerinin çoğaltılması için gerekli döngü sayısı belirleme seçenekleri.	37
Tablo 3.4. Primer dizinlerini kısmi olarak kesme işlemi için gerekli ısı döngüleyici ayarları	38
Tablo 3.5. Barkod adaptörlerin dilüsyonu için gerekli içerenler	39
Tablo 3.6. Bağlanma reaksiyonu için gereken içerenler	39
Tablo 3.7. Bağlanma reaksiyonu için gerekli ısı döngüleyici ayarları.....	40
Tablo 3.8. Kütüphaneyi çoğaltma için gerekli ısı döngüleyici ayarları.	42
Tablo 3.9. Template reaksiyonunda kullanılan dilüe kütüphane oranları.	45
Tablo 3.10. Template reaksiyonu için gereken reaktifler ve yükleme sıraları.	45
Tablo 3.11. Melt-off solüsyonu için gereken bileşenler.	46
Tablo 3.12. Zenginleştirme (Enrichment) Aşaması için gerekli reaktifler.	47
Tablo 4.1. Yeni Nesil Dizileme aşamasına ait çip ISP Özeti.....	54
Tablo 4.2. Yeni Nesil Dizileme sonrası gerçekleştirilen okumaların eşleşme sayı ve oranları	56
Tablo 4.3. Yeni Nesil Dizileme sonrası elde edilen eşleşme kalitesi tablosu.	58
Tablo 4.4. Yeni Nesil Dizileme aşaması sonrası elde edilen ortalama okuma (coverage) değerleri.	59
Tablo 4.5. LDLR genine ait tespit ettiğimiz ekzonik mutasyonlar.	60
Tablo 4.6. APOB genine ait tespit ettiğimiz ekzonik mutasyonlar.	61

ÖZET

GAZİANTEP VE ÇEVRESİNDE YAŞAYAN AİLESEL HİPERKOLESTEROLEMİ HASTALARINDA LDLR VE APOB GENLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Murat KORKMAZ

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı: Doç. Dr. Serdar ÖZTUZCU

Haziran 2016, 75 sayfa

Ailesel Hiperkolesterolemi (AH) dünyada en sık görülen genetik hastalıklardan biridir. Öyle ki, 500 kişiden biri bu hastalıktan etkilenmektedir. Bu hastalık, plazma düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-K) seviyelerinde artışa sebebiyet veren ve hayatın erken dönemlerinde erken koroner arter hastalığı ve diğer kardiyovasküler hastalıkların riskini artıran, otozomal dominant geçiş gösteren bir genetik bozukluktur. Hastaların büyük çoğunluğunda düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör (LDLR) geninde mutasyon bulunmaktadır. Hastalığın ortaya çıkmasının diğer bir yaygın sebebi ise apolipoprotein B proteinini kodlayan APOB genindeki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. AH'nin erken tanısı, hastalıktan uygun korunma ve erken tedavilere olanak sağlayarak erken koroner arter hastalığı ve diğer kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklı erken ölüm risklerini azaltır. Hastalığın erken tanısında moleküler tanı önemli bir yere sahiptir. Bu çalışmada, AH hastası on bireyde bu hastalık ile ilişkili iki önemli gen olan LDLR ve APOB genlerinin, yeni nesil dizileme yöntemi kullanarak tüm gen dizilemesini yapılmıştır. Elde ettiğimiz bulgulara göre, LDLR geninde, bir hastada homozigot, bir hastada heterozigot literatürde tanımlı patojenik mutasyon saptanmıştır. Ayrıca aynı aileden 4 bireyde ortak ekzonik bölgede literatürde tanımlı olmayan yeni bir delesyon saptanmıştır. APOB geninde ise, üç hastada heterozigot, iki hastada homozigot patojenik mutasyon saptanmıştır. Ayrıca bu gende hipertrigliseridemi ve diğer apolipoprotein B hasarlarına yol açan mutasyonlar saptanmıştır. Ek olarak, iki gende de hastalığın seyrini etkileyebilecek dönüşümler belirledik. Hiperkolesteroleminin erken tanı ve tedavisi oldukça önemlidir ve yeni nesil dizileme yöntemi ile bu hastalıkla ilişkili genlerdeki mutasyonların tamamının ortaya çıkarılması, kişiye özgü hastalığın tanısı ve hastalığın seyrinin belirlenmesi açısından büyük öneme sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Ailesel Hiperkolesterolemi, LDLR, APOB, Yeni Nesil Dizileme

ABSTRACT

MOLECULAR ANALYSIS OF LDLR AND APOB GENES IN PATIENTS WITH FAMILIAL HYPERCHOLESTEROLAEMIA IN GAZIANTEP AND SURROUNDING AREAS

Murat KORKMAZ

Master of Science Thesis, Department of Medical Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Serdar OZTUZCU

June 2016, 75 pages

Familial Hypercholesterolemia (FH) is one of the most common genetic disorders worldwide. One in 500 people is affected by this disease. FH is an autosomal dominant genetic disorder leads to elevation of plasma level of low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and increment in the risk of early coronary artery disease and other cardiovascular diseases in the early stages of life. The majority of FH patients have mutations in their gene encoding low-density lipoprotein receptor (LDLR). The other common cause of this disease is APOB gene mutation encoding mutant apolipoprotein B (APOB). Early diagnosis of FH allows chance for early treatments and reduces the risk of death by both coroner artery and other cardiovascular diseases. Molecular methods are considered as a significant diagnostic approach for early diagnosis of the disease. In the present study, we aimed to sequence of genes LDLR and APOB that are considered significantly related with the disease by using Next Generation Sequencing method in 10 patient with FH. We found two pathogenic mutations in LDLR gene in two patients, one homozygote and one heterozygote. We also detected a novel deletion in exon 4, common of four family members. We found pathogenic mutations in APOB gene of five patients, three heterozygote and two homozygote. We also detected mutations which cause hypertriglyceridemia and other apolipoprotein B injuries in this gene. In addition to this, we determined the alternations may affect the course of disease in two genes. Early diagnosis and treatment of hypercholesterolemia are very important and revealing of all mutation in disease-associated genes by Next Generation Sequencing method has great importance for seity diagnosis and determining the course of disease.

Keywords: Familial Hypercholesterolemia, LDLR, APOB, Next Generation Sequencing

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Ailesel hiperkolesterolemi muhtemelen en sık görülen tek gen düzensizliğidir. Hastalık, yüksek seyreden düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-K) düzeyleri, tendon ksantomaları ve genellikle 45 yaş öncesi görülen korneal arkuslarla karakterizedir. Hastalığın otozomal dominant olarak görülme sıklığı neredeyse 100% dür. Hastalık ilk kez 1923 de ksantomalar ve kolesterol düzeylerinin ilişkisi ile ortaya konmuştur (1, 2).

Lipidlerin ve lipoproteinlerin plazmada birikimi, aterosklerotik lezyonların gelişiminde birincil anahtar süreçtir. Bu lezyonların artmasıyla da damarların lümeni tıkanmaya ve ardından normal kan akımı engellenmeye başlar. Ateroskleroz, dünyada ölümlerin en sık sebebi olan koroner arter hastalığı ve diğer kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur. Ailesel Hiperkolesteroleminin erken tanısı, lipid miktarını düşürücü ajanlarla uygun tedavilerin başlanarak, Ateroskleroza neden olan bu ciddi komplikasyonların gelişmesinden önce engellenmesi ve azaltılması yönünde oldukça büyük öneme sahiptir (2, 3).

Ailesel Hiperkolesteroleminin tanısı genellikle; 45 yaşlarından önce ortaya çıkan tendon ksantomaları ya da korneal arkuslar gibi fiziksel belirtilerle, kandaki LDL-K düzeyi gibi laboratuvar bulgularıyla ve hastanın yüksek LDL-K düzeyi ile birlikte kardiyovasküler hastalık geçmişi değerlendirilerek konulabilir. Bu fiziksel belirtiler hastalığın teşhisi için en azından üç yaklaşım sunar. Ancak, bu fiziksel belirteçlerin yokluğu hastalığın tanısını göz ardı etmek anlamına gelmemektedir. Çünkü Heterozigot Ailesel Hiperkolesterolemi hastalarının yaklaşık yarısında bu fiziksel belirtiler gözlemlenmemektedir ve bunu takiben Heterozigot Ailesel Hiperkolesterolemi hastalarında genellikle erken koroner arter hastalığına dair bulgular görülmez. Üstelik bazı monogenik hiperkolesterolemilerde, lipid plazma düzeyleri normal aralıklara yakın seviyede seyretmektedir. Bu gibi nedenlerle, Ailesel Hiperkolesteroleminin tanısının doğrulanmasında DNA tabanlı genetik testlerin gerekliliği ortadadır (2, 4).

Ailesel Hiperkolesterolemi hastalarının büyük çoğunluğunda 19. Kromozomun kısa kolu üzerinden bulunan düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör (LDLR) geni hasar görmüş durumdadır. Bu da düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) partiküllerinin hücreler tarafından yetersiz alınımı ve plazmada LDL-K birikimi ile sonuçlanır. Çok yüksek

plazma LDL-K düzeylerine sahip 55 yaş öncesi insanların yarısından fazlasında erken koroner arter hastalığı riski oldukça yüksektir. LDLR geninde saptanan yüzlerce mutasyonun Ailesel Hiperkolesterolemiye yol açtığı gösterilmiştir (2, 5).

Fenotipik özellikler olarak Ailesel Hiperkolesterolemi ile neredeyse aynı olan Ailesel Defektif Apolipoprotein B, apolipoprotein B (APOB) genindeki mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Bu mutasyonlar APOB proteinin LDLR tarafından tanınmasını engeller ve böylece LDL partikülleri kusurlu APOB'a bağlanır ve hücre tarafından alınmaları gerçekleşemez. Yine bunların yanında LDLR mutasyonları hücre tarafından tanımama, hücre yüzeyine bağlanma ama LDL bağlayama, taşınamama ve işlev kaybı gibi farklı mutasyon çeşitlerine sahiptir. APOB genindeki çeşitli mutasyonlar Ailesel Defektif Apolipoprotein B ile ilişkili olmakla birlikte en fazla p.(Arg3527Gln) ortak olarak tespit edilmiştir. Bu gendeki mutasyonlar ağırlıklı olarak 26. Ekzon üzerinde yoğun şekilde tespit edilmiştir. Ailesel Hiperkolesterolemiye yol açan, bu en önemli iki gen olan LDLR ve APOB genlerinde yerleşik olan diğer bölgelerde var olabilecek mutasyonların yeni nesil dizileme yöntemi ile ortaya çıkarılması ve bunun klinikte uygulanabilirliğinin oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (2, 5, 6).

Bu tez çalışmasında; Gaziantep ve çevresindeki illerde yaşayan Ailesel Hiperkolesterolemi hastalarında, bu hastalık ile ilişkili; LDLR ve APOB genlerinin yeni nesil dizileme yöntemi kullanılarak tüm gen dizilemesi, bu genlerdeki mutasyonların tespiti, daha önce bu genlerde tespit edilmemiş yeni mutasyonların tespiti ve bu hastalığın teşhisinde genetik tanının öneminin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

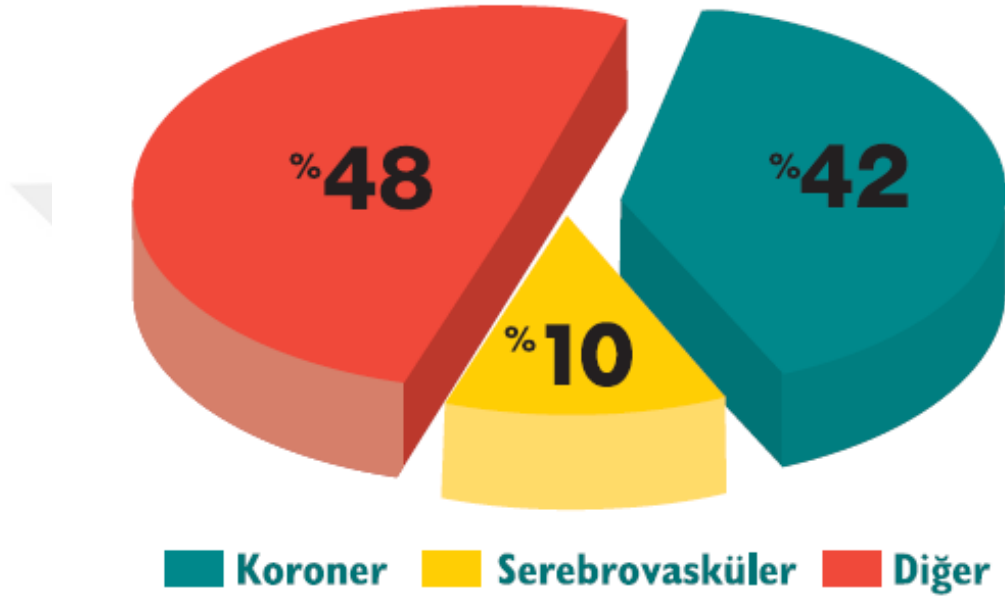
2.1.1. Epidemiyoloji

Ateroskleroza bağı kardiyovasküler hastalıklar dünyadaki ölümlerin en büyük sebebidir. Sadece 2008 yılı içerisinde 17 milyondan fazla insan bu hastalık yüzünden ölmüştür. Bu ölümlerin 3 milyondan fazlası 60 yaş altı bireylerde meydana gelmesinin yanında, hastalığın özellikle bu bireylerde önlenabilir olduğu belirtilmiştir (7). ABD 2004 yılı verilerine göre erkeklerin %65'i ve kadınların %47'sinde aterosklerotik kardiyovasküler hastalığın ilk belirtisi bir kalp krizi veya ilk belirtilerin bir saat sonrasında ortaya çıkan ölüm olarak belirtilen ani kardiyak ölüm şeklinde olmuştur (8). Kardiyovasküler hastalıktan kaynaklı erken ölümlerin oranı gelişmiş ülkelerde %4 ve düşük gelirli ülkelerde %42 oranında bir yüzdelik fark göstermektedir. Son on yıl içerisinde kardiyovasküler hastalıklara bağı ölümler yüksek gelirli ülkelerde azalırken, düşük ve orta gelirli ülkelerde hızla artış göstermektedir (7).

Kardiyovasküler hastalıklar ve ani kalp krizine bağı ölümlerin oranı en gelişmiş ülkelerde 20. yüzyılın ortalarından itibaren önemli bir azalış göstermektedir. Birleşik Krallık'ta 1950 yılında orta yaşlarda (35-69) görülen ölümler 100000 erkek hastanın 700'ünde görülürken, yıl 2010'u gösterdiğinde bu oran 200 hastanın daha azına kadar gerilemiştir. Yine aynı standartlarda gerçekleşen çalışmanın bu kez bayan nüfusunda, sayı 1950'de 450 iken 2010'da 100 hastanın altına kadar gerilemiştir. Kadınlar ve erkekler birlikte ele alınırsa, 35 yaşından itibaren 35 yıl içerisindeki vasküler ölüm riski (69 yaşından önceki vasküler ölüm riski) 1980'de %16 iken, bu oran 2010'da %4 e kadar gerilemiştir. Veriler genel olarak değerlendirildiğinde, küresel olarak ateroskleroze bağı ölümler yine birinci sırada olmaya devam etmektedir (9).

Ülkemizde de ateroskleroza bağı gelişen kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklı ölümler birinci sırada yer almaktadır. Türkiye'de Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri Sıklığı Taraması (TEKHARF) verileri incelendiğinde ülkemizde koroner arter hastalığı (KAH) görülme sıklığı 45-54 yaş grubunda %6 iken, 55-64 yaş grubunda %17 civarına, 65 yaş ve üzerindeki bireylerde ise %28 dolaylarına kadar yükselmektedir. Söz

konusu görülme sıklıkları 1990 yılındakilere kıyasla 50 yaş üstü kesimde %80 oranında artmıştır. Ülkemizde yine TEKHARF çalışmasının verilerine göre tüm ölümlerin %42'si koroner kalp hastalığına, %10'u da serebrovasküler hastalıklara bağlıdır. Bu iki veri bir araya getirildiğinde ateroskleroza bağlı ölümler hemen hemen tüm ölümlerin yarısından sorumlu gibi gözükmemektedir (10) (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. TEKHARF’de ölüm sebebi dağılımı (10).

2.1.2. Etiyoloji

Ateroskleroza sebep olabilen çeşitli anatomik, fizyolojik, davranışsal ve genetik risk faktörleri bildirilmektedir (8). Ateroskleroza bağlı gelişen kardiyovasküler hastalıkların yaklaşık %80’inin ortaya çıkması; sigara, yüksek kan basıncı, lipidlerin hasarı, glukoz metabolizması, yüksek oranda tuz alınımı, doymuş yağlar ve rafine şekerlerinin alınımı gibi sağlıksız beslenmeler ve fiziksel hareketliliğin azlığı gibi faktörlerle açıklanabilir. Bunların yanı sıra yine birçok faktör de ateroskleroza neden olabilmektedir (7).

Ateroskleroza dair kanıtlar, ergenlik dönemindeki ve genç erişkinlerin otopsilerinde ortaya çıkarılmıştır. Bu klinik operasyonlarda, aterosklerozun oluşum sürecinde oluşan

lezyonlar olan ateromların hayatın erken dönemlerinde bile ortaya çıkabileceği görünür olarak kanıtlanmıştır (7).

Kardiyovasküler hastalıklara yol açan ve büyük öneme sahip olan risk faktörleri şu şekilde detaylandırılabilir:

Sigara

Sigara kullanımı ve temel aterosklerotik hastalık mekanizmaları arasındaki ilişki açıkça belirtilmiştir. Sigaranın ateroskleroza bağlı kardiyovasküler hastalık riskini neredeyse iki kat arttırdığı ortaya konmuştur (7).

Serum Lipidleri

Serum lipidleri ve aterom oluşumları arasındaki ilişki yaklaşık yüz yıl önce yapılan çalışmalarda ilk kez ortaya konmakla birlikte birçok çalışmada serum lipidlerinin anormal düzey farklılıklarının ateroskleroz meydana gelmesinde çok önemli bir risk faktörü olduğu vurgulanmıştır. Özellikle HMG-CoA baskılayıcı olan statinler gibi lipid düşürücü ajanlarla gerçekleştirilen tedaviler sonucu ortaya çıkan veriler bu risk faktörünün hastalığa direk etkili olabildiğini göstermiştir (7).

Kan Basıncı

Yüksek kan basıncının kötü ve şiddetli kardiyovasküler sonuçlarıyla bağlantılı olduğu çok sayıda deneysel ve gözlemsel çalışmayla ortaya konmuştur ve bu bağlantılar hem metabolik hem de fonksiyonel düzeyde karakterize edilmişlerdir (7).

Diastolik kan basıncının (DKB), kardiyovasküler hastalıklarda bağımsız ve önemli bir belirteç olduğu prospektif kohort çalışmaları ve karma klinik çalışmalarla birlikte kabul edilmiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda sistolik kan basıncı (SKB) üzerinde durulmuş ve hastalık riskiyle çok daha güçlü bir ilişkiye sahip olduğu gösterilmiştir (7).

Kronik stres, fiziksel aktivite ve vücut ağırlığı gibi çeşitli faktörler kan basıncı düzeylerini belirlemede etkilidir. Ancak en büyük rolü beslenme ve özellikle de tuz alınımları oynamaktadır. Bulguların büyük çoğunluğu tuz tüketiminin kan basıncı seviyeleri

üzerinde muhtemelen tek başına en büyük faktör olduğunu göstermiştir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar doğrultusunda keşfedilen biyolojik mekanizmalar, INTERSALT yada INTERMAP gibi ekolojik çalışmalar sonucu elde edilen epidemiyolojik bulgular ve bir prospektif kohort çalışması olan EPIC-Norfolk'tan elde edilen veriler bu bilgileri doğrular niteliktedir. Bu bilgiler ışığında; birçok toplumda nüfusun tamamında tuz tüketiminin azaltılmasına yönelik girişimler, kan basıncı seviyelerinin düşürülmesinde en önemli etkenlerden biri olmuştur (7).

Obezite

Obezlik ve aşırı kilolu olmanın enerji alımının ve harcanmasının dengesizliği ile bağlantısı olduğu bildirilmiştir. Günümüzdeki fiziksel, kültürel ve tüketime yönelik ortamlar obezitenin 20. Yüzyılın sonları ve 21. Yüzyılın başlarında bildirilen görülme sıklığının giderek artmasının güçlü birer göstergesidir (7).

Adipoz (yağ) dokusu metabolik olarak aktiftir ve vücut ağırlığı dengesini ve insülin direncini kontrol eden mediatörlerin (aracıların) salınmasında görev alır. En önemlisi, endotelial disfonksiyonu ve ateroskleroza sebep olan trombotik yolları ve inflamasyonu etkiler. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, obezite ile diyabetin ve artmış kardiyovasküler hastalık risk faktörlerinin güçlü bir bağlantısı vardır ve bu bağlantılar da artan ölüm oranları ve çeşitli kanser türleri ile ilişkilendirilebilmektedir (7).

Ancak yine de obezitenin tek başına etkisinin muhtemelen az olduğu belirtilmiştir. Etkisinin en çok, daha güçlü risk faktörleri olan; SKB, artmış kolesterol ve diyabet gibi risk faktörleri ile birlikte görüldüğünde arttığı gözlemlenmiştir (7).

Diyabet

Diyabet, koroner arter hastalığı (KAH) riskini kadınlarda yaklaşık olarak 5.1 kat, erkeklerde ise 2.4 kat artıran önemli bir risk faktörüdür. Ayrıca, genç yaşta ateroskleroz oluşumlarını hızlandırır. Anormal glukoz metabolizmasının tüm seviyeleri kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir ve arteriyal makrovasküler ateroskleroz esas olarak diyabetin tetiklemesi sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (7).

İnsanlarda diyabetle gelişen aterosklerozun gelişimini hızlandıran mekanizma karmaşıktır ve muhtemelen endotelial disfonksiyonunu, inflamatuvar aracılığı, hipertansiyonu ve böbrek yetmezliğini içine alır (7).

Şaşırtıcı olmayan şekilde diyabetli erişkinlerde meydana gelen ölümlerin temel sebebi kardiyovasküler olaylara bağlanmaktadır ve bu hastaların %80'inde kardiyovasküler hastalıklar gözlemlenmektedir (7).

Fiziksel Hareketsizlik

Fiziksel hareketliliğin azlığı 1950'lerden beri kardiyovasküler hastalıklar ve genel ölüm oranları ile ilişkilendirilmektedir. Çalışmalardan elde edilen bulguların büyük bir kısmı, sürdürülen hareketli yaşam tarzının, kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüm oranlarını %20-35 civarlarında azalttığını göstermiştir. Bunlara ek olarak fiziksel hareketliliğin, zihinsel sağlık, diyabet, bazı kanser türleri ve osteoporoz gibi hastalıkları kademeli şekilde azalttığı bildirilmiştir (7).

Fiziksel olarak hareketliliğin artırılması; artan HDL seviyeleri, azalan kan basıncı, insülin direncinin gelişmesi, glukoz toleransı ve Tip 2 Diyabet riskinin azaltılması gibi diğer kardiyovasküler hastalık risk faktörlerini azaltıcı durumların azaltılmasını da katkı sağlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar çok az hareketliliğin bile, sürekli televizyon izlenimi, bilgisayar kullanımı gibi nedenlerle aktivitesi azalan Lipoprotein Lipaz (LPL) sisteminin aktif hale getirilmesini sağladığını göstermiştir. LPL sistemi, plazma trigliserit katabolizması, HDL kolesterolü ve diğer metabolik risk faktörlerinin kontrolünde öneme sahiptir (7).

Diyet Şekilleri ve Diğer Beslenme Faktörleri

Kalbi koruyucu besinlerin biçimleri ve diyet şekillerinin faydaları yedi ülkeyi içeren bir çalışmada değerlendirilmiştir. Meyve sebzelerin alınımı, cevizler, tam tahıllı ürünler ve balığın olumlu etkilerinin yanı sıra, trans yağ içeren ürünlerin, glisemik indeksi yüksek olan içeceklerin ve işlenmiş etlerin doğurabileceği olumsuz etkilere yer verilmiştir. Dahası, Akdeniz tipi beslenme çeşidinin farklı kontrollerle doğrulanarak faydaları ortaya konmuştur. Sonuç olarak, yararlı diyet şekillerinin kardiyovasküler koruyucu besinlerin alınımı ile sağlanabileceği belirtilmiştir (7).

Özetlenecek olursa, uygun diyet şekillerinin kardiyometabolik faydaları ortadadır. Bu besinler; lif içeren besinler, sağlıklı yağ asitleri, vitaminler, antioksidanlar, potasyum, diğer mineraller ve fitokimyasallar olarak sınıflandırılırken, rafine karbonhidratların, şekerlerin, tuzun, doymuş yağ asitlerinin ve trans yağların alımının azaltılmasının faydaları kaynaklarda belirtilmiştir (7).

Alkol

Alkol tüketiminin artması ile kalp krizinden kaynaklı ölümlerinin seviyelerinin artması arasındaki ilişki arasında büyük bir netlik olduğu bildirilmiştir(7).

Birçok ülkede yapılan çalışmalarda yüksek oranda alkol tüketiminin kardiyovasküler hastalık riskini artırırken, az alımının veya azaltılmasının riski azalttığı gösterilmiştir(7).

Bu gibi sebeplerden ötürü alkol tüketimi, İngiliz Kalp Vakfı, Ulusal Kalp Forumu ve Amerikan Kalp Derneği tarafından tavsiye edilmemektedir(7).

Diğer Risk Faktörleri

Diğer tüm risk faktörlerine ek olarak; sosyoekonomik çevreler, yaşam alanları, hayat standartları, sosyal ve çevresel etkiler de kardiyovasküler hastalıklar üzerinde önemli rol alabilmektedir. Bahsi geçen bu faktörlerden etkilenen çocuklarda erken yaşta koroner arter hastalığı riski artabilmektedir. Yine yaşanan bölgedeki geleneksel beslenme öğünleri ve gündelik yaşamın, stres, hareket azlığı gibi getirebileceği sonuçlarla nitelendirilebilecek bu dış etkenler de önemli birer risk faktörüne dönüşebilmektedirler (7).

Genetik Faktörler

Ateroskleroza bağlı gelişen koroner kalp hastalıklarının gelişim sürecinde genetik faktörler de önemli bir yere sahiptir. Tüm genom üzerine yapılan son çalışmalarla birlikte aterojezinin düzenlenmesinde görev alan 50'nin üzerinde gen tanımlanmıştır. Belirlenen gen bölgelerinin %40'luk kısmı aterojeze sebep olan risk faktörlerini düzenlediği tespit edilmesine rağmen, geriye kalan %60'luk kısmın işlevi halen tam olarak

bilinememektedir. Bu bilgiden de yola çıkılarak ateroskleroza patofizyolojisine dair verilerin hala tamamlanmış olmadığı ve tanımlanmaya ihtiyaç olan birçok genetik bölgenin ve bunların işlevlerinin tespit edilmesi gerektiği sonucu çıkarılabilmektedir (7).

Karmaşık genetik hastalıklar çok sayıda genden kaynaklanmaktadır ve bu durumuyla Mendel tipi kalıttan farklı seyretilmektedir. Ateroskleroz için büyük risk faktörü sayılan, hiperkolesterolemi, hipertansiyon ve diyabet gibi hastalıkların karmaşık genetik düzensizliklerinin tanımlanması oldukça önemlidir. Bu genetik risk faktörlerinin bahsedilen ilişkili hastalıklarla ilişkisi genom çaplı işbirliği çalışmaları (GWAS) adı altında çalışılarak yeni mutasyonlar tanımlanmış ve hastalıklarla genetik etkiler arasında ilişkiler ortaya konmuştur (7) (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Ateroskleroza kalıtsal tahminleri, risk faktörleri ve genetik çeşitlilik yüzdeleri (7).

Risk faktörü	Kalıtım	GWAS tarafından tanımlanan bölge sayısı	GWAS tarafından açıklanan genetik çeşitlilik yüzdesi
Koroner Arter Hastalığı/Miyokard Enfarktüsü	40-50%	46	6%
Kan Basıncı	~30%	28	0.9%
Diyabet	26%	63	~10%
LDL Kolesterolü	45-60%	36	~25-30%
HDL Kolesterolü	47-62%	47	~25-30%
Lp(a)	65-94%	4	~20%
Sigara Bağımlılığı	~50%	5	~1%

GWAS, genome-wide association studies (genom çaplı işbirliği çalışmaları); LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; Lp(a), lipoprotein(a).

2.1.3. Aterosklerozun Biyolojik ve Genetik Yapısı

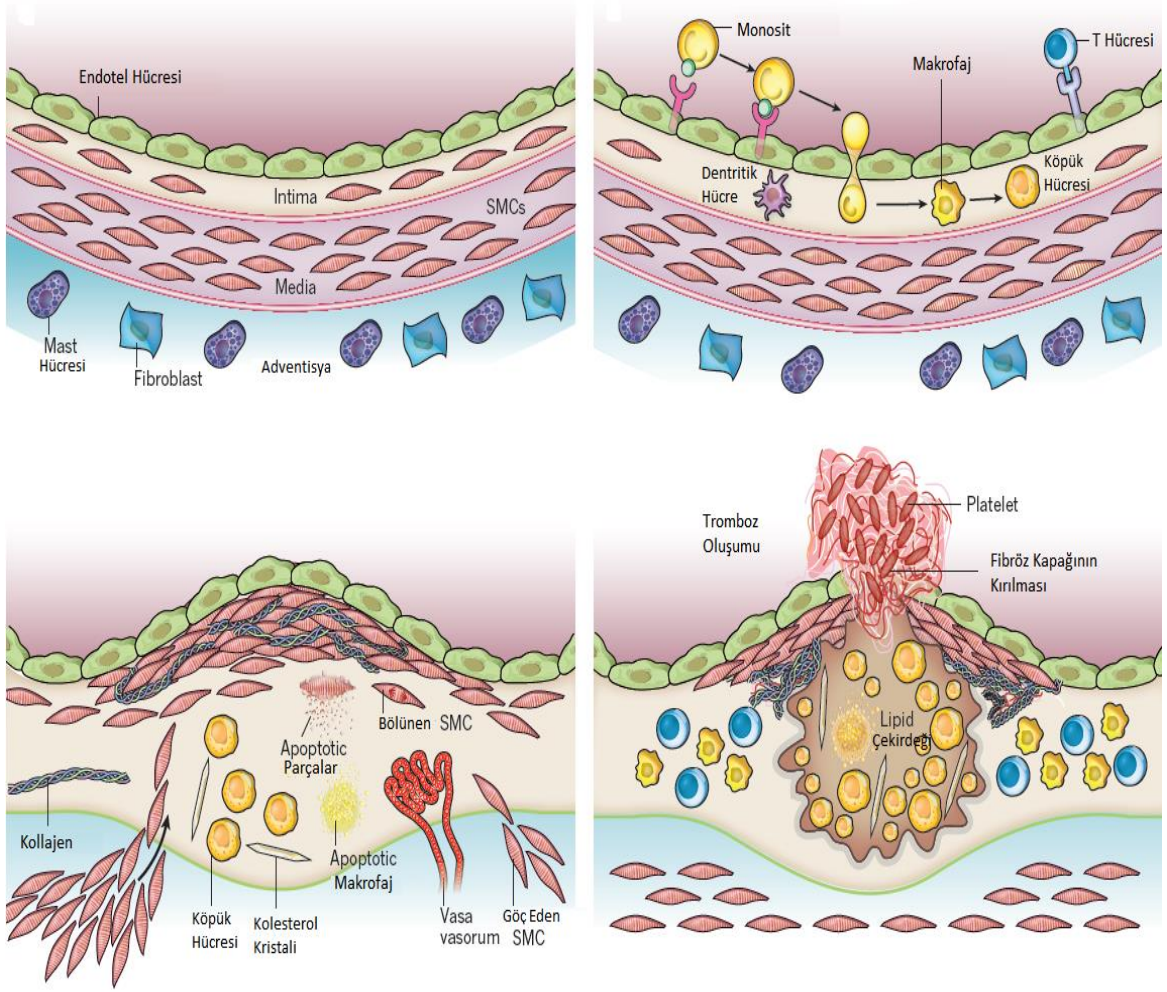
Vücutta normal bir arter üç tabakadan meydana gelmektedir. En içte bulunan ve intima kılıfı olarak adlandırılan tabaka; kanın üzerini örten en alt katman zarı oluşturan endotel hücrelerinden oluşmaktadır. Ateroskleroz deneylerinde kullanılan birçok hayvan türünün aksine, insandaki intima kılıfı içerisinde kusursuz kas hücreleri (SMC) olarak adlandırılan hücreler yerleşik halde gözlemlenmiştir. Medya kılıfı adı verilen orta tabakada ise SMC'ler karmaşık bir hücre dışı matrisi içine gömülü vaziyette bulunmaktadır. Ateroskleroz deneylerinde çalışılan arterler genellikle elastik yapıdaki arterlerdir. Bunun sebebi ise, medya kılıfında sınırları açıkça belli olan SMC'lerin tabakaları arasındaki yalancı elastin katmanları sayesinde, bu arterlerin görünür hale gelmesidir. Arterin en dışında bulunan ve adventisya adı verilen tabaka ise, mast hücrelerini, sinir uçlarını ve mikro damarları içermektedir (11).

Aterosklerozun başlama aşamaları; lökositlerin aktive edilmiş endotel tabakaya yapışması, bağlanmış lökositlerin intima kılıfına doğru yönlendirilmiş göçü, monositlerin makrofajlara olgunlaşması (çok sayıda lökositin toplanmasıyla gerçekleşmektedir) ve köpük hücrelerin oluşması basamaklarını içermektedir (11).

Lezyon gelişimi, SMC'lerin medya kılıfından intimaya göçü, intima kılıfında yer alan ve medya kılıfından türeyen SMC'lerin çoğalması ve kollajen, elastin ve proteoglikanlar gibi hücre dışı matris makromoleküllerinin artan sentezi ile gerçekleşmektedir (11).

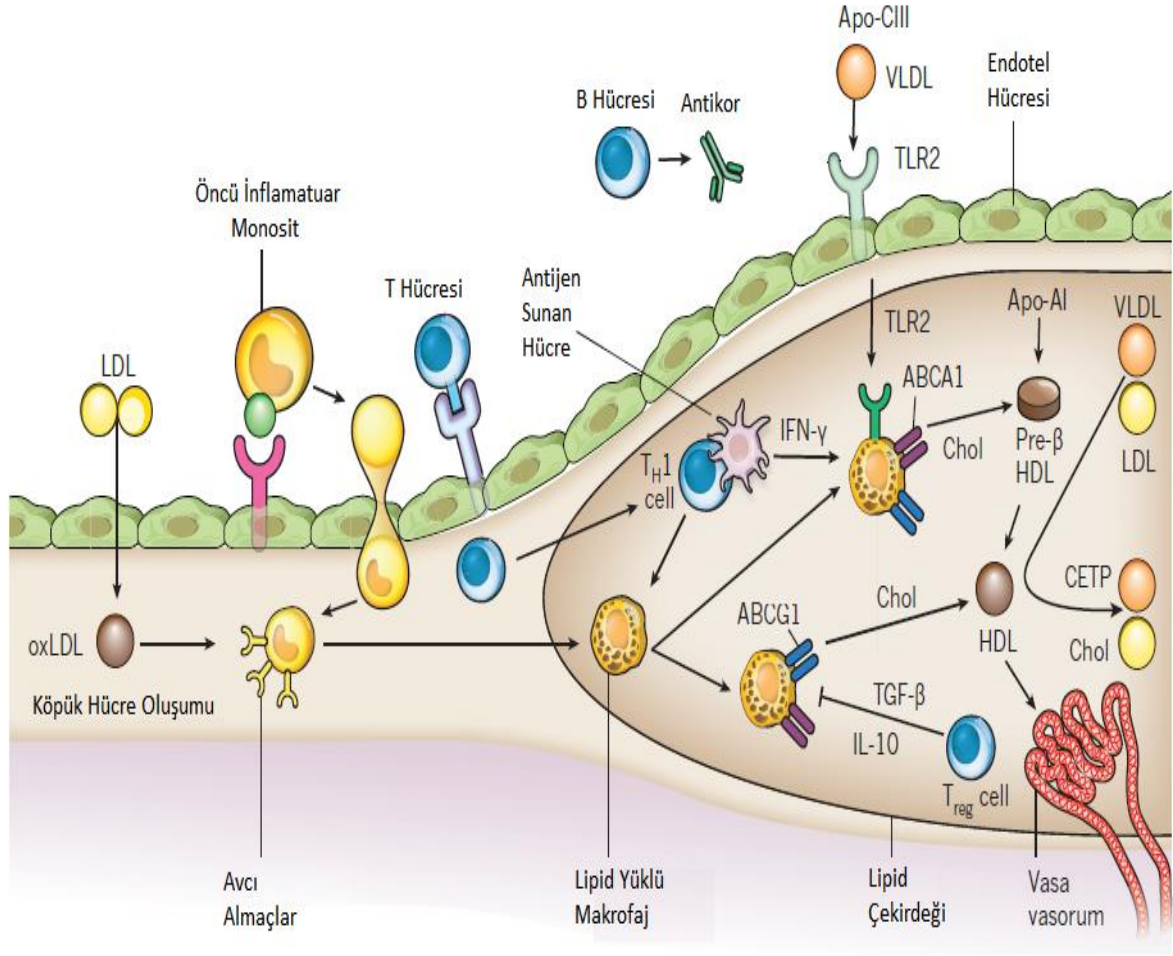
Plaklaşmış makrofajlar ve SMC'ler ilerleyen lezyonlarda ölebildikleri gibi bazıları da apoptoz ile ölürlür. Ölmüş ve ölmekte olan hücrelerden türeyen hücre dışı yağ bir plağın merkez bölgesinde toplanabilir ve bunlar genellikle lipit veya nekrotik çekirdek olarak adlandırılmaktadır. İlerleyen plaklar ayrıca kolesterol kristalleri ve mikro damarları da içerebilirler (11).

Aterosklerozun en son komplikasyonu olan tromboz, sıklıkla aterosklerotik plağın fiziksel olarak parçalanmasını zorlaştırmaktadır. Etkin kan pıhtılaşma bileşenlerinin, plağın iç kısmındaki doku faktörlerine gelerek etkileşime geçtiği fibröz kapağındaki bir kırık, trombozun damar lümenine kadar uzanmasını tetikleyerek, kan akışının engellenmesine yol açmaktadır (11) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Aterosklerotik lezyonların gelişim evreleri (11).

LDL'nin damar intima kılıfında oksitlenmesi (oxLDL) ateromların meydana gelmesinin ilk basamağıdır. oxLDL tarafından uyarılan endotel hücreleri, kandaki monositlerin damar duvarına doğru hareket etmesine neden olur. Monositlerin makrofajlara dönüşümü ve kümelenmiş oxLDL'nin avcı almaçlar tarafından bu hücrelerin içine doğru alınması sonucu köpük hücreler adı verilen hücreler oluşur. Damar düz kas hücrelerinin uyarılması bu hücrelerin harekete geçmesine ve çoğalmasına neden olur. Doku Faktörü (Tissue Factor, TF), düz kas hücreleri ve makrofajların yüzeyinde belirginleşir ve birikmiş fibrinin, fibrinojene dönüşmesine neden olmaktadır (8) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. LDL'nin damar intima kılıfında oksitlenmesi ve aterom oluşumu (11).

2.2. Ailesel Hiperkolesterolemi

2.2.1. Epidemiyoloji

Ailesel Hiperkolesterolemi (AH) en sık gözlenen kalıtsal hastalıklardan biridir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 620.000 kişinin bu hastalıktan etkilendiği gösterilmiştir (2, 12, 13). 1920'lerden itibaren süregelen kolesterol hastalıkları ve ilişkilendirilmelerinin akabinde, 1964' te AH'nin otozomal dominant (OD) kalıtmı bir hastalık olduğu tanımlanmış ve hastalık, fenotipik ciddiyetine göre hafif form (heterozigot) ve şiddetli form (homozigot) olarak sınıflandırılmıştır (2, 14). Brown ve Goldstein, kandaki LDL partiküllerinin hücre yüzeyinde bulunan almaçlar aracılığıyla hücre içine alındığını keşfetmişlerdir ve keşfettikleri bu almaçlara LDL reseptörü (almacı) (LDL-R) adını vermişlerdir (2, 15). Bu iki bilim adamı 1986'da OD hiperkolesterolemiye neden olan moleküler hasarın LDL-R kodlayan gende işlevsel mutasyon sonucu meydana geldiğini ortaya çıkarmışlar ve bu keşif sayesinde Nobel Ödülü'nü kazanmışlardır (2, 16).

AH, Fredrickson sınıflamasına göre genellikle tip 2a hiperlipidemi hastalarını içermektedir fakat tip 2b hatta tip 3 hiperlipidemi hastaları da bu grupta yer alabilmektedir (2, 17, 18). Heterozigot AH (HeAH) hastalarına tedavi uygulanmazsa erkeklerde 4. on yılda, kadınlarda ise 5. on yılda kardiyovasküler hastalıklara (KV) ait klinik bulgular görülmeye başlanır. Bunun yanında, homozigot AH (HoAH) hastalarında ciddi KV bulgular ortalama yirmili yaşlarda, hatta erken çocukluk döneminde ortaya çıkmaya başlar (2, 19). 60 yaşında altındaki miyokart enfarktüsü (ME) geçirmiş hastaların yaklaşık %5'i, 45 yaş altı ME hastalarının neredeyse %20'si AH nedeniyle meydana geldiği gösterilmiştir (2, 20, 21).

HoAH, nadir görülen ve görülme sıklığı milyonda bir olan bir hastalık türü olmasının yanı sıra heterozigot türünde görülme sıklığı beş yüz de bir olan orana göre daha erken ve şiddetli KV hastalık ile ilişkilidir (2, 19). Ülkemizde de HoAH ile ilgili çok az sayıda çalışma bulunmakla birlikte, toplumumuzdaki görülme sıklığı, bu hastalarda erken tanı, yaklaşım, tedavinin etkinliği, sağ kalım düzeyi gibi durumlar detaylı şekilde bilinmemektedir. Ancak, gerek akraba evliliklerinin fazlalığı, gerekse geleneksel beslenme alışkanlıklarından da yola çıkılarak bu oranın tahminlerden fazla olması beklenmektedir (22, 23). HoAH, kendi içinde LDLR aktivitesine göre almaç-negatif (LDL-R aktivitesi normalin $\leq$ %2'si) ve almaç-hasarlı (LDL-R aktivitesi normalin %2-25'i) olmak üzere ikiye ayrılır. Anne ve babası heterozigot AH taşıyıcısı olan bir çocukta

%25 olasılıkla hasarlı iki gen de aktarılır ve homozigot AH (anne ve babadan aktarılan hasarlı genler aynı ise) veya birleşik (compound) heterozigot AH (anne ve babadan aktarılan hasarlı genler farklı ise) meydana gelmektedir (2). HoAH hastalarında total kolesterol (TK) ve LDL-K düzeyleri sırasıyla 650-1000 mg/dl arasında ve >600 mg/dl olarak seyretmektedir (2, 24). Ayrıca bu hastalarda azalmış yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ve normal trigliserid seviyelerine rastlanılmaktadır. Plazma lipoprotein(a) düzeyleri de genellikle yüksek halde seyretmektedir (2).

HeAH, en sık görülen kalıtsal hastalıklardan biridir. Batı toplumlarında görülme sıklığı 300 de 1 veya 500 de 1 arasında değişkenlik göstermektedir. Yine ülkemizde oldukça ciddi bir yaygınlık göstermektedir (2, 19). Lübnanlı Hristiyanlar, Fransız asıllı Kanadalılar, Hollandalı Afrikalılar, Aşkanezi Yahudileri, Asyalı Hintliler ve Güney Afrika toplulukları gibi bazı toplumlarda 50-100'de 1 gibi yüksek görülme sıklığında hasarlı gen taşıyıcılığı, yapılan çalışmalar sonucunda gözlemlenmiştir (2) (25). HeAH hastalarında TK ve LDL-K düzeyleri sırasıyla 350-550 mg/dl ve 200-400 mg/dl arasında değişkenlik göstermektedir (2, 12, 24).

2.2.2. Etiyoloji

AH'nin etiyojisinde başta LDL reseptörü (almacı) olmak üzere, apolipoprotein B (Apo B) veya proprotein konvertaz subtilisin/keksin 9 (PCSK9) ve birçok genin mutasyonu rol oynayabilir (26-28). AH hastalarının yaklaşık %85'inde hastalıktan sorumlu olan mutasyon LDL reseptörü geninde bulunmaktadır. LDL reseptörü geni 19. kromozomda klonlanıp haritalanmış olup bugüne kadar AH'ye yol açan 1700'ün üzerinde mutasyon gösterilmiştir (26, 29-31).

Serum lipidlerindeki düzey farklılıkları; aterom plakların oluşmasında büyük bir risk faktörüdür. Serum kolesterol seviyesi %300 mg/dl'nin üzerinde bulunan bireylerde hiperkolesterolemiye bağlı olarak koroner aterosklerotik kalp hastalıkları gelişimi tehlikesi, serum kolesterol seviyesi %200 mg/dl'nin altındaki bireylerden 4 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir (32, 33).

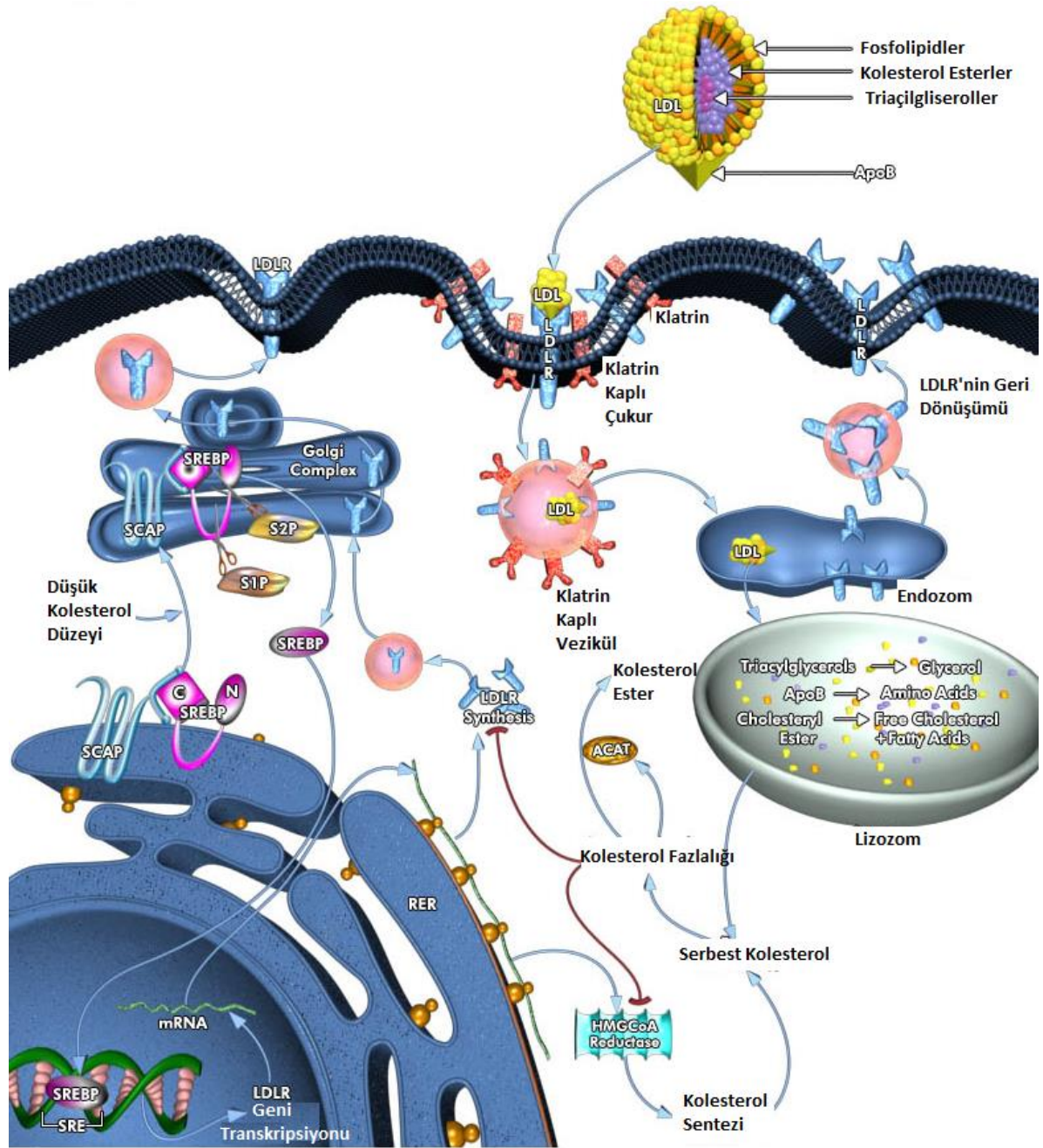
Ailede erken KKH hikayesi (1.derece erkek akrabalarda <55, 1.derece kadın akrabalarda <65 yaş, ME veya ani kalp ölümü bulunması), düşük HDL – kolesterol (<40 mg/dL)'dir. HDL-kolesterol koroner arter hastalığına karşı koruyucudur ve >60 mg/dL düzeylerinde risk faktörlerini önemli derecede azalttığı belirtilmiştir (32, 34).

2.2.3. Biyolojisi ve Genetik Yapısı

LDLR geninde ortaya çıkan mutasyonların sonucunda ortaya çıkan aşırı artmış serum LDL-K gibi lipoprotein partiküllerinin plazma seviyeleri; vasküler endotel hasarı, monositlerin makrofaj ve ardından köpük hücrelerine dönüşümü, aterosklerotik lezyonların gelişimi, erken ortaya çıkan koroner arter hastalığı, periferik arter hastalığı ve aort darlığı gibi kapak hastalıklarının meydana gelmesinde en önemli etkenlerdendir (2, 35-37).

AH, LDL-K düzeylerini belirleyen LDL-R, apolipoprotein B (APOB), pro-protein konvertaz subtilisin/keksin 9 (PCSK9) veya daha az sıklıkla LDLR adaptör protein 1 (LDLRAP 1) proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu gelişir (2, 13). Fransa'da yürütülen bir çalışmadaki hasta grubuna göre her genin AH'ye etki ettiği oranlar; LDLR geni %73.9, APOB geni %6.6 ve PCSK9 geni için de %0,7 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmadaki olguların %18'inde ise herhangi bir genetik mutasyon saptanmamıştır. Buradan da bu hastalıkla ilgili henüz ortaya çıkarılmayan genetik mutasyonlar ve ilişkili olabilecek yeni genlerin olabileceğine işaret edilmiştir (2, 38).

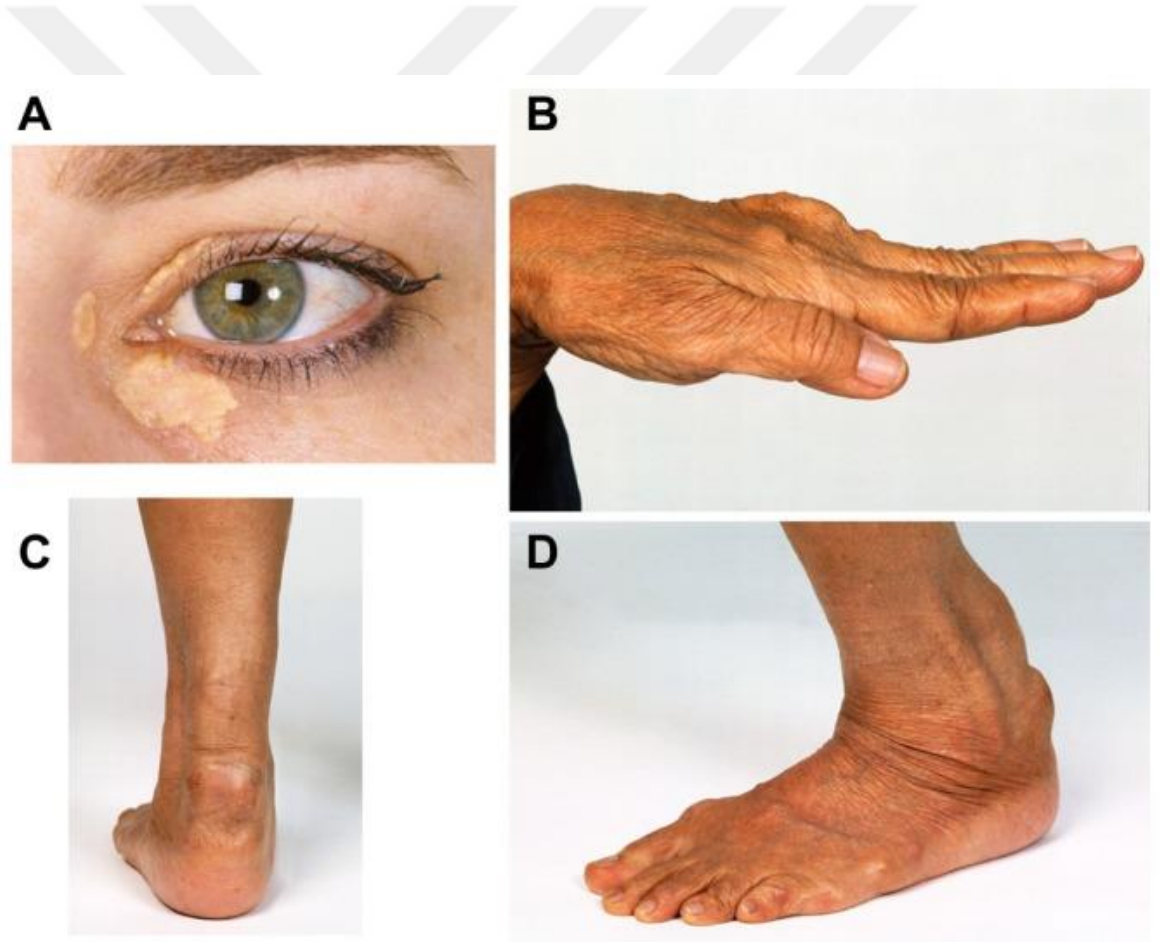
LDLR, hepatositlerin yüzey kısımlarında bulunan glikoprotein yapıda bir almaçtır. LDL taneciklerinin yüzeyindeki ApoB'a bağlanarak almaç-ligand karmaşımı oluşturmaktadır. LDL tanecikleri LDL almacına bağlanırlar, bu almaçlar kltrin kaplı çukurlara taşınmaktadırlar (1, 2). Bu çukur tomurcuklanıp hücre içine, kltrin kaplı bir vezikül olarak alınır. Vezikülün üzerindeki kltrinler tekrar hücre yüzeyine geri giderler, vezikül ise bir geç endozom adı verilen bir karmaşım ile kaynaşır. Buradaki asidik ortamdan dolayı LDL, almacından ayrışır, almaç bir geri dönüşüm vezikülü ile hücrenin yüzeyine doğru tekrar hareket eder. LDL lizozomda parçalanır, içindeki kolesterol onun zarına dahil olur, ardından protein bölümünü oluşturan aminoasitler ise sitoplazmaya geçerler (39) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. LDLR yolağı ve taşınımı (40).

2.2.4. Ailesel Hiperkolesterolemi Tanısı

AH özellikle çocuk yaşlarda tanısı ortaya konmayan ve yeterli bir şekilde uygun tedavi süreci izlenemeyen bir hastalıktır. Hastaların yaklaşık olarak %20'sine tanı konulabilir (2, 24). AH olgularında, erken dönemlerde görülen KV hastalıkların ortaya çıkma riskinin normal nüfusa oranla 20 kat arttığı gösterilmiştir (24). Hastalığın erken tanısını, uygun korunma ve tedaviye imkan tanıyarak KV hastalıklardan kaynaklı ölüm oranlarını azalttığı bildirilmiştir. Klinik bulgular hastalığın tanısının koyulmasında öncelikli bir yaklaşım sunmaktadır. AH tanısında; tendon ksantomaları ve genellikle 45 yaş öncesi görülen korneal arkuslar gibi klinik bulgular, aile öyküsü ve yüksek kolesterol düzeyi gibi etkenlerin bir arada değerlendirilmesinden yararlanılmaktadır (2) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Ailesel Hiperkolesterolemi'nin farklı klinik bulguları (41).

A) Korneal arkus ve ksantelezma, B) Ekstansör tendon ksantomaları, C) ve D) Aşil tendon ksantomaları

Tendon ksantomları, en fazla aşil tendonunda görülürken daha az sıklıkta el parmaklarının ekstansör kaslarında daha az sıklıkla görülebilmektedir. Diz kapaklarında da daha nadir de olsa görülebilmektedirler (2). Tendon ksantomları genç olgularda daha az görülmektedir. Aşil tendonundaki ksantomlar tendonlarda meydana gelen iltihaplanmalardan dolayı ortaya çıkmaktadırlar. AH'de normal nüfusa kıyasla göre 6 kat fazla gözlemlenmektedir (2, 42). Bazı HeAH olgularında trigliserit kalıntılarının birikmesi sonucu nadiren tüberöz ksantomları meydana gelebilmektedir. HoAH olgularında ise kalıntı birikmesi oldukça fazladır ve haliyle tüberöz ksantomlar daha fazla görülmektedirler (2, 25).

Korneal arkuslar eğer 45 yaşından önce ortaya çıkarsa AH tanısında önemli bir belirteç haline gelmektedir. Tüberöz ksantomlar veya ksatelazmalar AH için özgün değildir ancak erken yaştaki olgularda gözlemlenirse AH tanısı göz önünde bulundurulmalıdır. Yine de tüm bu klinik bulguların yokluğu, AH'nin tanısını göz ardı etmek anlamına gelmemektedir (2).

AH'nin klinik tanısında kullanılan uluslararası kabul edilmiş bir tanı kriteri bulunmamaktadır. Farklı ülkelerde farklı şekillerde hazırlanmış ve kullanılmakta olan kriterler bulunmaktadır (2). En yaygın olarak başvuru ve kabul gören tanı kriteri dizileri; Amerika Birleşik Devletlerinde, MEDPED (Make Early Diagnosis to Prevent Early Death - Erken Ölümden Korunmak İçin Erken Teşhis Koy) (43), Birleşik Krallık'taki UK Simon Broome (44) ve Hollanda'daki Dutch Lipid Clinic (29) kriterleridir (1, 2, 19) (Tablo 2.2). Bu kriterler Hollandalı ve İngiliz bilim adamları tarafından geliştirilmiş olup; aile öyküleri, özgeçmiş, fiziksel bulgular ve genetik mutasyonlara ek olarak kolesterol düzeylerini kapsamaktadır. Bu kriterlere göre hastalar kesin, muhtemel ve olası AH sınıflarına ayrılmışlardır. MEDPED kriterlerindeki farklılık, tanı kriteri olarak sadece kolesterol seviyelerinden yararlanmasıdır (2, 29, 44).

Tablo 2.2. Ailesel hiperkolesteroleminin klinik tanısı için kullanılan kriterler (2)**ABD: MEDPED kriterleri**

Total kolesterol (ve LDL-K) düzeyleri, mg/dl					
Yaş (yıl)	Birinci derece akraba	İkinci derece akraba	Üçüncü derece akraba	Normal popülasyon	Risk
<18	220 (155)	230 (165)	240 (170)	270 (200)	
20	240 (170)	250 (180)	260 (185)	290 (220)	%98 özgüllük
30	270 (190)	280 (200)	290 (210)	340 (240)	%87 duyarlılık
40+	290 (205)	300 (215)	310 (225)	360 (260)	

Birleşik Krallık: “Simon Broome Registry” kriterleri

Total Kolesterol düzeyleri	Özellik	Risk
Erişkin: >290 mg/dl	(190) DNA mutasyonu	Kesin AH
Çocuk: >260 mg/dl	(155) Hastada veya birinci/ikinci derece akrabasında tendon ksantomları	Kesin AH
	İkinci derece akrabada <50 yaş veya birinci derece akrabada <60 yaş ME için aile öyküsü veya erişkin birinci veya ikinci derece akrabada >290 mg/dl TK veya çocuk ya da < 16 yaş 260 (155) mg/dl TK için aile öyküsü	Olası AH

Hollanda: “Dutch Lipid Clinic” kriterleri

Puan	Özellik	Risk
1 puan	Birinci derece akrabada erken başlangıçlı KVH veya >95.persantilde LDL-K düzeyi veya erken başlangıçlı PAH veya SVH veya 155-189 mg/dl LDL-K düzeyi	
2 puan	Birinci derece akrabada tendinöz ksantom veya korneal arkus veya <18 yaş birinci derece akrabada >95. persantilde LDL-K düzeyi veya KAH öyküsü	
3 puan	190-249 mg/dl arasında LDL/K düzeyi	Olası AH
4 puan	<45 yaş altı hastada korneal arkus	(3-5 puan)
5 puan	250-329 mg/dl arasında LDL-K düzeyi	
6 puan	Tendon ksantomu	Muhtemel AH
8 puan	>330 mg/dl LDL-K düzeyi veya LDLR geninde fonksiyonel mutasyon	(6-7 puan) Kesin AH (>8 puan)

AH: Ailevi hiperkolesterolemi, LDL-K: Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol, TK: Total kolesterol, KVH: Kardiyovasküler hastalık, PAH: Periferik arter hastalığı, SVH: Serebrovasküler hastalık, KAH: Koroner arter hastalığı, ME: Miyokart enfarktüsü, LDLR: LDL alması.

2.2.5. Ailesel Hiperkolesterolemi Tedavisi

AH'de başta statin olmak üzere birçok antilipit ajanlarla tedavi sağlanabilmektedir. AH'de hastalığın şiddeti LDLR yoğunluğuna bağlıdır. Bu nedenle HoAH'de statin gibi antilipit ajanlar vasıtasıyla istenilen LDL-K seviyelerini elde etmek oldukça zor hatta imkânsıza yakındır. Dolaşımdaki aterojenik ApoB içeren lipoproteinlerin mekanik olarak temizlenmesi temeline dayayan aferez tedavisi, halen HoAH'de en etkili tedavi yöntemidir. Elbette hiperkolesteroleminin doymuş yağları içermeyen, kolesterolü oldukça az içeren diyet programları bu hastalar için de uygulanmalıdır. Ancak, LDL-K düzeylerine bu diyetin etkisi çok sınırlıdır. Diyetle birlikte tüm risk faktörlerine yönelik yaşam tarzı değişiklikleri her yaştaki HoAH olgusuna uygulanmalıdır. Hastalara fiziksel hareketlilik programları önerilirken koroner lezyonlar ve aort darlığının şiddetinin göz önüne alınması gerektiği bildirilmiştir (22, 45).

Antilipit tedavi (statinler), AH hastalarında tanının ardından uygulanmaya başlayan önemli bir ilaç tedavisi yöntemidir. HoAH olgularında LDL-K düzeylerini istenilen değerlere çekmese de KV durumların ortaya çıkmasını engellemesi veya ötelemeleri sebebiyle tanı ilk konduğu anda hastaya uygun kabul edilebilir en yüksek dozla tedaviye başlanılmalıdır. Statinler, almaç negatif HoAH'de de tedavi sürecinin önemli bir parçasıdır (22, 46). Hastanın genetik durumuna göre statinlere yanıt değişebilmektedir. Olguların büyük bir çoğunluğunda LDL-K düşüşü en fazla %10-25 dolaylarında sağlanabilmektedir (22, 47). İlaç tedavisinde ikinci aşama statin tedavisinin devamında hastaya, kolesterol emilim inhibitörü olan ezetimibe verilmesidir (22, 45, 48). Bu tedavinin başlamasıyla da LDL-K düzeylerinde ek olarak %15 oranında bir düşüş sağlanabilmektedir. Bu olgularda asemptomatik olsalar da antilipit tedavi dışında, asetil salisilik asitin verilmesi, oluşabilecek KV durumları önlemede ek olarak tavsiye edilebilmektedir (22, 45).

İlk olarak 1975 yılında uygulanmaya başlanan lipitlerin kandan ayrıştırılması metodu, geliştirilen aferez teknikleri ile AH'de, özellikle de HoAH'de günümüz temel tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadır. Geliştirilen aferez metodların seçicilik oldukça iyi seviyededir. En yüksek aterojenik riski bulunduran, Apo B-100 ihtiva eden lipoproteinler, HDL-kolesterolü ve diğer plazma proteinleri etkilenmeden kandan ayrıştırılabilmektedirler (22, 49). Tam kan aracılığı ile plazmadan LDL ayrıştırılması, son yıllarda iyi şekilde geliştirilmiş olduğu ve hala en etkili metod olarak kullanıldığı

belirtilmektedir (22, 49, 50). LDL aferezi metodunun başarılı kabul edilebilmesi için akut dönemde LDL-K seviyesinde yaklaşık olarak %60 azalma yakalanabilmesi gerekmektedir (22). Düzenli lipit aferezine giren olguların %25'inde KV hastalık şiddetinde artış ya da yeniden ortaya çıkma gibi durumlar literatürde bildirilmektedir (22, 51). Bu durum temel kolesterol değerlerine kıyasla aferez yöntemiyle %45-60 azalma yakalanmasına rağmen ortaya çıkmaktadır. Bu veriler, aferezle sağlanan lipit seviyesindeki azalmanın, sürekli olmaması ile yorumlanmaktadır (22).

AH tedavisinde lipit aferezi önemli derecede hayat kurtarıcı olmasına karşın, gündelik hayatta uyum sağlanabilir ve kolay bir tedavi yöntemi değildir. Bu yüzden de daha etkin lipit seviyesini azaltıcı ve kolay uygulanıp, takibi sağlanabilen yeni geliştirilmiş tekniklere ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (22). Özellikle de Apo B seviyelerinde azalma sağlayan yeni ajanlar AH tedavisinde umut vaat etmektedir. Bu amaçla üç yeni grup ilaç, son dönemde klinik olarak da kullanılmaya başlanmıştır. Bu ilaçlar; LDL-R yıkımını önleyen PCSK9 inhibitörleri, Apo B sentezini engelleyen ve mipomersen adı verilen antisense oligonükleotidler ve de lomitapide adı verilen, Apo-B'nin çok düşük yoğunluklu lipoprotein ve şilomikronlara aktarılmasını engelleyen mikrozomal trigliserid transfer protein (MTTP) baskılayıcılarıdır (22).

Lomitapide tedavisinin, karaciğer ve bağırsakta, MTTP'yi baskılayarak trigliserid ve fosfolipitlerin, şilomikron ve lipoproteinlere (VLDL) aktarılmasına engel olduğu belirtilmiştir (22, 52).

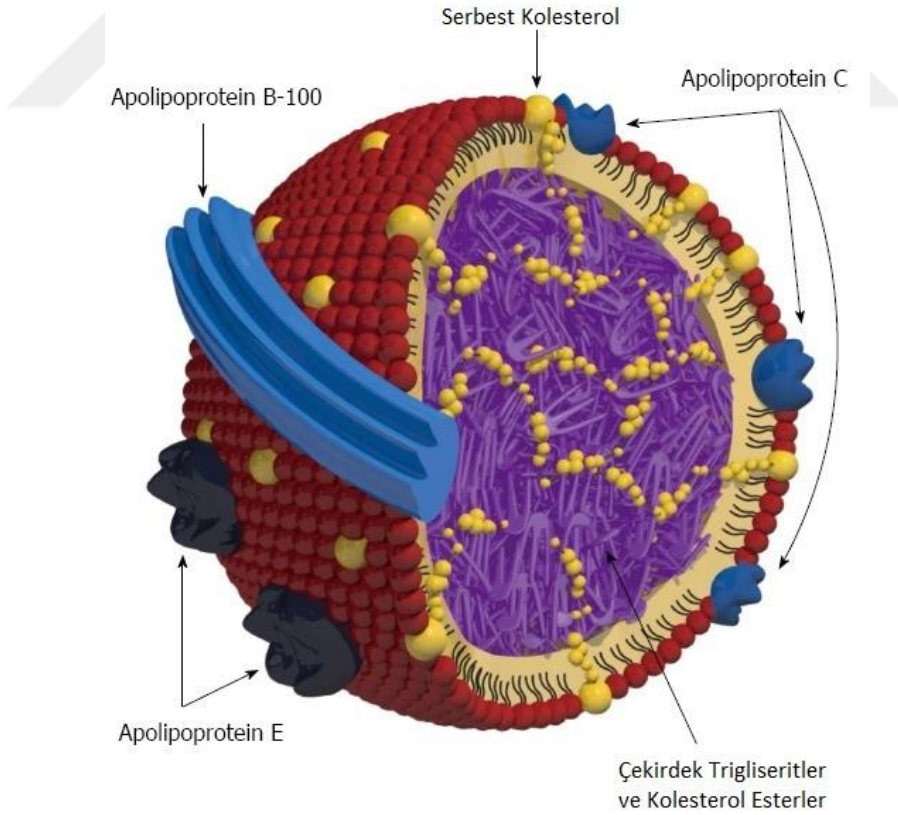
Mipomersen, ikinci nesil “Antisense oligonükleotid” olup haftada bir derialtına enjeksiyon yöntemi ile uygulanmaktadır. Mipomersen, Apo B'yi sentezleten mesajcı RNA'ya bağlanarak ribozomal Apo B sentezine engel olmaktadır (22, 53).

PCSK9 baskılayıcıları, LDLR'nin yıkımını engelleyerek hiperlipidemiye karşı olumlu etkiler ortaya koymaktadırlar. HeAH olgularında en umut verici ajan grubu olarak gösterilmektedirler. PCSK9'u hedefleyen monoklonal antikor yöntemiyle yapılan PCSK9 baskılaması ile normal tedavi uygulanan heterozigot olgularda, plazma LDL-K seviyelerinde ek olarak %65 azalma elde edilmiştir (22, 54, 55).

2.3. Lipoproteinler

Lipoproteinler; yağlar (trigliseridler, kolesterol ve fosfolipidler) ve proteinlerin bir araya gelerek oluşturduğu yapılar olarak ifade edilmektedir (32, 56) (Şekil 2.6).

Serbest yağ asitleri dışındaki tüm lipidler plazmada lipoprotein olarak makromoleküller halinde taşınırlar. Tüm lipoproteinlerin temel yapısı benzer olup kolesterol esterleri ve trigliseridleri içeren bir gövdeye, daha polar yağlardan ve apolipoproteinlerden oluşan bir dış tabakaya sahiptirler. Lipidlerin bir doku veya organdan bir başkasına taşınması lipoproteinlerin esas görevi olarak belirtilmektedir. İçerdiği lipidlerle hücrelerin tipik plazma zarına benzeyen ve örtücü bir yapı oluşturan dış tabaka, sıvı plazma ile içteki polar olmayan lipid gövde arasındaki bir ara tabaka olarak iş görürler. Böylece bu polar olmayan yüzey plazmadaki aşırı derecede çözünmez olan kolesterol esterlerin ve trigliseridlerin bir yerden başka bir yere taşınmasına imkan sağlar. Lipoprotein partikülü tanımlanan bu temel yapısı ile lipid taşınımında görev yapan bir elemandır (57).



Şekil 2.6. Bir lipoprotein yapısı (58).

Plazma lipoproteinleri yoğunluk, büyüklük ve elektroforetik özelliklerine göre ayrıştırılmaktadır. Ultrasantrifüj yöntemi ile lipoproteinler yoğunluklarına göre; şilomikron, VLDL-K, LDL-K, IDL-K, HDL-K olarak ayrılırlar. Lipoprotein elektroforezi ile lipoproteinler, elektroforetik taşınabilirliklerinin farklılığına göre; şilomikronlar, beta- lipoproteinler (LDL), pre-beta-lipoproteinler (VLDL) ve alfa-lipoproteinler (HDL) olarak sınıflandırılmaktadırlar (32) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Lipoproteinlerin özellikleri (59).

Lipoprotein ^a	Yoğunluk gr/ml ^b	Boyut nm ^c	Elektroforetik Hareket ^d	Apolipoproteinler		Diğer içerikleri
				Ana	Diğerleri	
Şilomikronlar (CM)	0,93	75-1200	Orijin	Apo-B48	AI, AIV, CI, CII, CIII	Retinil esterler
Şilomikron artıkları	0,93-1,006	30-80	Yavaş pre- β	Apo-B48	E, AI, AIV, CI, CII, CIII	Retinil esterler
VLDL	0,93-1,006	30-80	Pre- β	Apo-B100	E, AI, AII, AV, CI, CII, CIII	Vitamin E
IDL	1,006-1,019	25-35	Yavaş pre- β	Apo-B100	E, CI, CII, CIII	Vitamin E
LDL	1,019-1,063	18-25	β	Apo-B100		Vitamin E
HDL	1,063-1,210	5-12	α	Apo-AI	AII, AIV, E, CIII	LCAT, CETP paroksonaz
Lp-(a)	1,050-1,120	25	Pre- β	Apo-B100	Apo-(a)	-

Tüm lipoprotein sınıfları, değişen oranlarda fosfolipidler, esterleşmiş ve esterleşmemiş kolesterol ve trigliserid içerirler.

^b Partikül yoğunluğu, ultrasantrifüj ile belirlenir.

^c Partikül boyutu, jel elektroforezi kullanılarak ölçülür.

^d Partikülün agaroz jel elektroforezindeki hareketi, büyüklüğünü ve yüzey elektriksel yükünü yansıtır; LDL'nin pozisyonu β , HDL'nin pozisyonu α olarak adlandırılır.

2.3.1. Şilomikronlar

Şilomikronlar, plazmanın ultrasantrifüj yöntemi ile ayrıştırılmasıyla En büyük lipoprotein olarak kolayca ayrışabilmektedirler. Birinci görevleri, dışarıdan alınmış olan kolesterol ve trigliseridleri, metabolizmaya girecekleri veya depolanacakları dokulara taşımalarıdır. Bağırsak lümeninden emilerek epitel hücrelerinde TG' lere ve kolesterol esterlerine dönüştürülen diyetdeki lipitler, apo B-48, apo A-I ve apo A-IV ile bir araya gelerek şilomikron parçacıklarını meydana getirmektedir. Emilen şilomikronlar, dolaşım sistemine lenfatikler vasıtasıyla ulaşmaktadır. Şilomikronlara, yemek sonrası plazmada rastlanılmaktadır. 12 saatlik açlıktan sonra normalde kanda şilomikron bulunmaz. Şilomikron kalıntıları, karaciğer tarafından plazmadan temizlenir. Şilomikronların kandan temizlenmesi lipoprotein lipaz (LPL) adı verilen enzimler aracılığıyla düzenlenmektedir. Şilomikron kalıntılarının damar endoteline zarar vererek ateroskleroza yol açabildiği düşünülmektedir. Bu sebepten ötürü kandan temizlenmelerinin uzun sürmemesi beklenmektedir. LPL ve apo C-II' nin kalıtsal olarak noksanlığı, şilomikronların temizlenmelerinin uzun sürmesine sebep olabilmektedir. Bu durumda olguların klinik olarak ateroskleroza riskiyle karşılaşması anlamına geldiğine işaret edilmiştir (59-62).

2.3.2. VLDL

Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler yapı ve içerik olarak şilomikronlara benzerse de, TG içeriğinin daha az, kolesterol, fosfolipid ve protein içeriğinin daha fazla, sentez yeri ve taşıdıkları TG'in türünün farklı olması ile şilomikronlardan ayrılır. VLDL en fazla karaciğerde sentezlenmektedir ve endojen TG'yi taşımaktan sorumludur. Bazı VLDL'lerin ince bağırsakta da sentezlendiği belirtilmektedir. Aşırı karbonhidrat alımına bağlı olarak karaciğere serbest yağ asitlerinin akımının arttığı durumlarda VLDL sentezinde de artış gözlenmektedir. Lipoliz sonucunda VLDL parçacıkları daha da küçülür ve "VLDL kalıntıları" ya da "IDL (orta yoğunluklu lipoprotein)" olarak adlandırılır. Orta (ara) yoğunluklu lipoprotein tanımı VLDL'nin LDL'ye dönüşürken ara ürün olmasından dolayıdır. Karbonhidrat tabanlı hipertrigliseridemilerde VLDL parçacıklarının hem sayısı hem de büyüklüğü artar ve buna bağlı olarak da LDL kolesterolünde bir azalış söz konusu olur (59, 63-65).

2.3.3. IDL

AH'de IDL birikiminin görülmesi, bu lipoprotein normalde LDL almaçlarının temizlendiğini belirtmektedir. Bu bağlanmada, IDL yüzeyinde yerleşmiş olan apo E aktif rol oynar.

2.3.4. LDL

İnsanlardaki kolesterolün % 60-75'i dolaşımdaki kolesterolün ana kaynağı olan LDL vasıtasıyla taşınmaktadır. LDL parçacıkları boyut, yoğunluk ve kimyasal yapı açısından değişkenlik gösterebilmektedirler. LDL yapılan çalışmalarda, tip A (büyük: çapları>25,5 nm ve az yoğun) ve tip B (küçük: çapları<25.5 nm ve yoğun) olmak üzere iki ana sınıfta toplanmıştır. B fenotipinin artmış KV riskiyle bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Küçük yoğun LDL oksidasyona büyüğe göre daha yatkındır ve büyüğe göre dolaşımdan temizlenmesi daha uzun sürmektedir. LDL'nin 2/3'ü karaciğer ve LDL almaçları vasıtasıyla tanınıp alınırken, 1/3'ü periferik hücreler tarafından alınmaktadır. İnsanda plazma LDL düzeyi ve karaciğer LDL almacı sayısı arasında ters bir orantı olduğu belirtilmiştir. LDL almacı plazma kolesterol seviyelerin sorumlu olan temel etmendir. Buna ilaveten, VLDL almacı, VLDL sentezinin hızı, LPL ve diğer lipazların aktiviteleri, ve diğer metabolik olaylar LDL seviyelerini belirlemektedir. LDL almacı sayısı, kolesterol ve doymuş yağ içeren bir diyetle azalırken, aynı diyetle kandaki LDL kolesterol seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (59, 66).

2.3.5. HDL

Yapısı ile işlevi arasında sıkı bir ilişki bulunan HDL, lipoproteinler içerisinde en heterojen olanıdır bulunmaktadır. Yapı farklılığı şekil, boyut, yoğunluk ve yüzey yük farklılıklarına neden olduğundan heterojeniteden sorumludur. Ultrasantrifüj yöntemiyle, yoğunluklarına göre HDL₂ (1.063- 1.125 gr/ml) ve HDL₃ (1,125- 1,21 gr/ml) olarak iki kısma ayrıştırıldığı belirtilmiştir. HDL₂'nin plazmadaki yoğunluğu ve içerdiği protein, HDL₃'tekinden daha azdır. Yapılan son çalışmalarla birlikte HDL'nin bu belirtilenlerden

daha fazla alt grupları olduğu bildirilmiştir. Yaklaşık 14 alt HDL grubu Modifiye PAGGE (poliakrilamid gradient gel elektroforezi) yöntemi ile elde edilebilmektedir (59).

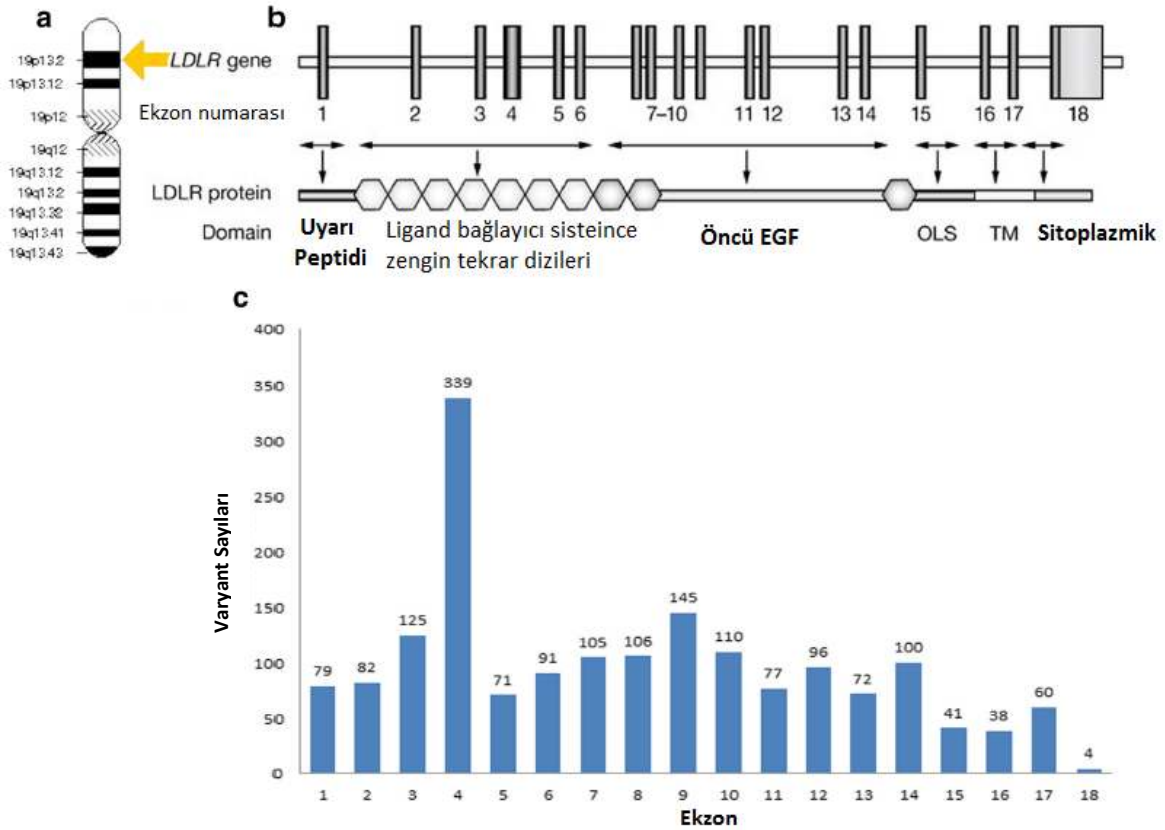
HDL'nin ilk oluşmaya başlayan yapısı iki tabakalı diskler halinde elektron mikroskopunda görülebilmektedir. Bunlar ince bağırsak ve karaciğerde sentezlenmektedir. Bu oluşmaya başlayan parçacıklar, başlıca fosfolipid, apo E, apo C ve serbest kolesterol yapılarından meydana gelmektedir. İlerleyen safhalarda, apo E' lerin yerini apo A1'ler alır ve serbest kolesterol LCAT vasıtasıyla kanda esterleşme meydana geldikçe parçacık küreselleşmeye başlamaktadır. Apo C ve apo E, genellikle karaciğerde sentezlenmesine karşın, apo AI hem karaciğer hem de ince bağırsaklarda aynı miktarlarda sentezlenmektedirler(59).

2.3.6. LDL Almacı

Goldstein ve Brown bu almacı tanımladıkları çalışmadan dolayı; 1985 yılı Nobel ödülünü kazanmışlardır. Bu almaç glikoprotein yapıda olup, molekül ağırlığı 160 000 Kd'dur, İlk kez, hücre kültürü deneylerinde insan fibroblast hücrelerinde gösterilmiştir. Başta karaciğer hücreleri olmak üzere vücuttaki birçok hücrede bulunmaktadır. LDL almacı apo B-100 ve apo E ihtiva eden lipoproteinleri bağlar. Bundan dolayı LDL-K, VLDL-K, VLDL-K kalıntıları, şilomikron kalıntıları, IDL-K ve apo E içeren HDL-K'ün hücre içine doğru alınmasında görev almaktadır. Almaç-lipoprotein karmaşımının, hücre yüzeyinde örtülü çukur olarak adlandırılan özel bir bölgeye taşınmasıyla lipoproteinlerin endositozu sağlanır. Lizozomal enzimlerin etkisiyle hücre içinde esterleşmemiş kolesterol serbest hale gelir. HMG- CoA redüktaz enziminin aktivitesinin baskılanmasıyla ve LDL almaç yüzey ifadelerinin azaltılmasıyla hücre içi kolesterol birikmesinin geribildirimini sağlanmaktadır. Buna ilaveten, hücre içindeki ACAT (açıl kolesterol açıl transferaz) enzim aktivitesinin artırılması ile kolesterolün esterleşmesi ve böylece depolanması sağlanmaktadır. LDL parçacıklarının %70'i LDL almacı vasıtasıyla hücre içine alınarak plazmadan LDL temizlenmesi sağlanmaktadır. Herhangi bir almacın hasarında ise şiddetli AH bulgularıyla karşılaşılabilir (59, 67, 68).

2.3.7. LDLR Geni

LDLR, AH fenotipinin ortaya çıkmasında en etkili olan gendir. 19. Kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan gende, 1700'ün üzerinde mutasyon tanımlanmıştır. LDL reseptörünü kodlamaktadır (6) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. LDLR geni (6).

a) Kromozom pozisyonu, b) Numaralandırılmış kısımlar ekzonları belirtmektedir ve okla işaret edilmiş kısımlar proteinindeki denk gelen kısımları göstermektedir, c) Ekzonik bölgelerdeki tanımlanmış 1741 mutasyonun dağılımını gösteren grafik.

2.4. Apolipoproteinler

Apoproteinler olarak da adlandırılan proteinler hem suda (hidrofilik) hem de yağda (hidrofobik) çözünebilirler. Lipitlerin taşınımında çok önemli bir yere sahiptirler ve lipitlerle beraber lipoproteinleri meydana getirirler. Apoproteinlerin yalnızca yapısal değil, ek olarak metabolik görevleri de vardır. Apo B 100 ve apo E lipoproteinlerin hücrelerdeki almaçlara bağlanabilmesinden sorumlu lipoproteinlerdir (59, 69, 70).

2.4.1. Apo B-100

Molekül ağırlığı 540 kD olup 4563 aminoasitten oluşmaktadır. Esas olarak karaciğerde sentezlenmektedir. VLDL'deki proteinlerin %30'u, IDL'dekilerin %60'ı ve LDL'dekilerin %95'i apo B-100'dür. Her VLDL ve LDL parçacığı bir adet apo B-100 molekülünü içermektedir. Özellikle LDL'nin ve daha az olmakla beraber diğer lipoproteinlerin hücreler tarafından tanınması ve alınması için rol oynar. Ayrıca, karaciğerin VLDL sentezi ve ayrılması için apo B-100 içermesi gerekmektedir (59).

2.4.2. Apo B-48

Apo B-100'ün amino uç kısmındaki 1'den 2512'ye kadar olan aminoasitlerden (yani apo B-100'ün %48'i) meydana gelmektedir. Bu sebepten ötürü de LDL almacına bağlanamaz. Apo B- 48 sadece şilomikron ve şilomikron kalıntılarındadır. Apo B-48 içeren büyük lipoprotein parçacıkları monosit, makrofaj ve endotel hücresi yüzeylerinde bulunan apo B-48 almacına bağlanarak bu hücrelerin köpük hücrelere dönüşmesine neden olabilmektedir (59).

2.4.3. Apo C-I, apo C-II, apo C-III

Bu apolipoproteinler genellikle birlikte ele alınmaktadırlar. Tamamı karaciğerde sentezlenmektedir ve apo C-I şilomikronlar, VLDL, IDL ve HDL'nin küçük bir ögesidir. Şilomikronların ve VLDL'nin LDL almacına ve LDL almacı ile ilişkili protein (LRP)'e bağlanmasında baskılayıcı bir rol oynamaktadırlar. Apo C-II şilomikronlar, VLDL, IDL ve HDL'de bulunmaktadır. LPL enziminin harekete geçmesi için gereklidir. Apo C-III VLDL'nin büyük protein ögesidir ve %40'ını oluşturmaktadır. Şilomikronlar, IDL ve HDL'de de bulunur. Apo C-III hem lipoprotein lipaz enzimini aktivitesini baskılar hem de şilomikron ve VLDL artıklarının karaciğer tarafından alınmasını engeller. Hipertrigliseridemi olan apo C-III'ün ve apo C-III/apo C-II oranının arttığı görülebilir (59).

2.4.4. Apo E

Karaciğerde sentezlenmektedir ve LDL hariç tüm lipoproteinlerde bulunur. Şilomikron ve VLDL'nin protein yapıtaşıdır. Apo E bu lipoproteinlere HDL'den sağlanmaktadır. Plazmadaki apo E'nin yaklaşık yarısını taşıyan HDL aynı zamanda apo E'nin önemli fonksiyonlarından biri olan lipidlerin ihtiyaç fazlası olduğu yerlerden ihtiyaç duyulan hücrelere taşınmasını da sağlar. Apo E karaciğerde LDL reseptörüne ve “LDL reseptörü ile ilişkili protein” (LRP)'ye bağlanma özelliği gösterir. Ayrıca, son yıllarda tanımlanan VLDL reseptörüne de bağlanır. Apo E2, E3 ve E4 izoformları mevcuttur. LDL reseptörüne bağlanma gücüne zayıf olan apo E2 için homozigot olanlarda VLDL birikimi ile karakterize ciddi hiperlipidemi (tip III) gelişir (59).

2.4.5. Apo A-I

Karaciğer ve bağırsakta sentezlenir. Apo A-I tersine kolesterol taşınmasında (reverse kolesterol transport) önemli rol üstlenir. HDL'deki proteinin %80'ini teşkil eden apo A-I şilomikronlar dahil çeşitli lipoproteinlerde bulunur. Apo A-I, VLDL ve şilomikronlardaki küçük apolipo proteindir. HDL'deki proteinin %10'u apo A-II'dir. Apo A-II ve Apo A-IV'ün fonksiyonları tam olarak aydınlatılmamıştır (59).

2.4.6. Apo (a)

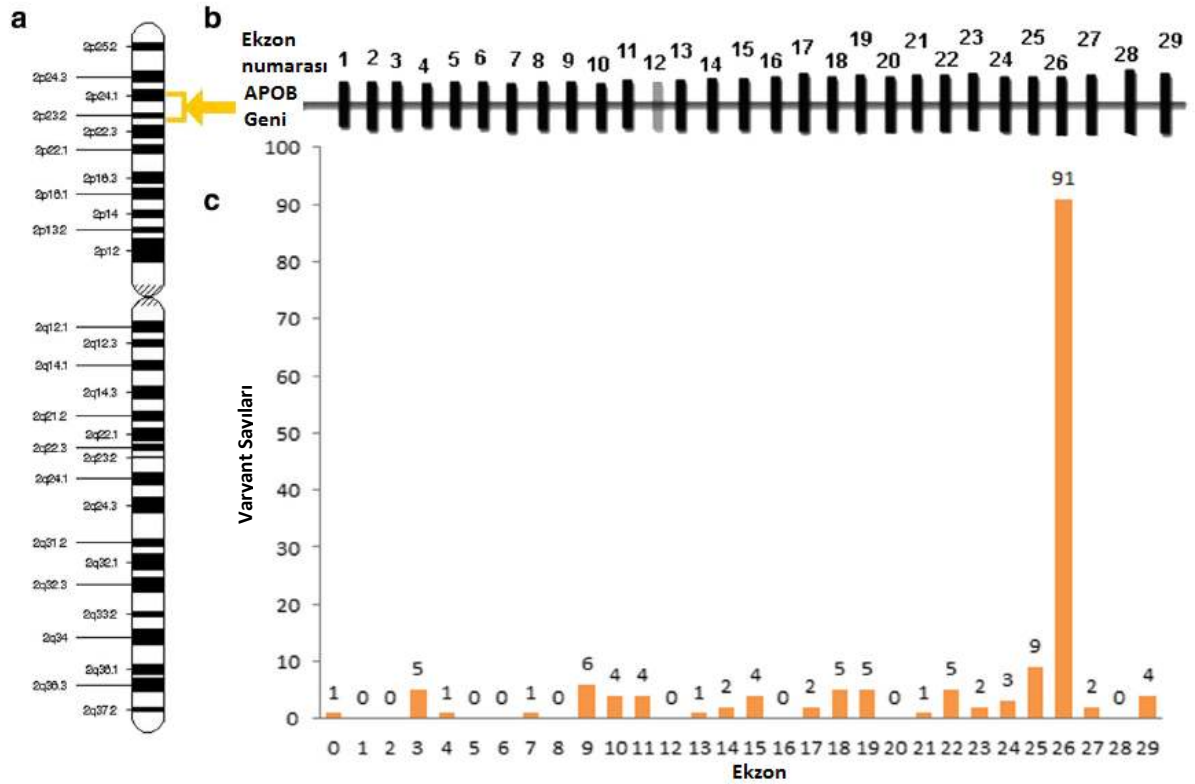
LDL'nin Apo B 100'ü ile disülfid bağı olan apo (a), lipoprotein (a)'nın komponentidir. Fizyolojik rolü bilinmemektedir. Ateroskleroz patogenezindeki rolü plazminojen ile gösterdiği homoloji ile izah edilmeye çalışılmıştır (59).

Tablo 2.4 Başlıca Apolipoproteinler (59).

Apolipoprotein	Kaynak	İlişkili Lipoprotein	İşlevi
Apo A-I	Bağırsak, karaciğer	HDL, CM	HDL' nin yapısal proteini. LCAT' i aktive eder.
Apo A-II	Karaciğer	HDL, CM	HDL' nin yapısal proteini
Apo A-IV	Bağırsak	HDL, CM	Bilinmiyor
Apo A-V	Karaciğer	VLDL	Bilinmiyor
Apo B-48	Bağırsak	CM	Şilomikronun yapısal proteini
Apo B-100	Karaciğer	VLDL, IDL, LDL, Lp(a)	VLDL, LDL, IDL ve Lp(a)'nın yapısal proteini LDL reseptör ligandı
Apo C-I	Karaciğer	CM, VLDL, HDL	Bilinmiyor
Apo C-II	Karaciğer	CM, VLDL, HDL	LPL'ın kofaktörü
Apo C-III	Karaciğer	CM, VLDL, HDL	Lipoproteinlerin almaçlara bağlanmasını baskılar.
Apo D	Dalak, beyin, testis, adrenaller	HDL	Bilinmiyor
Apo E	Karaciğer	CM artıkları, IDL, HDL	LDL reseptör ligandı
Apo H	Karaciğer	CM, VLDL, LDL, HDL	Fosfatidil serine bağlanmada yüksek eğilimli
Apo J	Karaciğer	HDL	Bilinmiyor
Apo L	Bilinmiyor	HDL	Bilinmiyor
Apo (a)	Karaciğer	Lp (a)	Bilinmiyor

2.5. APOB Geni

Apolipoprotein B'yi kodlayan ve 2. Kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşmiş olan APOB geni AH'de LDLR geninden sonra en sorumlu gendir. Bu gendeki mutasyonlar ağırlıklı olarak 26. ekzon üzerinde bulunmaktadır. Aynı zamanda fenotipik özellikler olarak AH ile neredeyse aynı olan Ailesel Defektif Apolipoprotein B, apolipoprotein B (APOB) genindeki mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir (6).



Şekil 2.8. APOB geni (6).

a) Genin 2. Kromozomun kısa kolu üzerindeki yerleşkesi, b) Numaralandırılmış kısımlar ekzonları belirtmektedir, c) Tanımlanmış mutasyonların dağılımını gösteren grafik

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada kullanılan örnekler Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalına Ailesel Hiperkolesterolemi teşhisi ile gelen ve LDL-K seviyeleri 300 mg/dL üzerinde olan, hastalardan EDTA'lı tüplere 50 cc kan alınmıştır.

Bu çalışma, Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 16.05.2016 tarihli ve 2016/160 numaralı etik kurul kararlarıyla uygun bulunmuştur.

3.2. DNA Eldesi

Çalışma yüksek kalitede RNA içermeyen DNA gerektirir. Giren DNA'nın sonuçlanan kütüphane üzerinde önemli etkisi vardır. Yüksek moleküler ağırlıkta RNA içermeyen gDNA izole etmek için ticari olarak satılan kitler uygundur. Hastalardan alınan kanlardan Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Moleküler Genetik Tanı Laboratuvarında PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) ile DNA eldesi işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamada aşağıdaki protokol izlendi:

1. 200 µl kan 1.5 ml'lik eppendorf tüplere eklendi.
2. Kan örneklerinin üzerine 20 µl Proteinaz K eklendi.
3. Ardından üzerine 20 µl RNase A eklendi.
4. Örnekler kısaca vortekslenmesinin ardından 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Ardından 200 µl Lysis Binding Buffer eklendi.
6. Sonra 55 °C 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyonun ardından örnekler üzerine 200 µl saf ethanol eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
8. Ardından örnekler filtreli kolonlara tek seferde alındı.
9. Filtreli kolonlara alınan örnekler 1 dakika 10.000 xg'de santrifüj edildi.

10. Santrifüjün ardından alt kısımlar atılarak filtreli kısım yeni kolonlara dizildi.
11. Filtreli kısmın üzerine 500 µl Wash Buffer I eklendi.
12. Filtreli kolonlar 1 dakika 10.000 xg'de santrifüj edildi.
13. Santrifüjün ardından alt kısımlar atılarak filtreli kısım yeni kolonlara dizildi.
14. Filtreli kısmın üzerine 500 µl Wash Buffer II eklendi.
15. Filtreli kolonlar 3 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.
16. Santrifüjün ardından alt kısımlar atılarak filtreli kısım yeni 1.5 ml'lik eppendorf tüplere dizildi.
17. Daha sonra filtreli kısmın üzerine 100 µl Elution Buffer eklendi ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
18. Tüpler maksimum hızda 1 dakika santrifüj edildi ve filtrelerden geçen DNA tüplere alındı.
19. Elde edilen DNA'lar -20 °C' de muhafaza edildi.

3.3. DNA Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Elde edilen DNA'ların konsantrasyonları Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) cihazı ile tespit edilerek, çıkan sonuçlar üzerinden hesap yapılarak DNA yoğunlukları 2 ng/µl olacak şekilde dilüe edildi. DNA yoğunluğunu dilüe edileceği miktar, Ampliseq Designer sistemi (<https://www.ampliseq.com/>) üzerinden tasarlanan panel sonuçları üzerinden karar verilir. Bu değer farklı tasarımlarda değişkenlik gösterebilir.

3.4. Primer Havuzlarının Tasarımı

Ailesel Hiperkolesterolemi ile ilişkili bulunan en önemli iki gen olan LDLR ve APOB genlerine özgü tüm ekzonları, ekzon - ekzon bağlantı noktalarını, bu bölgelerde önemli olabilecek intronları ve 5' ve 3' uç bölgelerini de kapsayan primer panel tasarımları; IonAmpliseq Designer sistemi (<https://www.ampliseq.com/>) ve UCSC veri tabanı "Genome Browser" ara yüzü (<https://genome.ucsc.edu/>) kullanılarak oluşturuldu.

3.5. Kütüphane Hazırlanması

Oluşturulan primer havuzları ve dilüe edilen hasta DNA'larını da içeren karışım, Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Scientific, Waltham, USA) kullanılarak, Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) ısı döngüleyici cihazında PCR yöntemi ile farklı kromozom bölgelerinde bulunan ve istenilen gen bölgeleri çoğaltılarak kütüphane hazırlama işlemi aşağıda takip eden aşamalar izlenerek gerçekleştirildi.

1. 2X primer havuzu kullanımına bağlı olarak her bir DNA/Primer havuz kombinasyonu için izleyen içerenler MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate'ine (Thermo Scientific, Waltham, USA) eklendi. Çoklu reaksiyonlar için bir karışım hazırlandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Hedef Gen Bölgelerinin çoğaltılması için gerekli reaksiyon karışımının içerikleri.

İçerenler	Sample ID Panel dışındaki hacim	Sample ID Panel ile hacim
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	4 µL	4 µL
2X Ion AmpliSeq™ Primer Pool	10 µL	10 µL
Opsiyonel: 20X Ion AmpliSeq™ Sample ID Panel	—	1 µL
Kalıp DNA	≤ 6µL	≤ 5µL
RNaz içermeyen su	to 20 µL	to 20 µL

2X Primer Havuzu (Cat. 4477685,4477686 ve sipariş üzerine hazırlanmış ve community panel)

2. MicroAmp® Clear Adhesive Film (Thermo Scientific, Waltham, USA) ile plate kapatıldı, tamamen vortekslendi ve kısaca santrifüj edildi.
3. Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) cihazına uygun program girilerek çalıştırıldı (Tablo 3.2, 3.3).

Tablo 3.2. Hedef Gen Bölgelerinin çoğaltılması için gerekli ısı döngüleyici ayarları.

Etap	Adım	Sıcaklık	Zaman
Tutma	Enzimi aktiveleştirmek için	99 °C	2dk
Döngü	Denatürasyon	99 °C	15sn
	Soğutma ve Uzatma	60 °C	4dk/8dk/16dk*
Tutma	—	10 °C	Tutma

*Her primer havuzu için primer çifti sayısı ≤1536 ise 4 dakika; 1,537–6,144 ise 8 dakika; 6,145–24,576 ise 16 dakika

Tablo 3.3. Hedef Gen Bölgelerinin çoğaltılması için gerekli döngü sayısı belirleme seçenekleri.

Her Havuz için Primer Çiftleri	Döngü Sayısı	
	Standard DNA/RNA	FFPE DNA/RNA
Gen kaynaşımı	27	30
12–24	21	24
25–48	20	23
49–96	19	22
97–192	18	21
193–384	17	20
385–768	16	19
769–1,536	15	18
1,537–3,072	14	17
3,073–6,144	13	16
6,145–12,288	12	15
12,289–24,576	11	14

3.5.1. Primer Dizinlerini Kısmi Olarak Kesme

Bu işlem Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Scientific, Waltham, USA) kitin içerisinde bulunan FuPa Reagent ile gerçekleştirildi.

FuPa Reagent ampliconları keser ve fosforiller, onları ligaz enzimi için uygun ürün haline getirir. Bu basamak olmadan, ampliconlar adaptörlere bağlanamaz.

1. Plate üzerindeki seal dikkatlice açıldı, her bir çoğaltılan örneğe 2 µL FuPa reaktifi eklendi. Toplam hacim 22 µL oldu.
2. MicroAmp® Clear Adhesive Film (Thermo Scientific, Waltham, USA) ile plate kapatıldı, tamamen vortekslendi ve kısaca santrifüj edildi.
3. Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) cihazına uygun program girilerek çalıştırıldı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Primer dizinlerini kısmi olarak kesme işlemi için gerekli ısı döngüleyici ayarları

Sıcaklık	Zaman
50 °C	10dk
55 °C	10dk
60 °C	20dk
10 °C	1 saate kadar cihazda bekleyebilir

3.5.2. Ampliconlara Adaptörleri Bağlama ve Saflaştırma

Oluşturulan gen paneli iki primer havuzuna sahip olduğundan, aynı örneğe tüm reaksiyonlar için aynı barkod adaptörler kullanıldı. Tek bir çip ile çoklu kütüphane çalışıldığından, her bir kütüphane için farklı barkod adaptörler kullanıldı. Ion Xpress™ Barcode Adapters (Thermo Scientific, Waltham, USA) kitin içerisinde bulunan ayrı ayrı barkod adaptörler sırasıyla kullanıldı. Barkod adaptörler dilüe edilerek kullanıldı (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Barkod adaptörlerin dilüsyonu için gerekli içerenler

İçerenler	Hacim
Ion P1 Adapter	2 µL
Ion Xpress™ Barcode X*	2 µL
Nükleaz içermeyen su	4 µL
Toplam	8 µL

*X= seçilen barkod

3.5.3. Bağlanma Reaksiyonu

1. Dikkatli bir biçimde plate seal'ı açıldı ve primerleri kısmi olarak kesilmiş örneği içeren her kuyucuk için gereken solüsyonlar eklendi (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Bağlanma reaksiyonu için gereken içerenler

İçerenler	Hacim
Switch Solution	4 µL
Dilue edilmiş barkod adaptör karışımı (barkodlanmış kütüphaneler için)* ya da Ion AmpliSeq™ Adapters (barkodlanmamış kütüphaneler için)	2 µL
Toplam hacim (22µL'si FuPa reagent eklenmiş amplicon)	28 µL

*Kullanılan

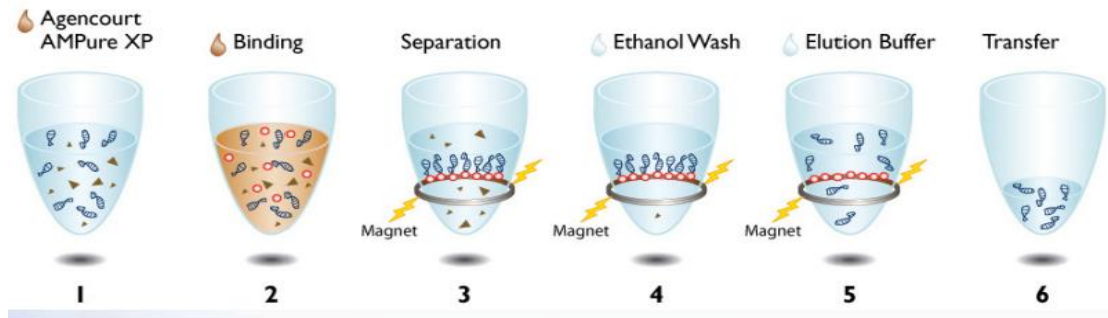
2. Her bir kuyucuğa 2 µL DNA Ligase eklendi (toplam hacim 30 µL).
3. MicroAmp® Clear Adhesive Film (Thermo Scientific, Waltham, USA) ile plate kapatıldı, tamamen vortekslendi ve kısaca santrifüj edildi.
4. Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) cihazına uygun program girilerek çalıştırıldı (Tablo 3.7).

Tablo 3.7. Bağlanma reaksiyonu için gerekli ısı döngüleyici ayarları.

Sıcaklık	Zaman
22 °C	30dk
72 °C	10dk
10 °C	1 saate kadar cihazda bekleyebilir

3.6. Amplifiye Edilmemiş Kütüphanenin Saflaştırılması

Barkod adaptör bağlanan kütüphaneler, Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) reaktifi ile saflaştırıldı.



Şekil 3.1. Kütüphane saflaştırma basamakları.

3.6.1. Saflaştırma Basamakları

1. Plate üzerindeki seal açıldı ve her bir kütüphane için 45 µL (örnek hacminin 1.5 katı) Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) eklendi ve DNA ile beadler 5 kez pipetaj yapıldı.
2. Karışım oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.
3. Plate, DynaMag™-96 Side Magnet (Thermo Scientific, Waltham, USA) magnetik tüplüğünün üzerine alındı ve solüsyon tamamen şeffaflaşana kadar inkübe edildi. Dikkatli bir şekilde süpernatant pelletten ayrıldı ve atıldı.

4. Taze hazırlanan 150 µL, 70%'lik etanol plate'eki beadlerin üzerine eklendi, plate magnet üzerinde sağ ve sola taraflara kaydırılarak beadler yıkandı, sonrasında süpernatant alındı ve atıldı.
5. 4. aşama tekrar edildi.
6. Tüm etanol damlacıkları toplandı ve alındı. Magnete alınan plate 5 dk oda sıcaklığında beadlerin kuruması için bekletildi. Aşırı kurutma yapılmadı. Kalan etanol damlaları kütüphanenin çoğalmasını baskılayacağından, havayla kurutmadan evvel plate spin atırılarak kalan etanol pelletten uzaklaştırıldı.

Bu aşamadan sonra kütüphane normalizasyonu, çoğalmış kütüphanelerin Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) cihazı ile ölçümlerinin yapılarak, konsantrasyonlarının eşitlenmesi ile sağlandı.

3.7. Çoğalmış kütüphaneleri Qubit® 2.0 Fluorometer Cihazı ile Ölçme

Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Scientific, Waltham, USA) içerisinde bulunan Platinum® PCR SuperMix High Fidelity kullanılarak kütüphane çoğaltıldı ve sonrasında saflaştırıldı. Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) cihazı kullanılarak kütüphaneler ölçüldü. Ölçümden sonra, Template reaksiyonu hazırlarken Ion Template kit kullanımı için uygun nihai konsantrasyonu ~100 pM (veya Qubit® 2.0 Fluorometer ~15-22 ng/mL) olan sulandırma faktörü belirlendi.

3.7.1. Kütüphaneyi Çoğaltma

1. Ion AmpliSeq™ kütüphanesi içeren plate magnetten alındı ve 50 µL Platinum® PCR SuperMix High Fidelity ve 2 µL Library Amplification Primer Mix tüm bead pelletlerine eklendi. SuperMix ve Primer Mix eklenmeden önce birleştirildi.
2. MicroAmp® Clear Adhesive Film (Thermo Scientific, Waltham, USA) ile plate kapatıldı, tamamen vortekslendi ve kısaca santrifüj edildi.
3. Plate 2 dk magnet üzerine alındı, sonra pelletten ayrılan ~50 µL süpernatant temiz bir plate'in ayrı ayrı kuyularına alındı.
4. Veriti™ Dx 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) cihazına uygun program girilerek çalıştırıldı (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. Kütüphaneyi çoğaltma için gerekli ısı döngüleyici ayarları.

Evre	Sıcaklık	Zaman
Tutma	98 °C	2 dk
5 Döngü	98 °C	15 sn
	64 °C	1 dk
Tutma	10 °C	Tutma

3.7.2. Çoğalmış Kütüphaneyi Saflaştırma

Saflaştırma basamağı, Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) ile iki aşamada ilerledi.

- İlk aşama, örnek hacim bead oranı 0.5X: Amplikon ve primerler solüsyonda kalırken yüksek moleküler ağırlıktaki DNA bead'lere bağlandı. Süpernatant saklandı.
- İkinci aşama, orijinal örnek hacim bead oranı 1.2X: Amplikonlar beadlere bağlandı ve primerler solüsyonda kaldı. Beadler saklandı ve amplikonlar beadlerden çöktürüldü.

İlk Aşama Saflaştırması

1. 25 µL (0.5X örnek hacmi) Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) ~50 µL örnek içeren plate kuyularına eklendi. 5 kez dikkatlice pipet al ver yapılarak DNA ile bead süspansiyonu sağlandı ve MicroAmp® Clear Adhesive Film (Thermo Scientific, Waltham, USA) ile kapatıldı.
2. Karışım oda sıcaklığında 5dk inkübe edildi.
3. Plate en az 5 dk. veya solüsyon tamamen berraklaşana kadar DynaMag™-96 Side Magnet (Thermo Scientific, Waltham, USA) magnet üzerine alındı. Süpernatant dikkatli bir şekilde pelletten ayrılarak her bir kuyudan yeni bir plate'in tek bir kuyusuna taşındı.
4. Süpernatant istenen amplikonları içerdi.

İkinci Aşama Saflaştırması

1. İlk aşama saflaştırması sonucu elde edilen, istenen amplikonları içeren süpernatant'a 60 µL (1.2X orijinal örnek hacmi) Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) eklendi. 5 kez dikkatlice pipetaj

yapılarak DNA ile bead süspansiyonu sağlandı ve MicroAmp® Clear Adhesive Film (Thermo Scientific, Waltham, USA) ile plate kapatıldı.

2. Karışım oda sıcaklığında 5dk inkübe edildi.
3. Plate solüsyon tamamen berraklaşana kadar magnet üzerine alındı. Süpernatant dikkatli bir şekilde pelletten ayrıldı ve atıldı. Bu aşamada amplikonlar beadlere bağlandılar. Bead'den oluşan pellet saklandı.
4. Yeni olarak hazırlanmış, 150 µL 70% etanol her bir kuyuya eklendi ve plate beadleri yıkamak için kenardan kenara magnet üzerinde hareket ettirildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde pelletten ayrıldı ve atıldı. İkinci kez yıkamak için 4. aşama tekrar edildi.
5. Tüm etanol damlalarının kuyulardan ayrılması sağlandı. Oda sıcaklığında beadler 5 dk. magnet üzerinde hava kurutmasına bırakıldı. Aşırı kurutma yapılmadı.
6. Plate magnetten alındı ve Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Scientific, Waltham, USA) içerisinde bulunan Low TE 50 µL olacak şekilde pelletteki beadleri yayarak eklendi. Pipet ayarları 40 µL'ye ayarlandı ve plate kapatılmadan önce en az 5 kez pipetaj yapıldı ve MicroAmp® Clear Adhesive Film (Thermo Scientific, Waltham, USA) ile plate kapatıldı.
7. Süpernatant istenen amplikonları içerdi.
8. En az 2dk plate magnet üzerine alındı ve porsiyonlara ayrılmış, bir süpernatant şu şekilde tanımlanabilir:
 - “Qubit® 2.0 Fluorometer: kütüphaneyi ölçer ve sulandırma faktörünü hesaplar”

3.8. Qubit® 2.0 Fluorometer: Kütüphaneyi Ölçme ve Sulandırma Faktörünü Hesaplama

Çoğalmış her kütüphanenin 10 µL'si Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) ve Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) kullanılarak analiz edildi. Çoğalmış kütüphane genellikle 300–1500 ng/mL konsantrasyonda idi. Çoğaltılmış kütüphane konsantrasyonunu belirlemek için:

1. a) Qubit® dsDNA HS, Qubit® dsDNA HS Buffer kullanılarak 1:200 oranında çalışma sulandırması yapıldı.
2. b) 10 µL çoğaltılmış, Ion AmpliSeq™ kütüphanesi 190 µL boyalı reaktif ile iyice karıştırıldı ve en az 2 dk. inkübe edilir.

3. c) Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) cihazında konsantrasyonlar ölçüldü.
 4. d) 20 ile çarpılarak sulandırılmamış kütüphanelerin konsantrasyonu hesaplandı. Bu otomatik olarak “Calculate Stock Concentration” butonu kullanılarak ve örnek hacmi 10 µL olarak girilerek hesaplandı.
 2. Hesaplanmış kütüphane konsantrasyonuna göre ~100 pM olarak ayarlanan sulandırma belirlendi (15 ng/ml için 225bp amplicona kadar, 22 ng/ml 275bp amplicona kadar). Örneğin; 125-175 bp uzunluğunda tasarımda;
 - Kütüphane konsantrasyonu 450 ng/mL’dir.
 - 450 ng/mL olan sulandırma faktörü 15 ng/mL ile bölündü, $450 \text{ ng/mL} / 15 \text{ ng/mL} = 30$
 - Böylece kütüphanenin 10 µL’si 290 µL Low TE (1:30 dilution) ile karıştırıldı ve ürün yaklaşık olarak 15 ng/mL (~100 pM) oldu.
- Sulandırılan kütüphane ~100 pM gibi belirlendi ve kütüphaneleri birleştirmeye ve Template hazırlama işlemine geçildi.

3.9. Template Hazırlama

Konsantrasyonları eşitlenmiş olan kütüphanelere Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) ile emülsiyon bazlı PCR işlemi uygulandı. Her bir amplicona bir bead bağlanması ve yağ küreciği içerisinde bunların klonal olarak milyonlarca kopya yapması sağlandı.

Konsantrasyonları eşitlenmiş ve tek bir tüpte birleştirilmiş olan kütüphaneler Tablo 3.9’da belirtilmiş olan oranlara göre dilüe edildi. Dilüe edilen kütüphaneler buz üzerinde bekletildi.

Tablo 3.9. Template reaksiyonunda kullanılan dilüe kütüphane oranları.

Miktarlar	Ion AmpliSeq™ DNA Library
Library konsantrasyonu	100 pM
Library hacmi	2 µL
Nükleaz içermeyen su hacmi	23 µL
Amplifikasyon solüsyonuna eklenecek toplam dilue kütüphane hacmi	25 µL

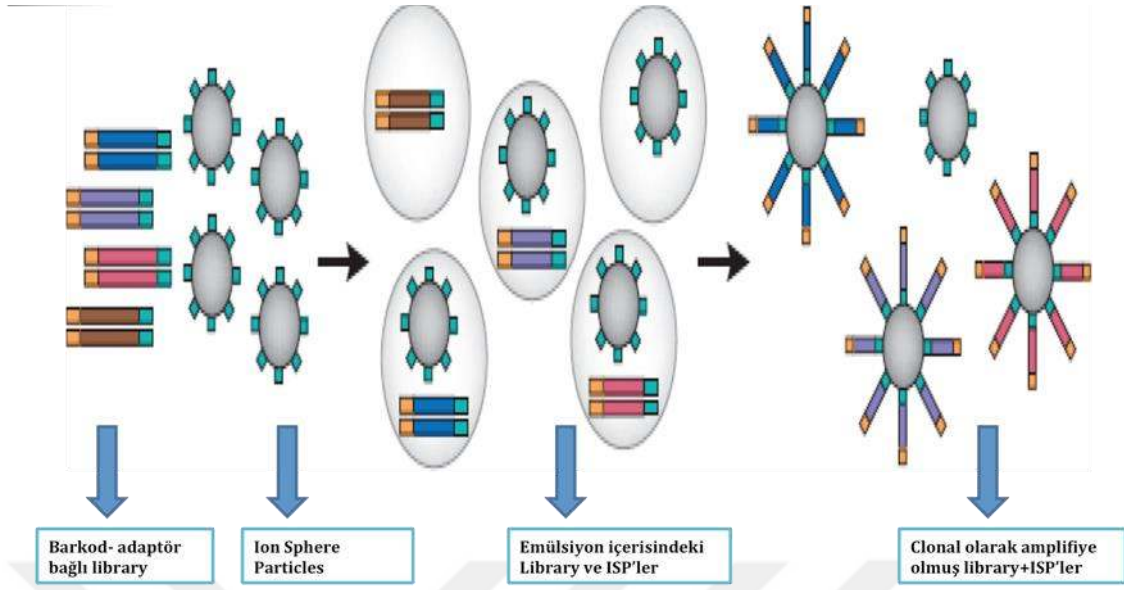
Reaksiyona girecek amplifikasyon solüsyonu Tablo 3.10'daki sıraya ve miktarlara göre bir 1.5 ml'lik eppendorf tüpe eklendi. Reaktifler tüpe eklenmeden önce iyice karıştırıldı.

Tablo 3.10. Template reaksiyonu için gereken reaktifler ve yükleme sıraları.

Sıra	Reaktifler	Hacim
1	Nükleaz içermeyen su	25 µL
2	Ion PGM™ Hi-Q™ Enzyme Mix	50 µL
3	Dilüe kütüphane	25 µL
4	Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs	100 µL
—	Toplam	1000 µL

Amplifikasyon solüsyonu hazırlandıktan sonra 5 sn. vortekslendi ve çok kısa santrifüjlendi. Reaksiyon filtresine aktarıldı. Üzerine Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) içerisinde bulunan Reaction Oil iki kez 850 ul olacak şekilde eklendi.

Reaksiyon filtresi Ion Torrent™ Ion OneTouch™ 2 cihazına yerleştirilerek Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit – 400 protokolü seçildi ve emülsiyon PCR reaksiyonu başlatıldı.



Şekil 3.2. Template reaksiyonu aşamalarının şematize edilmiş hali.

3.10. Template-Pozitif Ion PGM™ Hi-Q™ ISP'lerin Enrichment Sistemiyle Eldesi

Ion Torrent™ Ion OneTouch™ 2 sistemindeki çalışma bittikten sonra elde edilen ürünün süpernatanı uzaklaştırıldı. Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) içerisinde bulunan çeşitli reaktifler hazırlanarak 8-kuyucuklu plate'e eklendi ve reaksiyon Ion Torrent™ OneTouch ES™ (Thermo Scientific, Waltham, USA) cihazında başlatıldı (Tablo 3.11, 3.12).

1. Melt-off Solüsyonunun Hazırlanması

Tablo 3.11. Melt-off solüsyonu için gereken bileşenler.

Sıra	Bileşen	Hacim
1	Tween® Solution	280 µL
2	1 M NaOH	40 µL
—	Toplam	320 µL

Melt-Off Solution son konsantrasyonu 125 mM NaOH ve 0.1% Tween® 20 deterjanıdır.

2. Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Bead'lerin Yıkanması ve Karıştırılması

- i. Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Bead'ler oda sıcaklığına getirildikten sonra vortekslendi ve pipet yardımıyla iyice karıştırıldı.
- ii. 13 ul bead bir tüpün içine aktarıldı ve DynaMag™-96 Side Magnet (Thermo Scientific, Waltham, USA) tüplük magnete yerleştirildi. Solüsyon şeffaflaşana kadar beklendi ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- iii. Bead pelletin üzerine 130 ul MyOne™ Beads Wash Solution eklendi ve vortekslendi, bead solüsyonu elde edildi.

3. 8-kuyucuk strip plate'in yüklenmesi

8-kuyucuk strip plate aşağıdaki sıraya göre yüklendi:

Tablo 3.12. Zenginleştirme (Enrichment) Aşaması için gerekli reaktifler.

Kuyu numarası	Kuyuya aktarılacak reaktif
Kuyu 1	Template-positive ISP örneğinin tamamı (100 µL prosedür)
Kuyu 2	130 µL MyOne™ Beads Wash Solution içerisinde çözdürülen Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads
Kuyu 3	300 µL Ion OneTouch™ Wash Solution
Kuyu 4	300 µL Ion OneTouch™ Wash Solution
Kuyu 5	300 µL Ion OneTouch™ Wash Solution
Kuyu 6	Boş
Kuyu 7	300 µL taze hazırlanmış Melt-off solüsyonu
Kuyu 8	Boş

Enrichment reaksiyonu sonrasında elde ettiğimiz ürün çipe yüklenecek örneğimiz oldu. Kullanılacak hacim Ion Torrent™ Ion 316™ Chip Kit v2 (Thermo Scientific, Waltham, USA) çip kapasitesine göre belirlendi.

3.11. Yeni Nesil Dizileme

Dizileme aşamasında kalıp DNA dizisindeki her bir baz eşleşmesinde şeker-fosfat bağı koparak ortama bir H^+ iyonu salınır. Bu da pH'nın düşerek cihazda okuma sinyali almasını sağlar. Bazlar ortama tek tek salınır ve her eşleşmede bu sinyal değişimi algılanır. Eşleşmeyen baz olması durumunda hiçbir pH değişimi dolayısıyla sinyal değişimi olmaz. Hazırlanan örnekler bir çipe yüklenir ve cihaz okumaları bu çipteki ürün üzerinden yapar.

Dizileme reaksiyonu 4 aşamada gerçekleşti.

1- Çalışma planının Ion Torrent Server üzerinde hazırlanması: Plan çalışmada hangi kitler kullanıldı, hangi örneğe hangi barkod bağlandı, hangi ek programlarla analiz edilmek isteniyor gibi bilgileri içerdi.

2- Ion PGM cihazının temizliği: Ion Torrent™ Ion PGM™ (Thermo Scientific, Waltham, USA) Yeni Nesil Dizileme cihazının kanallarının tıkanmasını engellemek amacıyla çalışma başlamadan önce klorid ve saf su yıkaması yapıldı.

Klorid yıkaması; Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) içerisinde yer alan klorid tablet 1 litre Direct-Q® 3 UV (Merck, Darmstadt, Germany) cihazından alınan $18.2M\Omega \cdot cm$ ultra saf su içerisine atılarak çözdürüldü. Ardından 1 ml NaOH solüsyonun üzerine koyularak yıkama solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan solüsyon 250 ml olacak şekilde; 50 ml'lik şırınga (Hayat Şırınga, İstanbul, Türkiye) yardımıyla Minisart® NML Syringe Filters (Goettingen, Germany) filtre kullanılarak W1 klorid yıkama şişesine aktarıldı ve Ion Torrent™ Ion PGM™ (Thermo Scientific, Waltham, USA) Yeni Nesil Dizileme cihazının “Clean” protokolü üzerinden yapıldı.

Saf su yıkaması; Direct-Q® 3 UV (Merck, Darmstadt, Germany) cihazından alınan $18.2M\Omega \cdot cm$ ultra saf su 250 ml olarak W1 yıkama şişesine eklendi ve Ion Torrent™ Ion PGM™ (Thermo Scientific, Waltham, USA) Yeni Nesil Dizileme cihazının “Clean” protokolü üzerinden yapıldı.

3- Ion PGM cihazının pH'sının otomatik olarak ayarlanması: Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit (Thermo Scientific, Waltham, USA) içerisinde yer alan solüsyonlar kullanıldı.

Wash 1 solüsyonu olarak 350 ul 100 mM NaOH eklendi.

Wash 2 solüsyonu olarak 18.2MΩ·cm ultra saf su içerisine kitten çıkan hazır solüsyon ve 70 ul 100 mM NaOH eklendi.

Wash 3 solüsyonu ise 50 ml kitten hazır olarak kullanıldı ve cihazın pH'sının kalibrasyonunu sağladı.

Wash 2'nin pH'nın 7.49-7.60 civarlarına ulaşması sağlandı ve cihaz bunu otomatik olarak ölçerek belirledi.

Tüm bu solüsyonlar hazırlandıktan sonra Ion Torrent™ Ion PGM™ (Thermo Scientific, Waltham, USA) Yeni Nesil Dizileme cihazında ilgili yerlere şişelerin yerleştirilmesinin ardından, cihazın “Initialize” protokolü izlenerek pH ayarlama işlemi başlatıldı.

4- Çipin yüklenmesi ve dizileme: Ion Torrent™ Ion PGM™ (Thermo Scientific, Waltham, USA) Yeni Nesil Dizileme cihazında okunacak örneğin kapasitesine ve alınmak istenen okuma oranlarına göre seçilebilecek 3 çeşit çip vardır.

Ion Torrent™ Ion 314™ Chip Kit v2 (Thermo Scientific, Waltham, USA) ortalama 80 milyon okuma kapasitesinde, Ion Torrent™ Ion 316™ Chip Kit v2 (Thermo Scientific, Waltham, USA) ortalama 600 milyon okuma kapasitesinde ve Ion Torrent™ Ion 318™ Chip Kit v2 (Thermo Scientific, Waltham, USA) 1milyar 200 milyon okuma kapasitesindedir. Bu oranlar çalışmanın kalitesine ve çipe yüklenmesine göre değişir.

Bu çalışmada, örnek sayıları ve panel büyüklüğünden yola çıkılarak, Ion Torrent™ Ion 316™ Chip Kit v2 (Thermo Scientific, Waltham, USA) çip kullanılmıştır.

Zenginleştirme aşamasından (Enrichment) geçirilen ve template pozitif ISP içeren örneğe Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit Reagents (Thermo Scientific, Waltham, USA) içerisinden bulunan Control Ion Sphere Particle 5 ul eklendi. Control Ion Sphere Particle cihazın doğru okuma yapıp yapmadığını gösteren solüsyondur.

Örnek 15.500xg'de 3 dk santrifüj edildi.

Geriye 15 ul kalacak şekilde süpernatant dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı.

Pelletin üzerine Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit Reagents (Thermo Scientific, Waltham, USA) içerisinden bulunan Sequencing Primer 12 ul eklendi ve 95C'de 2 dk 37C'de 2 dk inkübe edildi.

Bu esnada Ion Torrent™ Ion 318™ Chip Kit v2 (Thermo Scientific, Waltham, USA) çip, yüklemeye hazırlanmak için Ion Torrent™ Ion PGM™ (Thermo Scientific, Waltham, USA) cihazı üzerinde “Chip Check” protokülü üzerinden kontrolden geçirildi. İnkübasyon sonrası örneğe Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit Reagents (Thermo

Scientific, Waltham, USA) içerisinden bulunan Sequencing Polymerase 3 ul eklenerek oda sıcaklığında 5 dk inkübe edildi.

Bu arada kontrolden geçen ipteki fazla sıvı pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırıldı.

Okuma alınacak örnek ipe yüklendi. 30’ar sn. santrifüj edilerek örneğin çipin her yerine, tüm kuyucuklarına yayılması sağlandı.

İşlemin en sonunda ipteki sıvı uzaklaştırıldı ve ip Ion Torrent™ Ion PGM™ (Thermo Scientific, Waltham, USA) Yeni Nesil Dizileme cihazına yüklenererek, cihazın “Run” protokolü izlenerek dizileme reaksiyonu başlatıldı.

Çalışmanın gidişatı ve sonucu Ion Torrent Server Browser’dan evrimii olarak takip edildi.

3.12. Verilerin Analizi

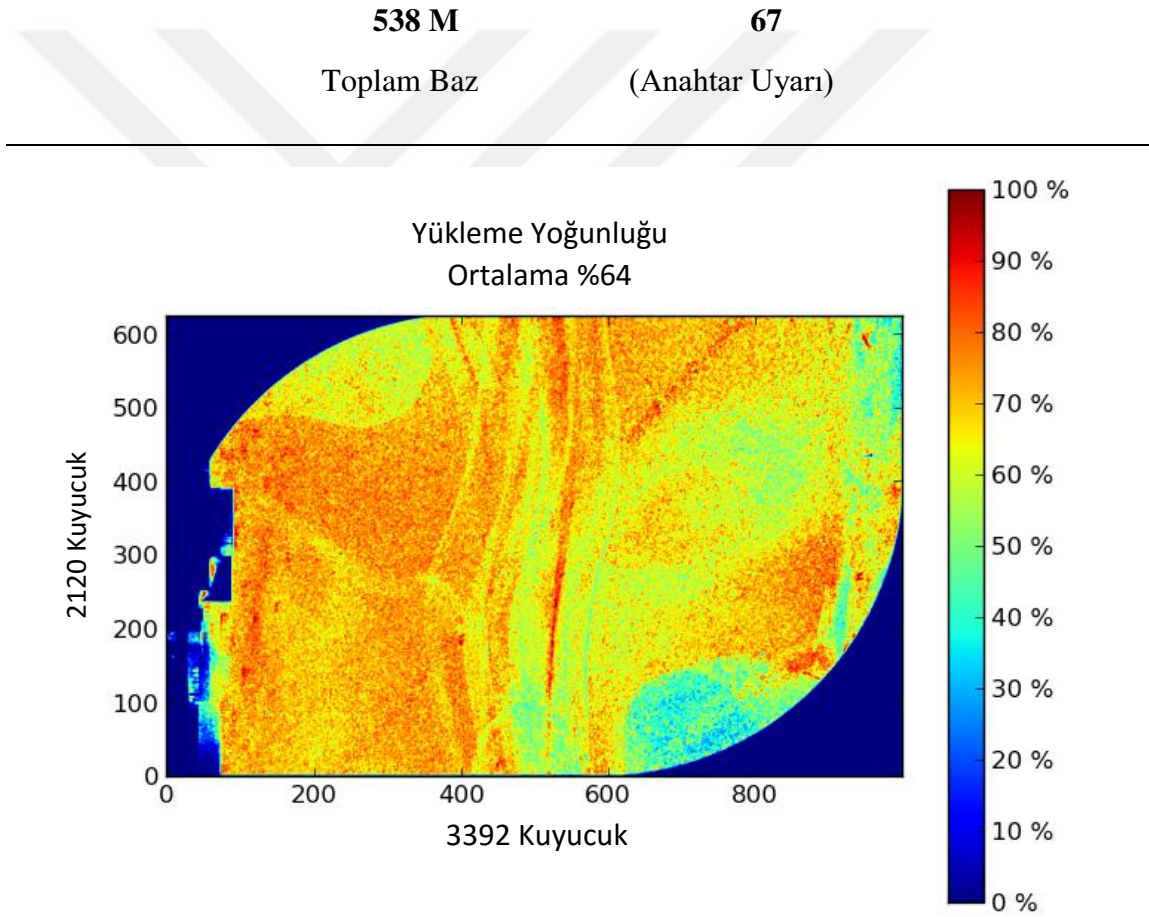
Yeni nesil dizileme ile tamamlanan tüm gen dizileme aşamasının ardından sunucularımızda toplanan ham veriler; Ion Reporter web tabanlı analiz sistemi (<https://ionreporter.thermofisher.com/ir/>), IGV (Interactive Genomics Viewer) (<https://www.broadinstitute.org/software/igv/home>) programı ve çeşitli genom veritabanları kullanılarak analiz edildi. Mutasyonların kliniğe etkilerinin tespiti HGMD (The Human Gene Mutation Database) (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>) veri tabanı üzerinden tespit edildi. Mutasyonlar, toplumsal varyantlar, varsa yeni mutasyonların tespiti ve bunların kliniğe etkilerinin olup olmadığına bağlı olarak değerlendirildi. LDLR ve APOB genlerine ait olan tüm ekzonlar, ekzon - ekzon bağlantı noktaları, bu bölgelerde önemli olan intronlar ve 5’ ve 3’ uç bölgelerinin tamamı tarandı.

4. BULGULAR

Bu çalışmanın amacına uygun 10 hasta yüksek LDL-K seviyeleri ve aile öyküleri de göz önüne alınarak çalışmaya dahil edildi. Yeni Nesil Dizileme aşamasının ardından yüksek baz okumaları elde edildi (ortalama 1000x coverage). Az okunan veya polimerazyon hatası gibi düşük seviyeli veriler çalışmaya dahil edilmedi. Neticede 10 hastada Ailesel Hiperkolesterolemi ile ilişkili olan LDLR ve APOB genlerinde kliniğe etkisi bulunan önemli mutasyonlar tespit edildi. Bunların yanında diğer metabolizma hastalıklarıyla ilişkilendirilmiş mutasyonlar da Yeni Nesil Dizileme yöntemiyle aynı işlemler içerisinde tespit edilmiş oldu. Çalışma neticesinde elde edilen bulgularımıza göre; 6 hastada LDLR ve APOB genlerinde Hiperkolesterolemi ile direk ilişki mutasyonlar tespit edildi. 10 hastanın tamamında ise bu genlerde çeşitli ekzonik ve intronik dönüşümler ve farklı hastalıklara sebebiyet veren mutasyonlar gözlemlendi. (Tablo 4.5, 4.6) Hiperkolesterolemiye yol açan p.Val426Met (71) dönüşümü 1 hastada heterozigot olarak, p.Trp577Arg (72) dönüşümü 1 hastada homozigot olarak tespit edildi. APOB geninde Hiperkolesterolemi ile ilişkili, p.Pro2739Leu (73) dönüşümü 2 hastada homozigot, 2 hastada heterozigot; p.Ser3279Gly (74) dönüşümü 2 hastada heterozigot olarak saptanmıştır. Bunlara ek olarak; Değişken APOB düzeylerinin meydana gelmesine yol açan p.Ala618Val (75) dönüşümü 1 hastada heterozigot olarak; Hipobetalipoproteini ile ilişkilendirilmiş olan p.Arg1128His (76) dönüşümü 1 hastada heterozigot olarak; Hipertrigliseridemiye yol açabilen p.Thr4484Met (74) dönüşümü 2 hastada heterozigot olarak; yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) Kolesterol metabolizmasıyla ilişkilendirilmiş olan p.Ala4481Thr (77) dönüşümü ise 1 hastada heterozigot şeklinde tespit edilmiştir. Literatürde tanımlı ve çeşitli metabolik bozukluklarla ilişkilendirilmiş bu dönüşümlerin yanı sıra; aynı aileye mensup 4 hastada; daha önce literatürde tanımlı olmadığını belirlediğimiz; LDLR geni, Ekzon 15, 766. Aminoasit üzerinde homozigot bir bazlık delesyon saptanmıştır. Bunun yanı sıra, Hiperkolesterolemi kliniğine etkisi bilinen LDLR genine ait heterozigot bir mutasyon taşıdığını tespit ettiğimiz bir hastada, yine LDLR geni, bu kez Ekzon 10 üzerinde iki bazlık heterozigot bir delesyon tespit edilmiştir.

4.1. Çip Yükleme Görüntüsü

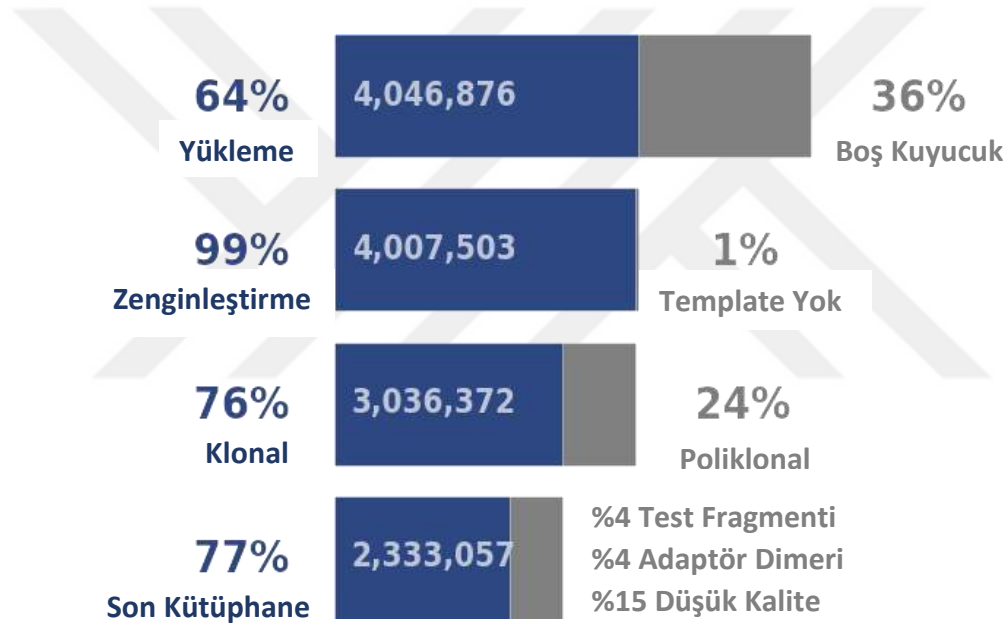
Yaklaşık 800 Milyon baz okuma kapasitesine sahip Ion Torrent™ Ion 316™ Chip Kit v2 (Thermo Scientific, Waltham, USA) çip kullanılmıştır. 538 Milyon baz okuması elde edilmiştir. Anahtar uyarısı (Key Signal); alt limit %30 olarak belirlenmiş ve %67 olarak elde edilmiştir. Renkler ve yüzdelerin artışı yükleme yoğunluğunun yüksek olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1. Yeni Nesil Dizileme aşamasına ait çip görüntüsü.

4.2. Çip Yükleme Özeti

Sunucularımıza ait verileri görüntülediğimiz Ion Torrent sunucu veritabanından elde edilen, çip yükleme gerçekleştirilen çalışmanın temel 4 aşamasına dair bilgiler Şekil 4.2.'deki gibidir. %76 klonal, kullanılan DNA kalitesinin iyi seviyede olduğunu belirtmektedir. Son kütüphane aşamasında %77 oranında yüksek bir kalite, zenginleştirme aşamasında %99 oranında ve çip yükleme aşamasında da %64 oranında sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 4.2. Yeni Nesil Dizileme aşamasına ait çip yükleme özeti.

4.3. Çip İyon Küre Parçacıkları (ISP) Özeti

Yeni Nesil Dizileme aşaması sonrası çipe yüklenen ve kullanılabilir iyon küre parçacıklarına (ISP) ait bilgiler Tablo 4.1’ deki gibidir.

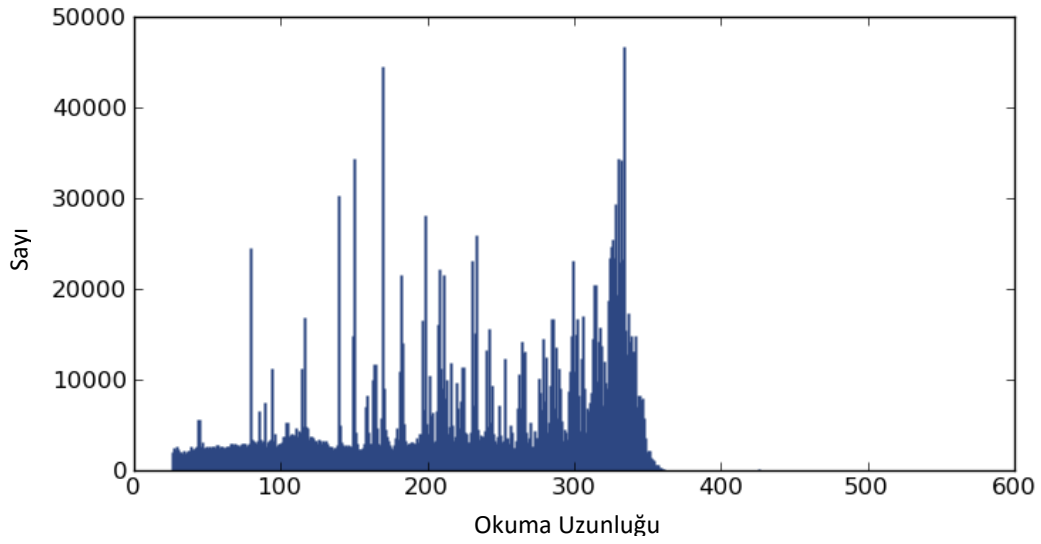
Tablo 4.1. Yeni Nesil Dizileme aşamasına ait çip ISP Özeti.

Çip kuyucuk detayları		
Adreslenebilir (Hedef) Kuyu	6,337,389	
ISP İçeren	4,046,876	63.9%
Canlı	4,007,503	99.0%
Test Kısmı	127,971	03.2%
Kütüphane	3,879,532	96.8%
Kütüphane ISP Detayları		
Kütüphane ISP’leri	3,879,532	
Filtrelenmiş: Poliklonal	971,131	25.0%
Filtrelenmiş: Düşük Kalite	444,645	11.5%
Filtrelenmiş: Adaptör Dimeri	130,699	03.4%
Son Kütüphane ISP’leri	2,333,057	60.1%

ISP: Ion Sphere Particles (İyon Küre Parçacıkları)

4.4. Okuma Uzunluğu Detayları

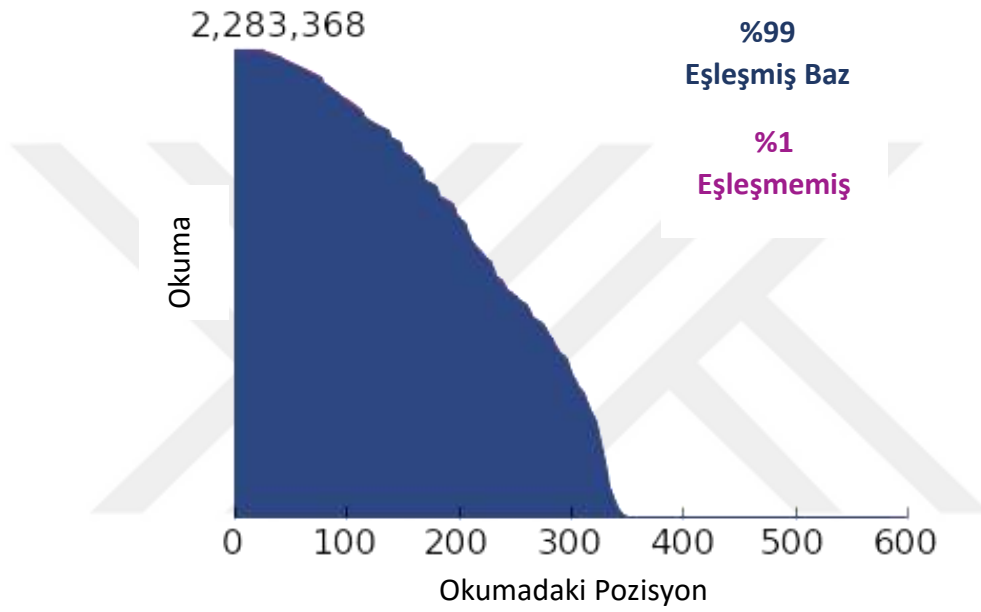
Yeni Nesil Dizileme aşaması sonrası okunan ampikonların uzunluk grafiği Şekil 4.3'teki gibidir. Oluşturulan gen paneli 400 bç ampikonluk panel olduğundan dolayı panelin ulaşacağı ideal okumalar elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Yeni Nesil Dizileme aşamasında kullanılan ve okunmuş olan ampikonların uzunluk detay grafiği.

4.5. Okuma Eşleşme Oranları

Yeni Nesil Dizileme aşamasında kullanılan referans diziyle gerçekleştirilen sekans aşamasındaki dizilerin doğru eşleşmesi gerekir. Eşleşme oranlarının yüksek olması analiz aşamasında gerekecek olan doğruluk için oldukça önemlidir. Barkod adaptörler ve 3' uç dizileri hariç tutulduğun 523 Milyon toplam baz eşleşmesi sağlanmıştır.



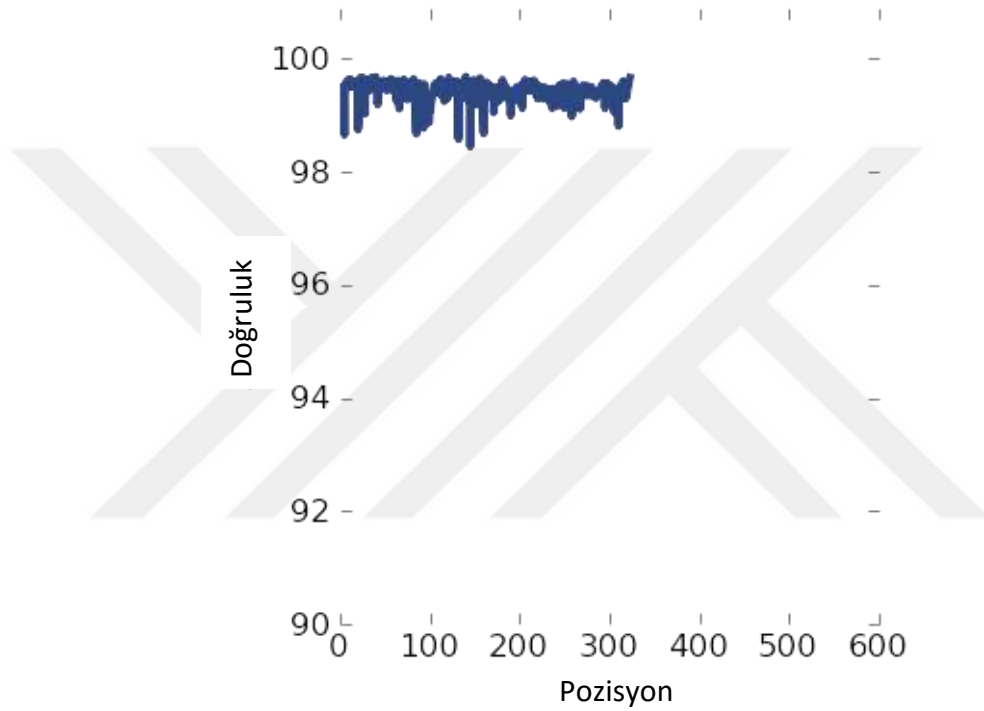
Şekil 4.4. Yeni Nesil Dizileme sonrası gerçekleştirilen okumaların eşleşme grafiği.

Tablo 4.2. Yeni Nesil Dizileme sonrası gerçekleştirilen okumaların eşleşme sayı ve oranları

Okuma	Sayı	%
Toplam Okuma	2,283,368	—
Eşleşmiş Okuma	2,275,827	99.7%
Eşleşmemiş Okuma	7,541	0.3%

4.6. Ham Veri Doğruluğu

Yeni Nesil Dizileme aşamasının ardından elde edilen ham verilerin doğruluğu filtrelenmemiş şekilde belirtilmiştir. Ortalama ham veri doğruluğu okumada her baz pozisyonu tek tek değerlendirilerek belirlenmiştir. Bu değer %99.4 olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Yeni Nesil Dizileme sonrası elde edilen ham veri doğruluk detay grafiği.

4.7. Okuma Eşleşme Kalitesi

Yeni Nesil Dizileme aşaması sonrası elde edilen okuma sayıları ve referans dizi ile eşleşme kalitesi sayıları Tablo 4.3'teki gibidir. AQ17; %2 ve daha az bir hata oranını temsil etmektedir. AQ20; %1 ve daha az bir hata oranını temsil etmektedir. En iyi olarak belirtilen kısımda ise, en iyi ve en uzun eşlenmiş olan parçalar ifade edilmektedir. Ortalama kapsam derinliğinde ise, ortalama olarak kapsayan okumanın (coverage) kalite seviyeleri belirtilmiştir.

Tablo 4.3. Yeni Nesil Dizileme sonrası elde edilen eşleşme kalitesi tablosu.

512 M			
AQ17 Toplam Baz			
Eşleşme Kalitesi			
	AQ17	AQ20	En İyi
Toplam Baz Sayısı [bç]	512 M	480 M	345 M
Ortalama Uzunluk [bç]	230	222	166
En uzun Eşleşme [bç]	485	485	485
Ortalama Kapsam Derinliği [x]	0.2	0.2	0.1

AQ: Aligment Quality (Eşleşme Kalitesi)

4.8. Ortalama Okuma (Coverage) Değerleri

Yeni Nesil Dizileme aşaması sonrası elde edilen bazlar ortalama okuma değerleri Tablo 4.4'teki gibidir. Yeni Nesil Dizileme yönteminde ortalama okuma (coverage) oldukça önemlidir. Bu ifade, her bir bazın bir dizileme aşaması boyunca kaç kere tekrar edilerek okunduğunu belirtmektedir. Bu değerler, her bir çalışılan örnek için ayrı ayrı değerlendirilerek hesaplanır. Değerler yükseldikçe bazların da o kadar kez tekrar edildiği anlaşılır ve bu da elde edilen verilerin doğruluğu hakkında önemli bir ayrıntı sunmaktadır.

Tablo 4.4. Yeni Nesil Dizileme aşaması sonrası elde edilen ortalama okuma (coverage) değerleri.

Barkod Numarası	Örnek	Eşlenmiş Okuma	Hedef	OOD	İstikrar
IonXpress_001	LDLR1	69,661	98.30%	273.1	92.44%
IonXpress_002	LDLR2	132,3	99.01%	504.2	92.69%
IonXpress_003	LDLR3	232,552	99.08%	892.7	92.54%
IonXpress_004	LDLR4	281,688	98.73%	1,09	92.72%
IonXpress_005	LDLR5	350,139	98.69%	1,3	91.93%
IonXpress_006	LDLR6	235,616	98.53%	902.3	92.41%
IonXpress_007	LDLR7	326,827	95.23%	1,186	92.05%
IonXpress_008	LDLR8	200,078	98.19%	787.5	92.36%
IonXpress_009	LDLR9	242,78	97.99%	942.6	92.51%
IonXpress_010	LDLR10	204,186	95.86%	767.3	92.40%

OOD: Ortalama Okuma Derinliği (Mean Depth)

4.9. LDLR Mutasyonları

Tablo 4.5. LDLR genine ait tespit ettiğimiz ekzonik mutasyonlar.

Hasta Sayısı		AA	Baz	rs	Klinik Etki
Heterozigot	Homozigot	Dönüşümü	Dönüşümü	Numarası	
1		p.(Cys27=)	c.81C>T	rs2228671	Etki bulunamadı
1		p.(Val429Met)	c.1285G>A	rs28942078	Hiperkolesterolemi
	1	p.(Trp577Arg)			Hiperkolesterolemi
3	6	p.(Arg471=)	c.1413A>G	rs5930	Muhtemel benign alel
2		p.(Pro539=)	c.1617C>T	rs5929	Etki bulunamadı
3	5	p.(Asn591=)	c.1773C>T	rs688	Etki bulunamadı
3	5	p.(Val653=)	c.1959T>C	rs5925	Etki bulunamadı
1	8	p.(Arg744=)	c.2232A>G	rs5927	Etki bulunamadı

LDLR: Low Density Lipoprotein Receptor – AA: Aminoasit

4.10. APOB Mutasyonları

Tablo 4.6. APOB genine ait tespit ettiğimiz ekzonik mutasyonlar.

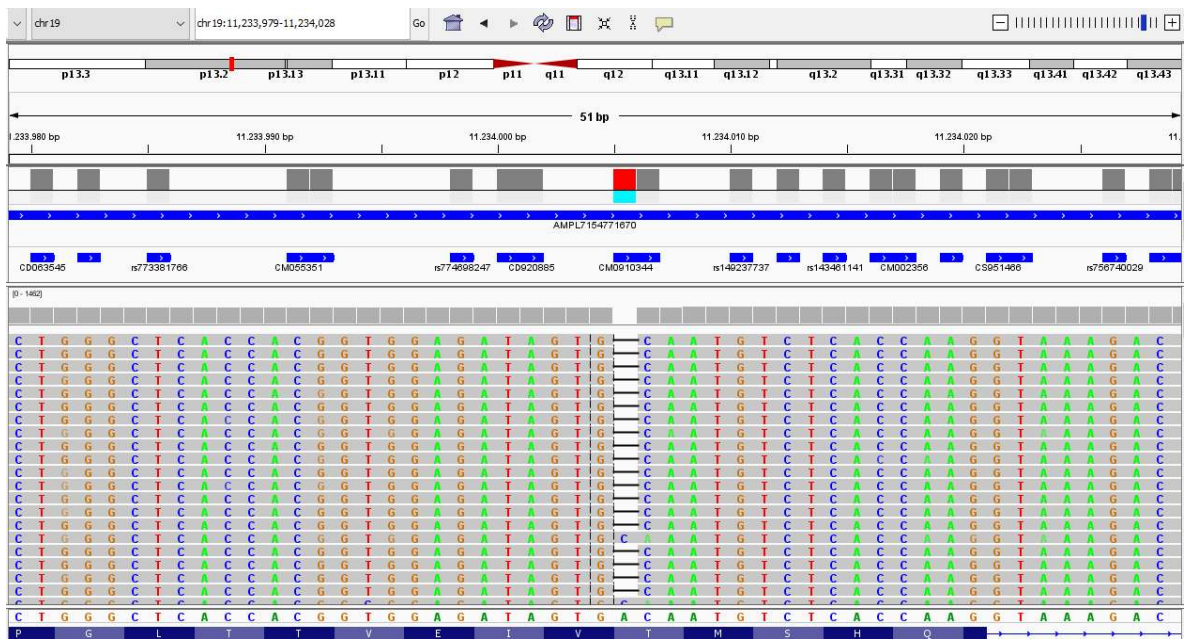
Hasta Sayısı		AA Dönüşümü	Baz Dönüşümü	rs Numarası	Klinik Etki
Heterozigot	Homozigot				
1	2	p.(Ala618Val)	c.1853C>T	rs679899	Değişken APOB düzeyleri
1		p.(Arg1128His)	c.3383G>A	rs12713843	Hipobetalipoproteinemi
1		p.(Leu1609=)	c.4825T>C	rs72653083	Etki bulunamadı
2	2	p.(Pro2739Leu)	c.8216C>T	rs676210	Hiperkolesterolemi, ilişkili
1	6	p.(Ser4338Asn)	c.13013G>A	rs1042034	Muhtemel benign alel
3	3	p.(Thr2515=)	c.7545C>T	rs693	Etki bulunamadı
2		p.(Thr98Ile)	c.293C>T	rs1367117	Etki bulunamadı
1		p.(Ala4481Thr)	c.13441G>A	rs1801695	HDL Kolesterol, ilişkili
2		p.(Thr4484Met)	c.13451C>T	rs12713450	Hipertrigliseridemi ?
2		p.(Ser3279Gly)	c.9835A>G	rs12720854	Hipertrigliseridemi, Hiperkolesterolemi

APOB: Apolipoprotein B – AA: Aminoasit – HDL: High Density Lipoprotein

4.11. LDLR Geninde Yeni Mutasyonlar

4.11.1. Aynı Aile Bireylerinde Yeni Homozigot Delesyon

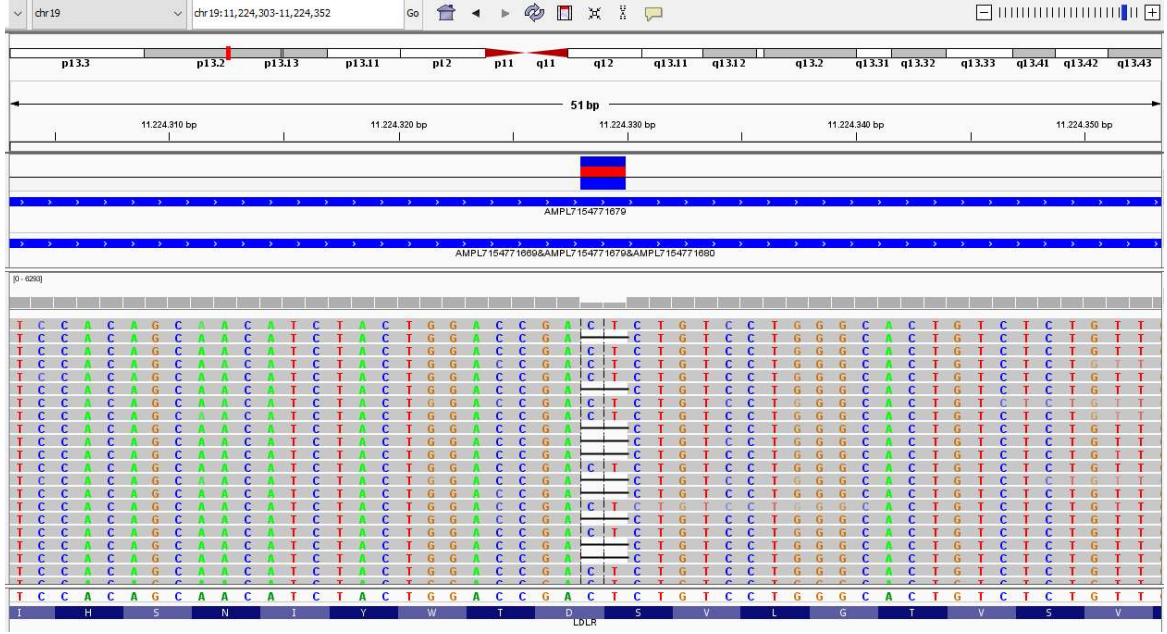
Aynı aileye mensup 4 hastada; daha önce literatürde tanımlı olmadığını belirlediğimiz; LDLR geni, Ekzon 15, 766. Aminoasit üzerinde homozigot bir bazlık delesyon saptanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. LDLR Geninde tespit ettiğimiz aynı aileye mensup 4 hastadaki yeni bir bazlık homozigot delesyon.

4.11.2. Bir Hastada Yeni İki Bazlık Heterozigot Delesyon

Hiperkolesterolemi kliniğine etkisi bilinen LDLR genine ait heterozigot bir mutasyon taşıdığını tespit ettiğimiz bir hastada, yine LDLR geni, bu kez Ekzon 10 üzerinde iki bazlık heterozigot bir delesyon tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. LDLR Geninde tespit ettiğimiz bir hastadaki yeni iki bazlık heterozigot delesyon.

5. TARTIŞMA

Ailesel Hiperkolesterolemi dünyada görülme sıklığı en yüksek seviyede olan genetik hastalıklardan biridir (78). Ailesel Hiperkolesterolemi hastalığının tanısında DNA sekanslama tabanlı gen dizileme yöntemi birincil önemli sayılabilecek bir yere sahiptir (4). Son yıllarda artan imkanlarla; Yeni Nesil Dizileme tabanlı teknolojilerin gelişmesi, yaygınlaşması ve genetik tanı için uygun hale getiriliyor olması da bu durumu daha önemli bir hale getirmiş durumdadır (4).

Lipidlerin ve lipoproteinlerin plazmada birikimi, aterosklerotik lezyonların gelişiminde birincil anahtar süreçtir (79). Bu lezyonların artmasıyla da damarların lümeni tıkanmaya ve ardından normal kan akımı engellenmeye başlar. Ateroskleroz, dünyada ölümlerin en sık sebebi olan koroner arter hastalığı ve diğer kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (80). Özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde de yüksek kolesterol olguları oldukça geniş bir yaygınlık göstermektedir. Ailesel Hiperkolesteroleminin erken tanısı, lipid miktarını düşürücü ajanlarla uygun tedavilerin başlanarak, Ateroskleroza neden olan bu ciddi komplikasyonların gelişmesinden önce engellenmesi ve azaltılması yönünde oldukça büyük öneme sahiptir (4).

Ailesel Hiperkolesteroleminin tanısı genellikle; 45 yaşlarından önce ortaya çıkan tendon ksantomaları ya da korneal arkuslar gibi fiziksel belirtilerle, kandaki LDL-K düzeyi gibi laboratuvar bulgularıyla ve hastanın yüksek LDL-K düzeyi ile birlikte kardiyovasküler hastalık geçmişi değerlendirilerek konulabilir (81). Ancak bu fiziksel belirteçlerin yokluğu hastalığın tanısını göz ardı etmek anlamına gelmemektedir (4). Çünkü Heterozigot Ailesel Hiperkolesterolemi hastalarının yaklaşık yarısında bu fiziksel belirtiler gözlemlenmemektedir ve bunu takiben Heterozigot Ailesel Hiperkolesterolemi hastalarında genellikle erken koroner arter hastalığına dair bulgular görülmez (4). Üstelik bazı monogenik hiperkolesterolemilerde, lipid plazma düzeyleri normal aralıklara yakın seviyede seyretmektedir. Bu gibi nedenlerle, Ailesel Hiperkolesteroleminin tanısının doğrulanmasında DNA tabanlı genetik testlerin gerekliliği ortadadır (4).

Biz de bu çalışmamızda Gaziantep ve çevresindeki illerde yaşayan Ailesel Hiperkolesterolemi hastalarında, bu hastalık ile ilişkili; LDLR ve APOB genlerinin Yeni Nesil Dizileme yöntemi kullanılarak tüm gen dizilemesi, bu genlerdeki mutasyonların tespiti, daha önce bu genlerde tespit edilmemiş yeni mutasyonların tespiti ve bu hastalığın

teşhisinde Yeni Nesil Dizileme tabanlı genetik tanının öneminin belirlenmesini amaçladık. LDL-K seviyesi yüksek seyreden (300mg/dl ve üzeri) 10 hasta çalışmaya dahil edildi. Yeni Nesil Dizileme yöntemi kullanılarak gerçekleştirilen tüm gen dizilemesi sonucu her iki gende de önemli mutasyonlar tespit edilmiştir (Tablo 4.5, 4.6). Hiperkolesterolemi kliniği ile ilişkili 4 farklı mutasyonu 6 hastada saptandı. LDLR genindeki p.(Val429Met) ve p.(Trp577Arg) mutasyonlarını heterozigot olarak tespit ettik. Özellikle APOB genindeki p.(Pro2739Leu) dönüşümünü iki heterozigot, iki homozigot olgusu olmak üzere 4 hastada tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra, Apolipoprotein B hasarı sonucu ortaya çıkan ve Hipobetalipoproteinemi'ye yol açan p.(Arg1128His) mutasyonunu; Hipertrigliseridemi'ye yol açan p.(Thr4484Met) ve p.(Ser3279Gly) mutasyonlarını ikişer hastada heterozigot şeklinde gözlemlenmiştir. Tüm bunların yanı sıra, literatürde tanımlı olmayan ve kliniğe etkisi bilinmeyen iki tane oldukça önemli olabileceğini düşündüğümüz ekzonik bölge delesyonları tespit edilmiştir. Bu yeni delesyonlar üzerinde, gerekli konfirmasyon ve validasyon çalışmalarımızı gerçekleştirdikten sonra, bu yeni olguların literatüre kazandırılmasını sağlayacağız.

Bu son verilerimizden de yola çıkarak, Ailesel Hiperkolesterolemi tanısında Yeni Nesil Dizileme yöntemi tabanlı moleküler genetik tanının kliniğe uyarlanabilirliğinin hastalığın erken tanısı ve tedavisi, aynı zamanda erken koroner kalp hastalığı ve diğer kardiyovasküler hastalıkların önceden tespiti, tedavisi ve kişiye özgü tedavi seyrinin belirlenmesi açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz. Aynı zamanda bu hastalıkla ilişkili olabilecek diğer genlerin Yeni Nesil Dizileme yöntemi ile yeni paneller oluşturularak aynı anda, aynı maliyetle birden fazla gen mutasyon taramasının yapılması sağlanabilir. Ayrıca ortaya konacak bu yeni panel ve bu yolaklardaki aydınlatılacak yeni gen mutasyonlarıyla, erken koroner arter hastalığı ve diğer kardiyovasküler hastalıkların erken teşhisine bağlı olarak bu hastalıkların hasta için zorluklarının azaltılmasının ve tedavi maliyetlerinin de düşürülmesi sağlanabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Fahed AC, Nemer GM. Familial hypercholesterolemia: the lipids or the genes? Nutrition & metabolism. 2011;8:1.
2. Sinan Ü, Sansoy V. [Familial hypercholesterolemia: epidemiology, genetics, diagnosis, and screening]. Turk Kardiyoloji Dernegi arsivi: Turk Kardiyoloji Derneginin yayin organidir. 2014;42:1-9.
3. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell. 2011;145:341-355.
4. Radovica-Spalvina I, Latkovskis G, Silamikelis I, Fridmanis D, Elbere I, Ventins K, Ozola G, Erglis A, Klovins J. Next-generation-sequencing-based identification of familial hypercholesterolemia-related mutations in subjects with increased LDL-C levels in a latvian population. BMC medical genetics. 2015;16:1.
5. Vandrovcova J, Thomas ER, Atanur SS, Norsworthy PJ, Neuwirth C, Tan Y, Kasperaviciute D, Biggs J, Game L, Mueller M. The use of next-generation sequencing in clinical diagnosis of familial hypercholesterolemia. Genetics in Medicine. 2013;15:948-957.
6. Henderson R, O’Kane M, McGilligan V, Watterson S. The genetics and screening of familial hypercholesterolaemia. Journal of biomedical science. 2016;23:1.
7. de Backer G, Piepoli MF, Wood D: The ESC Textbook of Preventive Cardiology, Oxford University Press, USA; 2015.
8. <https://tr.wikipedia.org/wiki/Ateroskleroz>. Erişim Tarihi: 06.07.2016.

9. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. *Circulation research*. 2016;118:535-546.
10. Zengin H. Ateroskleroz patogenezi. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2012;29.
11. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011;473:317-325.
12. Hopkins PN, Toth PP, Ballantyne CM, Rader DJ. Familial hypercholesterolemias: prevalence, genetics, diagnosis and screening recommendations from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *Journal of clinical lipidology*. 2011;5:S9-S17.
13. Liyanage KE, Burnett JR, Hooper AJ, van Bockxmeer FM. Familial hypercholesterolemia: epidemiology, Neolithic origins and modern geographic distribution. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2011;48:1-18.
14. Khachadurian AK. The inheritance of essential familial hypercholesterolemia. *The American journal of medicine*. 1964;37:402-407.
15. Brown MS, Goldstein JL. Familial hypercholesterolemia: A genetic defect in the low-density lipoprotein receptor. *New England Journal of Medicine*. 1976;294:1386-1390.
16. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986;232:34-47.
17. Wu LL, Hopkins PN, Xin Y, Stephenson SH, Williams RR, Nobe Y, Kajita M, Nakajima T, Emi M. Co-segregation of elevated LDL with a novel mutation (D92K) of the LDL receptor in a kindred with multiple lipoprotein abnormalities. *Journal of human genetics*. 2000;45:154-158.
18. Civeira F, Jarauta E, Cenarro A, García-Otín AL, Tejedor D, Zambón D, Mallen M, Ros E, Pocoví M. Frequency of low-density lipoprotein receptor gene mutations in

patients with a clinical diagnosis of familial combined hyperlipidemia in a clinical setting. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52:1546-1553.

19. Hovingh GK, Davidson MH, Kastelein JJ, O'Connor AM. Diagnosis and treatment of familial hypercholesterolaemia. *European heart journal*. 2013;34:962-971.

20. Genest J, Martin-Munley SS, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner J, Myers RH, Silberman SR, Wilson P, Salem D, Schaefer E. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation*. 1992;85:2025-2033.

21. Gaudet D, Vohl M-C, Julien P, Tremblay G, Perron P, Gagné C, Bergeron J, Moorjani S, Després J-P. Relative contribution of low-density lipoprotein receptor and lipoprotein lipase gene mutations to angiographically assessed coronary artery disease among French Canadians. *The American journal of cardiology*. 1998;82:299-305.

22. Kayıkçıoğlu M. Homozigot ailevi hiperkolesterolemi. 2014.

23. Kayıkçıoğlu M, Kısımlı E, Can L, Payzin S. [Long-term follow-up in patients with homozygous familial hypercholesterolemia; 13-year experience of a university hospital lipid clinic]. *Türk Kardiyoloji Dernegi arsivi: Turk Kardiyoloji Derneginin yayin organidir*. 2014;42:599-611.

24. Goldberg AC, Hopkins PN, Toth PP, Ballantyne CM, Rader DJ, Robinson JG, Daniels SR, Gidding SS, De Ferranti SD, Ito MK. Familial hypercholesterolemia: screening, diagnosis and management of pediatric and adult patients: clinical guidance from the National Lipid Association Expert Panel on Familial Hypercholesterolemia. *Journal of clinical lipidology*. 2011;5:S1-S8.

25. Scriver CR: *The metabolic & molecular bases of inherited disease*, New York; Montreal: McGraw-Hill; 2001.

26. Özcan ÖU, Güleç S. Heterozigot ailevi hiperkolesterolemi. 2014.

27. Varret M, Abifadel M, Rabès JP, Boileau C. Genetic heterogeneity of autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clinical genetics*. 2008;73:1-13.

28. Soutar AK, Naoumova RP. Mechanisms of disease: genetic causes of familial hypercholesterolemia. *Nature clinical practice Cardiovascular medicine*. 2007;4:214-225.
29. Civeira F, Hypercholesterolemia IPoMoF. Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*. 2004;173:55-68.
30. Reiner Ž, Catapano AL, De Backer G, Graham I, Taskinen M-R, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman MJ, Durrington P. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *European heart journal*. 2011;32:1769-1818.
31. Leigh S, Foster A, Whittall R, Hubbart C, Humphries S. Update and analysis of the University College London low density lipoprotein receptor familial hypercholesterolemia database. *Annals of human genetics*. 2008;72:485-498.
32. Hasheminia T. Diyetle Ceviz İçi Eklenmesinin Hiperkolesterolemik Çocukların Serum Lipid Düzeylerine Etkisi. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. 2008.
33. Sonel A. Kardiyoloji. İzmir Güven Kitabevi. 779 s. İzmir. 2002.
34. Gök H. Klinik kardiyoloji. Nobel Tıp Kitabevleri Yayınları. 954 s. İstanbul. 2002.
35. Descamps O, Gilbeau JP, Leysen X, Van Leuven F, Heller F. Impact of genetic defects on atherosclerosis in patients suspected of familial hypercholesterolaemia. *European journal of clinical investigation*. 2001;31:958-965.
36. Austin MA, Hutter CM, Zimmern RL, Humphries SE. Familial hypercholesterolemia and coronary heart disease: a HuGE association review. *American journal of epidemiology*. 2004;160:421-429.

37. Kroon A, Ajubi N, ASTEN W, Stalenhoef A. The prevalence of peripheral vascular disease in familial hypercholesterolaemia. *Journal of internal medicine*. 1995;238:451-459.
38. Marduel M, Carrié A, Sassolas A, Devillers M, Carreau V, Di Filippo M, Erlich D, Abifadel M, Marques-Pinheiro A, Munnich A. Molecular spectrum of autosomal dominant hypercholesterolemia in France. *Human mutation*. 2010;31:E1811-E1824.
39. https://tr.wikipedia.org/wiki/LDL_reseptörü. Erişim Tarihi: 07.07.2016.
40. <https://www.qiagen.com/us/shop/genes-and-pathways/pathway-details/?pwid=268>. Erişim Tarihi: 07.07.2016.
41. Bell DA, Hooper AJ, Watts GF, Burnett JR. Mipomersen and other therapies for the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Vascular health and risk management*. 2012;8:651.
42. Beeharry D, Coupe B, Benbow E, Morgan J, Kwok S, Charlton-Menys V, France M, Durrington P. Familial hypercholesterolaemia commonly presents with Achilles tenosynovitis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2006;65:312-315.
43. Williams RR, Hunt SC, Schumacher MC, Hegele RA, Leppert MF, Ludwig EH, Hopkins PN. Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *The American journal of cardiology*. 1993;72:171-176.
44. Group SBR. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. *BMJ*. 1991;303:893-896.
45. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, Raal FJ, Santos RD, Hegele RA, Kuivenhoven JA, Nordestgaard BG, Descamps OS, Steinhausen-Thiessen E. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial

Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *European heart journal*. 2014;35:2146-2157.

46. Siripornpitak S, Pornkul R, Khowsathit P, Layangool T, Promphan W, Pongpanich B. Cardiac CT angiography in children with congenital heart disease. *European journal of radiology*. 2013;82:1067-1082.

47. Pisciotta L, Oliva CP, Pes GM, Di Scala L, Bellocchio A, Fresa R, Cantafora A, Arca M, Calandra S, Bertolini S. Autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) and homozygous familial hypercholesterolemia (FH): a phenotypic comparison. *Atherosclerosis*. 2006;188:398-405.

48. Gagné C, Gaudet D, Bruckert E, Group ES. Efficacy and safety of ezetimibe coadministered with atorvastatin or simvastatin in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Circulation*. 2002;105:2469-2475.

49. Çoker M. Ailevi hiperkolesterolemi tedavisinde LDL aferezi. 2014.

50. Thompson GR. Lipoprotein apheresis. *Current opinion in lipidology*. 2010;21:487-491.

51. Thompson GR, Barbir M, Davies D, Dobral P, Gesinde M, Livingston M, Mandry P, Marais A, Matthews S, Neuwirth C. Efficacy criteria and cholesterol targets for LDL apheresis. *Atherosclerosis*. 2010;208:317-321.

52. Cuchel M, Meagher EA, du Toit Theron H, Blom DJ, Marais AD, Hegele RA, Aversa MR, Sirtori CR, Shah PK, Gaudet D. Efficacy and safety of a microsomal triglyceride transfer protein inhibitor in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a single-arm, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 2013;381:40-46.

53. Raal FJ, Santos RD, Blom DJ, Marais AD, Charng M-J, Cromwell WC, Lachmann RH, Gaudet D, Tan JL, Chasan-Taber S. Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous

familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. The Lancet. 2010;375:998-1006.

54. Raal F, Scott R, Somaratne R, Bridges I, Li G, Wasserman SM, Stein EA. Low-Density Lipoprotein Cholesterol–Lowering Effects of AMG 145, a Monoclonal Antibody to Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 Serine Protease in Patients With Heterozygous Familial Hypercholesterolemia The Reduction of LDL-C With PCSK9 Inhibition in Heterozygous Familial Hypercholesterolemia Disorder (RUTHERFORD) Randomized Trial. Circulation. 2012;126:2408-2417.

55. Stein EA, Gipe D, Bergeron J, Gaudet D, Weiss R, Dufour R, Wu R, Pordy R. Effect of a monoclonal antibody to PCSK9, REGN727/SAR236553, to reduce low-density lipoprotein cholesterol in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia on stable statin dose with or without ezetimibe therapy: a phase 2 randomised controlled trial. The Lancet. 2012;380:29-36.

56. Durington PaS, A. Fast facts hiperlipidemi. AND Danışmanlık, Eğitim, Yayıncılık Organizasyon Ltd.Şti, 112 s., İstanbul. Fast facts hiperlipidemi AND Danışmanlık, Eğitim, Yayıncılık Organizasyon LtdŞti İstanbul. 2001;112 s.

57. Bilir B, Bilir BE, TAKIR M, Sertbaş Y, AKINCI CM, Çiftçi H. Ezetimib monoterapisinin lipoprotein (a) ve diğer lipid parametreleri üzerine etkisi.

58. Aizawa Y, Seki N, Nagano T, Abe H. Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. World journal of gastroenterology: WJG. 2015;21:10299.

59. Küçükkaya B. Hiperlipidemik Hastalarda Ezetemib Monoterapisinin Lipid Profili İle Enflamatuvar Belirteçlerin Üzerindeki Etkileri.

60. Granner DK, Murray RK, Mayes PA, Rodwell VW: Harper's Biochemistry, Appleton & Lange; 1988.

61. Ginsberg HN. Lipoprotein physiology. Endocrinology and metabolism clinics of North America. 1998;27:503-519.

62. Shepherd J. Lipids in health and disease. *Biochemical Society Transactions*. 2004;32:1051-1056.
63. Rigotti A, Krieger M. Getting a handle on “good” cholesterol with the high-density lipoprotein receptor. *New England Journal of Medicine*. 1999;341:2011-2013.
64. Young S. Recent progress in understanding apolipoprotein B. *Circulation*. 1990;82:1574-1594.
65. Tietz NW, Andresen BD: *Textbook of clinical chemistry*, Saunders Philadelphia et al.; 1986.
66. Mayes PA, Botham KM. Cholesterol synthesis, transport, and excretion. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 2003:219-227.
67. Hampton RY. Proteolysis and sterol regulation. *Annual review of cell and developmental biology*. 2002;18:345-378.
68. Ballantyne CM, O'Keefe JH, Gotto AM: *Dyslipidemia essentials*, Physicians Press; 2007.
69. Istvan ES, Deisenhofer J. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2000;1529:9-18.
70. Onat A, Surdum-Avci G, Senocak M, Ornek E, Gözükar Y. Plasma lipids and their interrelationship in Turkish adults. *Journal of epidemiology and community health*. 1992;46:470-476.
71. Leitersdorf E, Tobin E, Davignon J, Hobbs H. Common low-density lipoprotein receptor mutations in the French Canadian population. *Journal of Clinical Investigation*. 1990;85:1014.

72. Widhalm K, Binder CB, Kreissl A, Aldover-Macasaet E, Fritsch M, Kroisboeck S, Geiger H. Sudden death in a 4-year-old boy: a near-complete occlusion of the coronary artery caused by an aggressive low-density lipoprotein receptor mutation (W556R) in homozygous familial hypercholesterolemia. *The Journal of pediatrics*. 2011;158:167.
73. Leren TP, Bakken KS, Hoel V, Hjermann I, Berg K. Screening for mutations of the apolipoprotein B gene causing hypocholesterolemia. *Human genetics*. 1998;102:44-49.
74. Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, Cao H, McIntyre AD, Ban MR, Martins RA, Kennedy BA, Hassell RG, Visser ME. Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia. *Nature genetics*. 2010;42:684-687.
75. Ilmonen M, Knudsen P, Taskinen M-R, Tikkanen MJ. Genetic variation in the amino-terminal part of apolipoprotein B: studies in hyperlipidemic patients. *Atherosclerosis*. 1998;138:367-374.
76. Lancellotti S, Di Leo E, Penacchioni JY, Balli F, Viola L, Bertolini S, Calandra S, Tarugi P. Hypobetalipoproteinemia with an apparently recessive inheritance due to a “de novo” mutation of apolipoprotein B. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2004;1688:61-67.
77. Edmondson AC, Braund PS, Stylianou IM, Khera AV, Nelson CP, Wolfe ML, DerOhannessian SL, Keating BJ, Qu L, He J. Dense genotyping of candidate gene loci identifies variants associated with high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation: Cardiovascular Genetics*. 2011;4:145-155.
78. Youngblom E, Knowles JW. *Familial hypercholesterolemia*. 2014.
79. El-Aziz TAA, Mohamed RH. LDLR, ApoB and ApoE genes polymorphisms and classical risk factors in premature coronary artery disease. *Gene*. 2016.
80. Sözen MM, Whittall R, Öner C, Tokatlı A, Kalkanoğlu HS, Dursun A, Coşkun T, Öner R, Humphries SE. The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients. *Atherosclerosis*. 2005;180:63-71.

81. Norsworthy PJ, Vandrovcsova J, Thomas ER, Campbell A, Kerr SM, Biggs J, Game L, Soutar AK, Smith BH, Dominiczak AF. Targeted genetic testing for familial hypercholesterolaemia using next generation sequencing: a population-based study. BMC medical genetics. 2014;15:1.



ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Gaziantep'in Şahinbey ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini burada tamamladı. 2010 yılında Gaziantep Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2014 yılında buradan mezun oldu. 2014 Güz döneminde Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.

