

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TİP 2 DİYABETLİ HASTALARDA PARAOKSONAZ 1  
L/M 55 ve Q/R 192 POLİMORFİZMLERİNİN  
PARAOKSONAZ 1 VE ANTİOKSİDAN ENZİM  
AKTİVİTELERİ İLE LİPİD DÜZEYLERİ ÜZERİNE  
ETKİLERİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Muhittin ÖNDERCİ**

**Elazığ-2007**

# ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Necip İLHAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Necip İLHAN  
Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof Dr. Necip İLHAN  
Danışman

## Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Necip İLHAN .....

Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU .....

Prof. Dr. Gıyasettin BAYDAŞ .....

Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU .....

Doç. Dr. İsmail TEMEL .....

## TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmam boyunca hiçbir zaman yardım ve desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Necip İLHAN'a teşekkürü borç bilirim.

Eğitimim süresince kendilerinden ders aldığım ve yardımlarını gördüğüm Biyokimya AD'nın değerli öğretim üyeleri Prof. Dr. M. Ferit GÜRSU, Prof. Dr. Bilal ÜSTÜNDAĞ, Prof. Dr. İhsan HALİFEOĞLU ve Doç. Dr. Nevin İLHAN ile Yrd. Doç. Dr. Dilara KAMAN ve Biyokimya AD'nda çalışan asistan arkadaşlarım ile tüm personele teşekkür ederim.

F.Ü. Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Yusuf ÖZKAN ve Endokrinoloji polikliniğinde görevli asistanlar ile kan örneklerinin toplanması esnasında yardımlarını gördüğüm Kan Alma Birimi çalışanlarına teşekkür ederim. Agaroz jel resimlerinin çekilmesinde yardımlarını gördüğüm F.Ü. Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji AD öğretim üyesi Doç. Dr. Hasan ÖNGÖR ve araştırma görevlisi Dr. Murat KARAHAN ile çalıştığım kurum olan Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü yöneticilerine ve bütün mesai arkadaşlarıma ve çalışmam süresince desteğini benden esirgemeyen F.Ü. Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları AD öğretim üyesi Prof. Dr. Kazım ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen annem ve babama, doktora çalışmam süresince desteğini hep yanımda gördüğüm eşim Selma ÖNDERCİ'ye teşekkür eder, çalışmam süresince yegane neşe kaynağım olan oğlum Taha Yusuf'a sevgilerimi sunarım.

Bu tez çalışmasını 1138 no'lu proje olarak destekleyen Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP)'ne teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

|  | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| <b>1. ÖZET</b> .....   | 1               |
| <b>2. ABSTRACT</b> .....                                     | 3               |
| <b>3. GİRİŞ</b> .....  | 5               |
| 3.1. PON 1 Geni .....  | 5               |
| 3.1.1. PON Gen Ailesi ve PON 1 Yapısı .....                  | 5               |
| 3.1.2. Kodlayan Bölgedeki M/L 55 ve R/Q Polimorfizmler ..... | 5               |
| 3.1.2.1. L/M 55 Polimorfizmi .....                           | 5               |
| 3.1.2.2. Q/R 192 Polimorfizmi .....                          | 7               |
| 3.1.2.3. I/V 102 Polimorfizmi .....                          | 7               |
| 3.1.2.4. Promotör Polimorfizmleri .....                      | 8               |
| 3.1.2.5. PON 1 Haplotipleri .....                            | 8               |
| 3.2. Paraoksonaz 1 (PON 1) Proteini .....                    | 8               |
| 3.2.1. Sentez ve Yapısı .....                                | 8               |
| 3.2.2. Paraoksonazın Enzim Sınıflandırılmasındaki Yeri ..... | 10              |
| 3.2.3. PON 1' in Kimyasal Özellikleri ve Aktif Merkezi ..... | 12              |
| 3.2.4. PON 1 Enzim Aktivitesi ve Ölçümü .....                | 16              |
| 3.2.5. PON 1 Ekspresyonunun Düzenlenmesi .....               | 17              |
| 3.2.6. Protein Yoğunluğunun Hesaplanması .....               | 18              |
| 3.2.7. PON 1'in Antioksidan Özellikleri .....                | 18              |
| 3.3. PON 2 .....   | 20              |
| 3.4. PON 3 .....   | 22              |

|  | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|--|------------------------|
| 3.5. PON 1 Lipoprotein İlişkisi .....  | 22                     |
| 3.5.1. Plazma Lipoproteinleri .....  | 22                     |
| 3.5.1.1. Lipoproteinlerin Yapısı .....   | 23                     |
| 3.5.1.2. Lipoproteinlerin Yapısında Bulunan Başlıca<br>Apolipoproteinler<br>ve Fonksiyonları ..... | 23                     |
| 3.5.1.3. Plazma Lipoproteinlerinin Yapı İşlev ve Metabolizması.....                                | 24                     |
| 3.5.2. HDL-PON 1 İlişkisi .....  | 26                     |
| 3.5.2.1. HDL Üzerinde, Enzimatik Etkiye Sahip Bazı Proteinler ....                                 | 27                     |
| 3.6. PON ve Hastalıklar .....  | 28                     |
| 3.6.1. Paraoksonaz 1 ve Ateroskleroz ile İlişkili Hastalıklar .....                                | 28                     |
| 3.6.2. PON 1 ve Koroner Kalp Hastalığı .....   | 28                     |
| 3.6.3. PON 1 ve Ailesel Hiperkolesterolemi .....   | 29                     |
| 3.6.4. PON1 ve Metabolik Sendrom .....   | 29                     |
| 3.6.5. PON 1 ve Sinirsel Hastalıklar .....   | 29                     |
| 3.6.6. PON 1 ve Böbrek Yetmezliği .....  | 30                     |
| 3.6.7. PON 1 ve Tangier Hastalığı .....  | 30                     |
| 3.7. PON 1 ve Diyabet (Diabetes Mellitus-DM) Arasındaki İlişki .....                               | 30                     |
| 3.7.1. Diabetes Mellitus .....   | 30                     |
| 3.7.1.1. Diyabetin Sınıflandırılması .....   | 31                     |
| 3.7.1.2. Diyabet Tanı Kriterleri .....   | 33                     |
| 3.7.2. Diyabetin Komplikasyonları .....  | 33                     |
| 3.7.2.1. Akut Komplikasyonlar .....  | 34                     |

|   | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| 3.7.2.2. Kronik Komplikasyonlar .....   | 34              |
| 3.8. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres .....                                       | 35              |
| 3.8.1. Serbest Radikaller .....   | 36              |
| 3.8.1.1. Serbest Radikallerin Oluşumu .....   | 36              |
| 3.8.1.2. Diyabet Patogenezinde Önemli Olan Bazı Serbest Radikaller...                 | 37              |
| 3.8.1.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Moleküller Üzerine Etkileri.....              | 39              |
| 3.9. Diyabetik Komplikasyonların Oluşumuna Yol Açan Başlıca Mekanizmalar ...          | 41              |
| 3.9.1. İlerlemiş Glikasyon Son Ürünleri (AGE) Aracılı ROS Oluşumu.....                | 41              |
| 3.9.2. Poliöl Yol .....   | 42              |
| 3.9.3. Protein Kinaz C (PKC) Aktivasyonu .....  | 42              |
| 3.9.4. Glikozun Oto-Oksidasyonu Sonucu Ve Mitokondrilerde<br>Süperoksid Üretimi ..... | 43              |
| 3.10. Diyabet ve Antioksidan Sistemler .....  | 43              |
| 3.10.1. Antioksidan Savunma Sisteminin Enzimatik Üyeleri .....                        | 44              |
| 3.10.1.1. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi .....                                | 44              |
| 3.10.1.2. Süperoksid Dismutaz (SOD) .....   | 44              |
| 3.10.1.3. Katalaz (CAT) .....   | 45              |
| 3.10.1. 4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) .....  | 45              |
| 3.10.1.5. Glutatyon Redüktaz (GR) .....   | 46              |
| 3.10.1. 6. Glutatyon S-Transferaz (GST) .....   | 46              |
| 3.10.1.7. Hidroperoksidazlar .....  | 46              |
| 3.10.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar .....  | 46              |

|   | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|---|------------------------|
| 3.10.2.1. Vitamin A ( $\beta$ -karoten) .....   | 46                     |
| 3.10.2.2. Vitamin C (Askorbik Asit) .....   | 47                     |
| 3.10.2.3. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol) .....  | 47                     |
| 3.10.2.4. Glutasyon (GSH) .....   | 48                     |
| 3.10.2.5. Melatonin .....   | 48                     |
| 3.10.2.6. Lipoik Asid .....   | 49                     |
| 3.11. Lipid Peroksidasyonu ve Diabetes Mellitus .....   | 49                     |
| 3.12. PON 1 Polimorfizmleri ve Diabetes Mellitus .....  | 51                     |
| <b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....   | <b>53</b>              |
| 4.1. Hasta ve Kontrol Grupları İçin Birey Seçimi .....  | 53                     |
| 4.2. Örneklerin Hazırlanması .....  | 53                     |
| 4.3. DNA İzolasyonu ve Genotiplendirme .....  | 53                     |
| 4.3.1. DNA İzolasyonu .....   | 54                     |
| 4.3.2. L/M 55 ve Q/R 192 Polimorfizmi İçin Polimeraz Zincir<br>Reaksiyonu (PZR) ve PZR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz<br>Enzimleri ile Kesimi ..... | 54                     |
| 4.4. Biyokimyasal Ölçümler .....  | 56                     |
| 4.4.1. Glukoz Ölçümü .....  | 56                     |
| 4.4.2. Lipid Ölçümleri .....  | 57                     |
| 4.4.3. Glikolize Hemoglobin (HbA1c) Ölçümü .....  | 57                     |
| 4.5. Serum Paraoksonaz Aktivitesi Ölçümü .....  | 57                     |

|   | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|---|------------------------|
| 4.6. Eritrosit SOD Aktivitesi Ölçümü .....  | 59                     |
| 4.7. Eritrosit Katalaz Aktivitesi Ölçümü .....  | 61                     |
| 4.8. Eritrosit GSH-Px Aktivitesi Ölçümü .....   | 62                     |
| 4.9. Hemoglobin Ölçümü .....  | 63                     |
| 4.10. Plazma MDA Ölçümü .....   | 65                     |
| 4.11. Biyoistatistiksel Analizler .....   | 68                     |
| <b>5. BULGULAR</b> .....  | <b>69</b>              |
| 5.1. Kontrol ve DM Grubunu Oluşturan Bireylerin Genel Özellikleri.....  | 69                     |
| 5.2. PZR ve RFLP ile Genotiplendirme Bulguları .....  | 71                     |
| 5.3. PON 1 Q/R 192 ve L/M 55 Genotip Dağılımı ile Q/R ve L/M Allel Sıklığının Kontrol ve DM Gruplarındaki Dağılımları ..... | 73                     |
| 5.3.1. PON 1 Q/R 192 Genotip Dağılımı ve Q/R Allel Sıklığı .....  | 73                     |
| 5.3.2. PON 1 L/M 55 Genotip Dağılımı ve L/M Allel Sıklığı .....   | 73                     |
| 5.4. Serum PON 1 Aktiviteleri .....   | 77                     |
| 5.5. Eritrosit SOD Aktiviteleri .....   | 79                     |
| 5.6. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktiviteleri .....   | 81                     |
| 5.7. Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri .....  | 83                     |
| 5.8. Plazma MDA Düzeyleri .....   | 85                     |
| 5.9. Serum HDL-Kolesterol Düzeyleri .....   | 87                     |
| 5.10. Serum LDL-Kolesterol Düzeyleri .....  | 89                     |
| 5.11. Serum Kolesterol Düzeyleri .....  | 91                     |
| 5.12. Serum Triglisericid Düzeyleri .....   | 93                     |

|                           | <u>Sayfa No</u> |
|---------------------------|-----------------|
| <b>6. TARTIŞMA</b> .....  | 95              |
| <b>7. KAYNAKLAR</b> ..... | 112             |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ</b> .....  | 126             |

## TABLO LİSTESİ

|  | <b><u>Sayfa No</u></b> |
|--|------------------------|
| <b>Tablo I.</b> Değişik toplumlarda PON 1 geninin allel dağılımları .....  | 7                      |
| <b>Tablo II.</b> Kontrol ve Tip 2 diyabetli (DM) hasta gruplarının klinik ve biyokimyasal değerleri .....  | 70                     |
| <b>Tablo III.</b> Kontrol ve DM Gruplarında PON 1 Q/R 192 ve L/M 55 Genotip Dağılımı ve Q/R ve L/M Allel Sıklığı .....   | 74                     |
| <b>Tablo IVa.</b> Kontrol ve DM gruplarının PON 1, SOD, CAT, GSH-Px Enzim Aktiviteleri, MDA Düzeyleri ve Lipid Profillerinin PON 1 Q/R 192 Genotiplerine Göre Dağılımı ..... | 75                     |
| <b>Tablo IVb.</b> Kontrol ve DM gruplarının PON 1, SOD, CAT, GSH-Px Enzim Aktiviteleri, MDA Düzeyleri ve Lipid Profillerinin PON 1 L/M 55 Genotiplerine Göre Dağılımı .....  | 76                     |

## ŞEKİL LİSTESİ

|  | <u>Sayfa No</u> |
|--|-----------------|
| <b>Şekil 1a.</b> PON gen ailesi ve PON 1, PON 2 ve PON 3 genlerinin insan 7. kromozomu q21. ve q22. bantları üzerindeki yerleri .....  | 6               |
| <b>Şekil 1b.</b> PON1 geninin yapısı .....   | 6               |
| <b>Şekil 2.</b> İnsan paraoksonaz enziminin (PON 1) yapısı .....   | 10              |
| <b>Şekil 3.</b> PON 1 substratları ve değişik enzim aktiviteleri .....   | 15              |
| <b>Şekil 4.</b> HDL-bağlı PON 1 ve PAF-AH enzimlerinin minimal modifiye edilmiş LDL (MM-LDL)'deki aktif lipidleri yıkmalarına ilişkin hipotez .....  | 21              |
| <b>Şekil 5.</b> PON 1 salınımı, HDL ile bağlanması ve lipid peroksidasyon alanına taşınması .....  | 27              |
| <b>Şekil 6.</b> Lipid peroksidasyonunun başlaması ve gelişmesi .....   | 50              |
| <b>Şekil 7.</b> MDA standart grafiği .....   | 66              |
| <b>Şekil 8a.</b> PON 1 Q/R 192 polimorfik bölgesine spesifik primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününün ethidium bromide ile boyanmış % 3,5'luk agaroz jelin ultraviyole transilluminatördeki görüntüsü .....   | 71              |
| <b>Şekil 8b.</b> PON 1 Q/R 192 polimorfik bölgesine spesifik primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününün Alw I restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası ethidium bromide ile boyanmış % 3,5'luk agaroz jelin ultraviyole transilluminatördeki görüntüsü.....   | 71              |
| <b>Şekil 9a.</b> PON 1 L/M 55 polimorfik bölgesine spesifik primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününün ethidium bromide ile boyanmış % 3,5'luk agaroz jelin ultraviyole transilluminatördeki görüntüsü.....   | 72              |
| <b>Şekil 9b.</b> PON 1 L/M 55 polimorfik bölgesine spesifik primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününün Hsp92 II restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası ethidium bromide ile boyanmış % 3,5'luk agaroz jelin ultraviyole transilluminatördeki görüntüsü..... | 72              |
| <b>Şekil 10a.</b> Grupların Q/R 192 genotiplerine göre serum PON 1 aktiviteleri.....   | 78              |
| <b>Şekil 10b.</b> Grupların L/M 55 genotiplerine göre serum PON 1 aktiviteleri.....  | 78              |
| <b>Şekil 11a.</b> Grupların Q/R 192 genotiplerine göre eritrosit SOD aktiviteleri.....   | 80              |
| <b>Şekil 11b.</b> Grupların L/M 55 genotiplerine göre eritrosit SOD aktiviteleri.....  | 80              |
| <b>Şekil 12a.</b> Grupların Q/R 192 genotiplerine göre eritrosit Katalaz aktiviteleri.....   | 82              |

|  |    |
|--|----|
| <b>Şekil 12b.</b> Grupların L/M 55 genotiplerine göre eritrosit Katalaz aktiviteleri.....    | 82 |
| <b>Şekil 13a.</b> Grupların Q/R 192 genotiplerine göre eritrosit GSH-Px aktiviteleri...84    | 84 |
| <b>Şekil 13b.</b> Grupların L/M 55 genotiplerine göre eritrosit GSH-Px aktiviteleri....84    | 84 |
| <b>Şekil 14a.</b> Grupların Q/R 192 genotiplerine göre plazma MDA düzeyleri.....86           | 86 |
| <b>Şekil 14b.</b> Grupların L/M 55 genotiplerine göre plazma MDA düzeyleri.....86            | 86 |
| <b>Şekil 15a.</b> Grupların Q/R 192 genotiplerine göre serum HDL-kolesterol düzeyleri.....88 | 88 |
| <b>Şekil 15b.</b> Grupların L/M 55 genotiplerine göre serum HDL-kolesterol düzeyleri.....88  | 88 |
| <b>Şekil 16a.</b> Grupların Q/R 192 genotiplerine göre serum LDL-kolesterol düzeyleri.....90 | 90 |
| <b>Şekil 16b.</b> Grupların L/M 55 genotiplerine göre serum LDL-kolesterol düzeyleri.....90  | 90 |
| <b>Şekil 17a.</b> Grupların Q/R 192 genotiplerine göre serum kolesterol düzeyleri.....92     | 92 |
| <b>Şekil 17b.</b> Grupların L/M 55 genotiplerine göre serum kolesterol düzeyleri.....92      | 92 |
| <b>Şekil 18a.</b> Grupların Q/R 192 genotiplerine göre serum trigliserid düzeyleri.....94    | 94 |
| <b>Şekil 18b.</b> Grupların L/M 55 genotiplerine göre serum trigliserid düzeyleri.....94     | 94 |

## KISALTMALAR

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| ADA                           | : American Diabetes Association (Amerikan Diyabet Derneği)                  |
| AGE                           | : Advanced Glycosylation End Product (İlerlemiş glikosilasyon son ürünleri) |
| ATP                           | : Adenozin trifosfat  |
| BSA                           | : Bovin serum albumin   |
| CAT                           | : Katalaz   |
| DKA                           | : Diyabetik ketoasidoz  |
| DM                            | : Diabetes mellitus   |
| DNA                           | : Deoksiribonükleik asit  |
| dNTP                          | : Deoksi nükleosid trifosfat  |
| EDTA                          | : Etilendaimin tetraasetik asit   |
| ELISA                         | : Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay  |
| GDM                           | : Gestasyonel diabetes mellitus   |
| GR                            | : Glutatyon redüktaz  |
| GSH                           | : Redükte glutatyon   |
| GSH-Px                        | : Glutatyon peroksidaz  |
| GSSG                          | : Okside glutatyon  |
| GST                           | : Glutatyon-S- transferaz   |
| HDL                           | : Yüksek yoğunluklu lipoprotein   |
| HNF                           | : Hepatosit nükleer faktör  |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | : Hidrojen peroksit   |
| IDF                           | : International Diabetes Federation<br>(Uluslararası Diyabet Federasyonu.)  |
| IDL                           | : Orta yoğunluklu lipoprotein   |

|                              |  |
|------------------------------|--|
| IFG                          | : Impaired Fasting Glucose (Bozulmuş açlık glukozu)  |
| IGT                          | : Impaired Glucose Tolerance (Bozulmuş glukoz toleransı)   |
| IUBMB                        | : International Union of Biochemistry and Molecular Biology<br>(Uluslar arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği) |
| KETP                         | : Kolesterol ester transfer protein  |
| LCAT                         | : Lesitin kolesterol açil transferaz   |
| LDL                          | : Düşük yoğunluklu lipoprotein   |
| LPL                          | : Lipoprotein lipaz  |
| MDA                          | : Malondialdehid   |
| MM-LDL                       | : Minimal modifiye LDL   |
| MODY                         | : Maturity-onset diabetes of the young   |
| mRNA                         | : Messenger RNA  |
| NADP <sup>+</sup>            | : Nikotin amid dinükleotid (okside)  |
| NADPH                        | : Nikotin amid dinükleotid (redükte)   |
| NBT                          | : Nitroblue tetrazolium  |
| NKHS                         | : Non-ketotic hyperosmolar state (Hiperozmolar nonketotik koma)  |
| NO                           | : Nitrik oksit   |
| O <sub>2</sub> <sup>·-</sup> | : Süperoksit radikali  |
| <sup>1</sup> O <sub>2</sub>  | : Singlet oksijen  |
| OGTT                         | : Oral glukoz tolerans testi   |
| OH <sup>·</sup>              | : Hidroksil radikali   |
| OP                           | : Organofosfat   |
| PAF-AH                       | : Trombosit aktive edici faktör- asetil hidrolaz   |
| PZR                          | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu  |
| PKC                          | : Protein kinaz C  |

|        |  |
|--------|--|
| PON    | : Paraoksonaz  |
| PTA    | : Fosfotungustik asit  |
| RE     | : Restriksiyon endonükleaz   |
| RFLP   | : Restriction fragment length polymorphism (restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmleri) |
| ROS    | : Reaktif oksijen türevleri  |
| RT-PCR | : Tersine transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu   |
| SOD    | : Süperoksit dismutaz  |
| TBA    | : Tiyobarbitürik asit  |
| TBE    | : Tris-borik asit- EDTA  |
| TNP    | : Tek nükleotid polimorfizmi   |
| VLDL   | : Çok düşük yoğunluklu lipoprotein   |

## 1. ÖZET

Paraoksonaz 1 (PON 1), HDL üzerinde yer alan ve antioksidan özellikleri nedeni ile LDL'leri oksidasyona karşı koruyucu fonksiyonu olan bir enzimdir. Enzimin; PON 1 geninin kodlayan bölgesinde 55. konumdaki lösinin metiyonin ile (L/M 55) ve 192. konumdaki glutaminin arjinin ile (Q/R 192) yer değiştirmesi sonucu oluşan iki polimorfizm mevcuttur. L/M 55 ve Q/R 192; polimorfizmleri PON 1 enziminin paraoksonaz aktivitesi ve antioksidatif fonksiyonunda değişikliklere neden olurlar. Diyabette PON 1 enzim aktivitesinin azalması ile diyabet komplikasyonlarının gelişmesi arasında önemli ilişkilerin olduğu bildirilmektedir.

Çalışmada, 102 sağlıklı birey (57 kadın/45 erkek, kontrol) ve 200 tip 2 diyabet hastasında (115 kadın/85 erkek, DM) PON 1 L/M 55 ve Q/R 192 polimorfizmlerinin dağılımı ve bu polimorfizmlerin PON 1, SOD, CAT, GSH-Px, lipid peroksidasyonu ve lipid profili üzerine etkilerine bakıldı.

PON 1; L/M 55 ve Q/R 192 genotip tayini, PZR, RFLP ve agaroz jel elektroforezi yöntemleri ile yapıldı ve genotip dağılımlarında ve allel sıklıklarında kontrol ile DM grubu arasında önemli bir farklılık görülmedi ( $p>0.05$ ). Serum PON 1 paraoksonaz aktivitesi; DM grubunda kontrol grubuna göre düşük olmakla beraber bu düşüş istatistiksel olarak önemli değildir ( $p>0.05$ ). Her iki grupta en yüksek paraoksonaz aktivitesi LL ve RR genotiplerinde, orta düzeyde aktivite LM ve QR genotiplerinde, en düşük değerler QQ ve MM genotiplerinde görüldü.

DM grubunda kontrol grubuna göre eritrosit CAT aktivitesi ( $p<0.05$ ) ve GSH-Px aktivitesi ( $p<0.01$ ) düşük bulunurken eritrosit SOD aktivitelerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ), Lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA, DM grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0.001$ ).

İki grup arasında HDL-kolesterol düzeylerinde önemli bir fark görülmezken, LDL-kolesterol, kolesterol ve trigliserid düzeyleri; DM grubunda anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p<0.001$ ). Kontrol grubunda R ve M allel varlığı; DM grubunda ise Q ve M allel varlığı daha yüksek aterojenik lipid profiline eşlik etmiştir.

Sonuç olarak, PON 1 L/M 55 ve Q/R 192 polimorfizmlerinin paraoksonaz aktivitesinde önemli değişikliklere neden olduğu bulunmuş fakat bu polimorfizmlerin tip 2 diyabet gelişme riski ve diyabette görülen oksidan-antioksidan sistemindeki değişiklikler üzerine doğrudan bir etkisi bulunmamıştır. PON 1 enziminin tip 2 diyabet üzerine etkisinin daha iyi aydınlatılabilmesi için kodlayan bölgedeki bu polimorfizmlere ek olarak enzimin aktivitesi ve antioksidan fonksiyonunda rolleri olduğu bildirilen promotör bölgesindeki 5 polimorfizmin, ayrıca antioksidan fonksiyona sahip aynı ailenin diğer üyeleri olan PON 2 ve PON 3 enzimlerinin birlikte incelenmesinin de yararlı olacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Paraoksonaz, polimorfizm, tip 2 diabetes mellitus, antioksidan enzimler, lipid profili.

## 2. ABSTRACT

Paraoxonase 1 (PON 1), is a HDL- associated enzyme with antioxidant function protecting LDL from oxidation. PON 1 has two aminoacid polymorphisms in coding region; one Leu-Met at position 55 (L/M55) and the other Glu-Arg at position 192 (Q/R 192). L/M 55 ve Q/R 192 polymorphisms modulates paraoxonase activity and antioxidant function of the enzyme. PON 1 activity decreases in diabetes mellitus and an association between this reduction and development of diabetic complications has been indicated.

In the present study, distribution of PON 1 L/M 55 and Q/R 192 polymorphisms and the effect of these polymorphisms on the activities of PON 1, SOD, CAT, GSH-Px, lipid peroxidation and lipid profile in 102 non-diabetic healthy subjects (57 female/45 male; control group) and 200 patients with type 2 diabetes mellitus (115 female/85 male; DM group) were examined.

PON 1 L/M 55 ve Q/R 192 genotypes were determined by PCR, RFLP and agarose gel electrophoresis techniques. Genotype distributions and allele frequencies for both polymorphisms were not significantly different between controls and DM group ( $p>0.05$ ). Serum PON 1 paraoxonase activity was lower in DM group than in controls but not statistically significant ( $p>0.05$ ). In both groups, the highest paraoxonase activities were detected in LL and RR genotypes, intermediate activities in LM and QR genotypes, and the lowest activities in MM and QQ genotypes.

Activities of erythrocyte GSH-Px and CAT were significantly lower ( $p<0.01$  and  $p<0.05$ , respectively), while decrease in SOD activity was not statistically significant ( $p>0.05$ ), in DM group than in control group. Levels of

MDA, an indicator of lipid peroxidation were significantly higher in DM group ( $p < 0.001$ ).

No significant difference in HDL-cholesterol levels was detected between both groups but LDL-cholesterol, total cholesterol and triglyceride levels were significantly higher in DM group ( $p < 0.001$ ). Presence of R and M alleles in control group and presence of Q and M alleles in DM group accompanied with higher atherogenic lipid profile.

In conclusion, data obtained from the present study indicates that PON 1 L/M 55 vs Q/R 192 polymorphisms cause significant alterations in paraoxonase activity of the enzyme, however it is hard to correlate these polymorphisms and risk for type 2 diabetes mellitus and oxidant-antioxidant alterations observed in diabetes. For a better understanding of the role of PON 1 in type 2 diabetes mellitus, in addition to polymorphisms in coding region, 5 polymorphisms in promoter region which are also related to antioxidant function of the enzyme and PON 2 and PON 3, two other members of PON family, also should be investigated.

**Key Words:** Paraoxonase, polymorphism, type 2 diabetes mellitus, antioxidant enzymes, lipid profile.

## 3.GİRİŞ

### 3.1. PON 1 Geni

#### 3.1.1. PON Gen Ailesi ve PON 1 Yapısı

İnsan genomu şu ana kadar belirlenmiş ve PON 1, PON 2, PON 3 olarak adlandırılan en az 3 adet PON geni içermektedir (Şekil 1a). Her üç gen 7. kromozomun q21 ve q22. bantları üzerinde yerleşmiş olup aminoasit düzeyinde % 65 oranında benzerlik gösterirler (127). PON 1 geni; kodlayan bölgesi 9 ekzondan oluşmakta ve bazı polimorfizmler göstermektedir. Polimorfizmlerin spesifik bir formu tek nükleotid polimorfizmidir (TNP) ve genin kodlayan bölgesinde 2 adet TNP görülür. Lösin/Metiyonin değişimi 55. konumda (L/M 55) ve Glutamin/Arjinin değişimi 192. konumda (Q/R 192) görülmektedir (Şekil 1b). Bu iki polimorfizm restriksiyon endonükleazlar ile kolayca tespit edilebilmekte (74) ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmleri (restriction fragment length polymorphisms- RFLPs) olarak adlandırılmaktadır. Bu ayırımı göre oluşan PON 1' in allelik formları izozim veya allozim olarak adlandırılırlar.

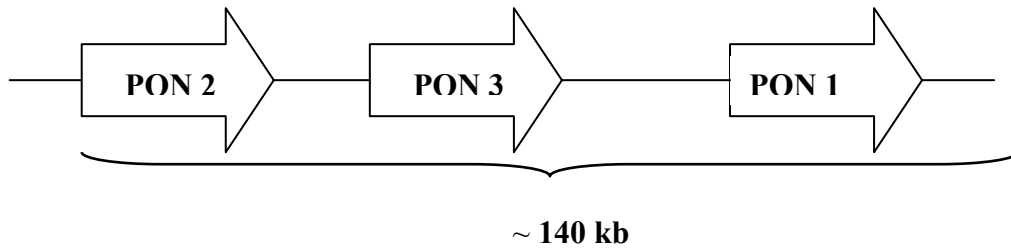
#### 3.1.2. Kodlayan Bölgedeki L/M 55 ve Q/R 192 Polimorfizmleri

##### 3.1.2.1. L/M 55 Polimorfizmi

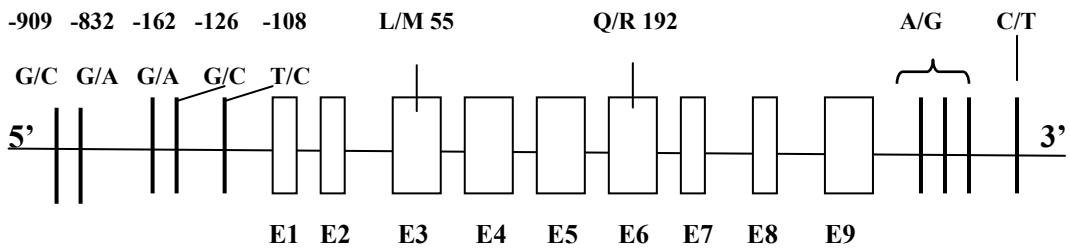
Kodlayan bölgede 55. konumda görülen L/M 55 polimorfizmi PON 1 enzim aktivitesini Q/R 192 polimorfizminden bağımsız olarak etkilemektedir. Substrat olarak paraokson kullanıldığı zaman, L55 taşıyan allozimin M55 taşıyan allozime göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (21). L/M polimorfizmi aynı zamanda karaciğerdeki enzim ekspresyonunu etkilemekte ve bunun sonucunda enzimin serumdaki yoğunluğunu belirlemektedir (21) L55 alleli M55 allele göre daha çok eksprese olmakta ve dolayısıyla L55 alleli taşıyan bireylerin serumlarında PON 1 yoğunluğu daha yüksek olmaktadır. Buna ilave

olarak M55 izoformu L55 izoformuna göre daha az stabil bir yapıdadır (97). PON 1 enzim aktivitesinin değişimi bireyler arasındaki farklılıklardan kaynaklanır. Aynı genotipe sahip bireylerin PON 1 enzim aktivitelerinde 13 kata kadar varan farklılıklar görülebilmektedir. Enzimin yoğunluğunu değiştirmesi nedeni ile L/M 55 polimorfizmi sadece substrata spesifik enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmaz, aynı zamanda fenilasetat gibi polimorfizmden etkilenmeyen bir substrata karşı da enzim aktivitesinin değişmesine neden olur (50).

### 7q21-q22



**Şekil 1a.** PON gen ailesi ve PON 1, PON 2 ve PON 3 genlerinin insan 7. kromozomu q21. ve q22. bantları üzerindeki yerleri.



**Şekil 1b.** PON1 geninin yapısı. Dokuz adet ekzon (E1-E9) kutucuklar ile gösterilmiştir. 5' düzenleyici uçtaki 5 polimorfizm, kodlayan bölgedeki 2 polimorfizm ve 3' translasyona girmeyen uçtaki 4 polimorfizm görülmektedir (48).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada tip 2 diyabetli hastalarda LL genotipi %54.1, LM genotipi % 42 ve MM genotipi % 3.9, tip 2 diyabet olmayan

kontrollerde ise LL genotipi %46.8, LM genotipi % 46.8 ve MM genotipi % 6.4 oranında bulunmuştur (4).

### 3.1.2.2. Q/R 192 Polimorfizmi

PON 1'in paraoksona karşı olan aktivitesinin genetik olarak belirlendiği gösterilmiştir (53). Paraoksonazın 192. konumunda R bulunduran izoziminin Q bulunduran izozimine göre paraoksona karşı daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (127). Yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak düşük aktiviteli QQ allozim taşıma oranının % 40, yüksek aktiviteli RR allozim taşıma oranının %10 ve bu allozimlerin arasında bir aktivite gösteren QR heterozigot allozimi taşıma oranının ise % 50 civarında olduğu görülmüştür (74). Türkiye'de yapılan bir çalışmada tip 2 diyabetli hastalarda QQ genotipi % 48.3, QR genotipi % 41.1 ve RR genotipi % 10.6, kontrollerde ise QQ genotipi % 33.6, QR genotipi % 57 ve RR genotipi % 9.3 oranında bulunmuştur (4).

**Tablo I.** Değişik toplumlarda PON 1 geninin allel dağılımları

| Toplum  | Kaynak | L allel (%) | M allel (%) | Q allel (%) | R allel (%) |
|---------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Türk    | 4      | 73.4        | 26.6        | 66.5        | 33.5        |
| Fin     | 132    | 65          | 35          | 75          | 25          |
| Alman   | 29     | 67          | 33          | 73          | 27          |
| İngiliz | 101    | 43          | 57          | 62          | 38          |
| Çin     | 140    | 04          | 96          | 42          | 58          |

### 3.1.2.3. I/V 102 Polimorfizmi

Prostat kanseri olan hastalarda yapılan bir çalışmada PON 1 102. konumundaki izolösün aminoasidinin valin aminoasidi ile yer değiştirdiği

polimorfizmin kontrollere göre %16 daha fazla görüldüğü ve prostat kanseri aile öyküsü bulunan bireylerde bu polimorfizmin önceden bilinmesinin halinde hastalık riskinin belirlenmesine önemli katkı sağlayacağı belirtilmiştir (108).

#### **3.1.2.4. Promotör Polimorfizmleri**

İnsan PON 1 geni promotör bölgesi ile ilgili yapılan çalışmalarda 5 adet polimorfizmin olduğu bildirilmiştir (48) (Şekil 1b). Bu polimorfizmlerden -108., -162. ve -909. konumundakiler daha sık görülmekte ve gen ekspresyonunu 2 kat kadar değiştirebilecek düzeyde etki göstermektedir (23). -108. konumundaki T/C polimorfizminde C varlığının PON 1 ekspresyonunda ve dolayısıyla enzimin serumdaki yoğunluğunun artışına neden olmaktadır (77). Bu bölgedeki diğer polimorfizmlerin enzim yoğunluğu ve aktivitesindeki rolleri hala tam olarak belirlenmiş değildir.

#### **3.1.2.5. PON 1 Haplotipleri**

PON 1 geni kodlayan bölgesindeki L/M 55 ve Q/R 192 polimorfizmlerinin birbirleri ile 'linkage disequilibrium'da oldukları ve R alel taşıma oranının M alel taşıyanlara göre L alel taşıyıcılarında daha fazla görüldüğü bildirilmiştir. Bu durum bu iki allelin birlikte varlığının paraoksone karşı daha yüksek aktivite göstermesine neden olmaktadır (21,45).

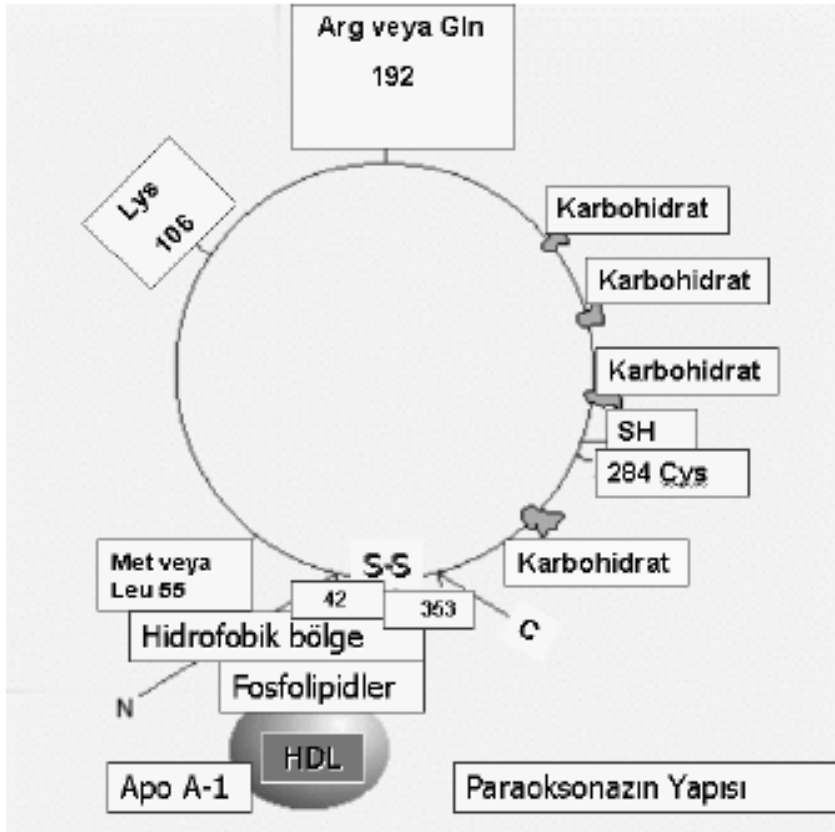
### **3.2. Paraoksonaz-1 (PON 1) Proteini**

#### **3.2.1. Sentez ve Yapısı**

Paraoksonazlar kuşlar, balıklar ve böcekler dışında (104). birçok hayvan türünde bulunmaktadır (95, 104, 115). İnsanlarda serum paraoksonaz aktiviteleri yenidoğan ve prematürlerde erişkin düzeylerinin yarısı kadar görülür ve doğumdan yaklaşık bir yıl sonra normal düzeylere ulaşır (113). İnsanlarda PON1 başta karaciğer olmak üzere, kalp, böbrek, beyin, ince bağırsak ve akciğer,

plasenta ve pankreastan salgılanmaktadır (127). İnsan ve tavşan paraoksonaz dizinlerinin karşılaştırılmasında her iki türün enzimlerinin gerek amino asit gerekse nükleik asit dizinlerinin % 85 benzerlik gösterdiği bulunmuş bu da enzimin önemli bir metabolik rolünün olduğu kanısı uyandırmaktadır. Bununla birlikte çeşitli insan ve tavşan dokularında yapılan Northern Blot analizlerinde saptanabilir PON1 mRNA'sı yalnızca karaciğerde bulunmuştur. Ancak, tersine transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile yapılan analizlerde farelerin karaciğer, akciğer, böbrek, kalp, beyin, ince bağırsaklarında PON1 mRNA'sının varlığı gösterilmiştir (127). PON1 proteininin sentezindeki önemli bir özellik, protein salındıktan sonra yalnızca ilk metiyonin aminoasidi ayrılmakta ve sinyal dizini proteinin üzerinde kalmaktadır (49). Proteinin amino ucunda bulunan bu hidrofobik kısmın HDL ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

İnsan serum PON1 proteini; saflaştırılmış olup yaklaşık 44 kDa moleküler ağırlığında, 355 amino asitten oluşan bir glikoproteindir (55, 131). Bazı yayınlarda PON 1 proteininin metiyonin amino asiti sayılmayarak 354 amino asitten oluştuğu belirtilmektedir(49). Protein ağırlığının %15.8'ini oluşturan karbonhidrat üniteleri proteine 4 farklı noktadan bağlı olarak bulunurlar. İnsan PON1 proteini üç adet sistein içerir ve protein, bu üç sistein molekülünden ikisinin aralarında yaptıkları disülfid bağlarına göre iki oksidasyon durumunda bulunabilir. Protein yapısında bulunan 42. ve 353. sistein amino asitlerinin oluşturduğu tek disülfid bağı, polipeptid zincirinin halka yapıda olmasına neden olmaktadır. İki yüz seksen dördüncü konumdaki serbest sistein amino asidinin aktif merkez için rol aldığı düşünülmektedir (149).



Şekil 2. İnsan paraoksonaz enziminin (PON 1) yapısı (15).

### 3.2.2. Paraoksonazın Enzim Sınıflandırılmasındaki Yeri

Enzimler IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Uluslar arası Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Birliği) kriterlerine göre 6 grupta sınıflandırılır:

**EC. 1. Oksidoredüktazlar:** Oksidasyon-redüksiyon (yükseltgenme-indirgenme) reaksiyonlarını katalize eden enzimler

**EC. 2. Transferazlar:** Fonksiyonel bir grubun transfer reaksiyonunu katalize eden enzimler

**EC. 3. Hidrolazlar:** Çeşitli bağların hidrolizini yani hidrolitik reaksiyonları katalize eden enzimler

**EC. 4. Liyazlar:** Bu enzimler C-C, C-O ve C-N arasındaki bağların hidrolizden ve oksidasyondan farklı bir yolla kırarlar veya bu atomlar arasına bir çift bağ ilave eden enzimler

**EC. 5. İzomerazlar:** Bir molekül içindeki geometrik ve yapısal değişiklikleri yani izomerizasyon reaksiyonlarını katalize eden enzimler

**EC.6. Ligazlar (Sentetazlar):** C-O, C-S, C-N ve C-C arasında bir bağ oluşmasını sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler genellikle ATP'deki yahut diğer trifosfatlardaki pirofosfatı hidrolize ederek iki molekülün birbirine bağlanmasını katalize eden enzimler

Hidrolazlar şu şekilde sınıflandırılırlar:

EC. 3.1. Ester bağlarına etkili hidrolazlar

EC. 3.2. Glikozillenmiş bileşiklere etkili hidrolazlar

EC. 3.2. Eter bağlarına etkili hidrolazlar

EC. 3.4. Peptid bağlarına etkili hidrolazlar

EC. 3.5. C-N bağlarına etkili hidrolazlar

EC. 3.7. C-C bağlarına etkili hidrolazlar

EC. 3.8. Halidik bağlara etkili hidrolazlar

EC. 3. 9. P-N bağlarına etkili hidrolazlar

Esterazlar şu şekilde sınıflandırılırlar:

**EC. 3. 1. Esterazlar:**

EC. 3.1.1. Karboksilik ester hidrolazlar

EC. 3. 1.2. Tiyol esteri hidrolazları

EC. 3. 1.3. Fosforik monoester hidrolazlar

EC. 3.1.4.Fosforik diester hidrolazlar

EC. 3.1.5.Trifosforik monoester hidrolazlar

EC. 3.1.6. Sülfürik monoester hidrolazlar

EC. 3.1.7. Difosforik monoester hidrolazlar

EC. 3. 1. 8.Fosforik triester hidrolazlar (fosfotriesterazlar)

EC. 3.1.8.1. Arildialkilfosfataz (paraoksonaz)

EC. 3.1.8.2. Diizopropilflorofosfataz

Esterazlar oldukça geniş bir enzim sınıfı olup alifatik ve aromatik ester bağlarının yanında peptidleri, amidleri ve halidleri hidrolize ederler. Esterazlar substratlarına göre 3 sınıfta incelenirler: A-esterazlar (arilesterazlar, paraoksonaz) organofosfatları (OP), B-esterazlar (karboksilesterazlar) alifatik esterleri, C-esterazlar (asetilesterazlar) asetat esterlerini hidrolize ederler (161).

İnsektisitleri de (organofosfatlar, karbamat ) içine alan birçok sentetik bileşik A-ester yapısındadır. Böceklerde A-esteraz bulunmadığı için bu kimyasallar bu canlılara karşı pestisid olarak kullanılırlar. Memelilerde de bu organofosfatların detoksifikasyonunun en önemli yolu serum ve karaciğer A-esterazlar tarafından düşük toksisiteli metabolitlerine hidrolizidir (164). Bu durum OP zehirlenmesine maruz bırakılan hayvanlara PON 1 enjeksiyonu ile gösterilmiştir (99).

### **3.2.3. PON 1' in Kimyasal Özellikleri ve Aktif Merkezi**

Paraoksonaz ismi bir insektisid olan paratyonun metaboliti olan paraoksonu hidrolize etme kapasitesinden gelmektedir. PON 1 bir kalsiyum bağımlı esteraz olup 355 aminoasitten oluşan glikoproteinin yüksek oranda lösin içermesinden başka göze çarpan bir özelliği bulunmaz ve izoelektrik noktası 5.1'dir (51). Enzimin iki yapısal izoformunun bulunduğu düşünülmektedir ve bu izoformlarda paraoksonazın iki oksidasyon bölgesi bulunmaktadır. Bir izoformda bütün sisteinler serbest iken diğesinde tek disülfid bağı bulunmaktadır. Disülfid bağının olduğu izoformda 284. konumdaki sisteinin serbest bulunması bu amino asidin enzimin aktif merkezinde rol aldığı kanısını uyandırmaktadır (149). Bu

yapısal izoformlar genetik izoformları belirleyen nokta mutasyonlarla açıklanamamaktadır.

PON 1; OP 'lara ilave olarak fenilasetat gibi aromatik esterleri (Şekil 3b) sarin, tabun, soman gibi sinir sistemini etkileyen savaş gazlarını (Şekil 3c) ve laktonları da hidroliz etmektedir (Şekil 3d) (39).

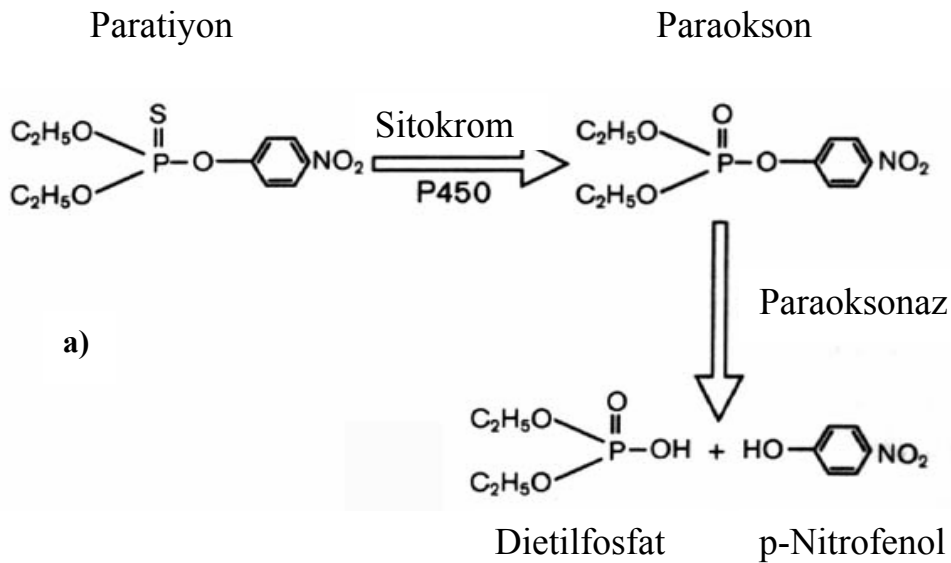
Saflaştırılmış insan PON 1 enziminin paraoksonu hidrolizi çalışmalarında PON 1'in paraoksona bağlanmasından sonra önce p-nitrofenol ve dietilfosfat ayrılmaktadır.  $Ca^{++}$  iyonlarının bu mekanizmada iki önemli fonksiyonu bulunmaktadır. Birincisi  $Ca^{++}$  iyonları aktif bölgenin korunması için gereklidir. Bu şekilde hem katalitik reaksiyonda rol alır hemde aktif bölgenin uygun konformasyonda kalmasını sağlar. İkinci olarak da  $Ca^{++}$  iyonları aktif bölgeden dietil fosfatın ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu etkiyi paraoksonun yapısındaki P=O çift bağı polarize ederek fosforu nükleofilik etkiye duyarlı hale getirmesi şeklinde gerçekleştirdiği düşünülmektedir (160). Paraoksonazın etkisinin  $Ca^{++}$  iyonlarına bağımlı olması bu enzimi  $Co^{++}$ ,  $Mn^{++}$  ve  $Mg^{++}$  a gerek duyan diğer A grubu esterazlardan ayıran önemli bir özelliktir. Bu özelliğinden dolayı enzim aktivitesinin ölçülmesinde serum veya kullanılacaksa EDTA içermeyen plazma kullanılmalıdır (96). Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesini gösteren insan PON 1 enzimi aynı genin ürünüdür ve bu aktivitelerinin yarışmalı olması aynı aktif merkezin özelliklerinin paylaşıldığını göstermektedir (12).

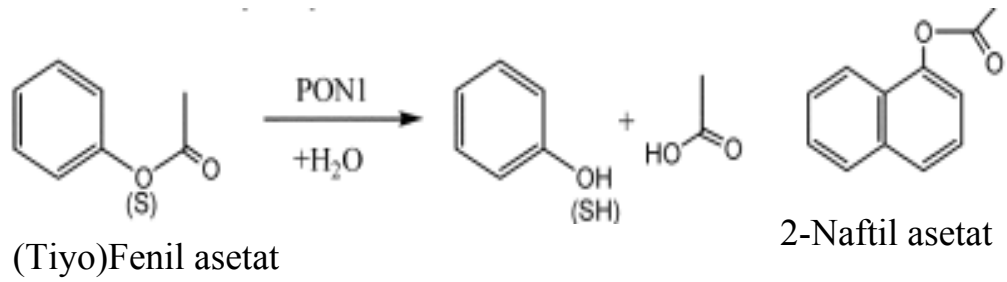
Yukarıda bahsedilen paraoksonazın bu etkilerinin yanında paraoksonazın *in vivo* şartlarda başka diğer substratları olabileceği de belirtilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar PON 1 enziminin aslında bir laktonaz olduğunu göstermektedir. Paraoksonazların fizyolojik substratı tam olarak henüz tanımlanamamış olmakla beraber son zamanlarda yapılan araştırmalar gıdalarla

alınan laktonların veya 5-hidroksiekasotetraenoik asid lakton gibi yağ asidi peroksidasyon ürünlerinin olabileceğini göstermiştir (89) (Şekil 3d).

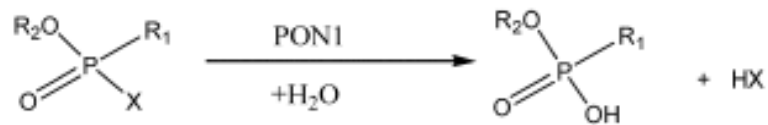
Bir enzimin aktif merkezi, enzimin substrata bağlanmasını sağlayan özel bölgedir. Enzimin aktif merkezini oluşturan amino asitler proteinin primer yapısında birbirine uzak konumda olmalarına rağmen tersiyer yapıda aktif merkezi oluşturmak için birbirlerine yakın konumlarda yer alırlar(89).

PON 1 enziminin kristal yapısının incelenmesinde ve nokta mutasyonlar ile yapılan çalışmalarda iki  $Ca^{++}$  molekülü ile birlikte bir çok amino asidin katalitik aktif merkezde rol alabileceğini göstermektedir. Bu  $Ca^{++}$  moleküllerinden birisinin enzimin yapısal diğerinin ise katalitik etki gösterdiği bildirilmiştir. Amino asitlerden ise His<sup>115</sup>, His<sup>134</sup>, His<sup>285</sup>, ve His<sup>184</sup>, Asp<sup>183</sup>, Asp<sup>269</sup> ve Glu<sup>53</sup>,ün bu merkezde rol alabileceği düşünülmektedir. Asp<sup>269</sup> ve Glu<sup>53</sup> amino asitlerinin katalitik  $Ca^{++}$  molekülünün bağlanmasında görev aldıkları tahmin edilmektedir. Yukarıda bahsedilen amino asitlerin yerlerine başka amino asitler kullanılarak yapılan nokta mutasyon analizlerinde enzimin katalitik etkisi için en önemli amino asitlerin His<sup>115</sup> ve His<sup>134</sup> olduğu bildirilmiştir (89).





b)

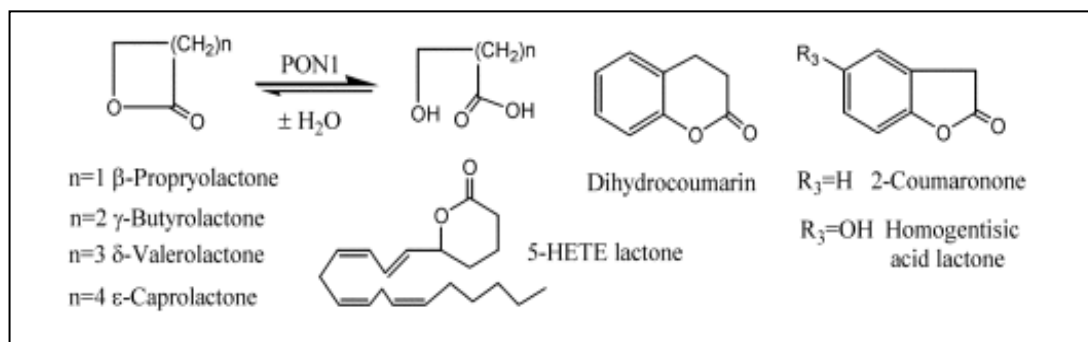


$R_1=N(CH_3)_2$   $R_2=CH_2CH_3$   $X=CN$  Etil N-dimetilfosforoamidosiyanid (Tabun)

$R_1=CH_3$   $R_2=CH(CH_3)_2$   $X=F$  İzopropil metilfosfonofloridat (Sarin)

$R_1=CH_3$   $R_2=CH(CH_3)C(CH_3)_3$   $X=F$  Pinakolil metilfosfonofloridat (Soman)

c)



d)

**Şekil 3.** PON1 substratları ve değişik enzim aktiviteleri. a) paraoksonazın hidrolizi (113), b) aromatik esterlerin (fenilasetat) hidrolizi, c) sinir gazlarının hidrolizi, d) lakton hidrolizi ve hidroksi asitlerin laktonizasyonu (39).

### 3.2.4. PON 1 Enzim Aktivitesi ve Ölçümü

PON 1; hem organofosfatları hemde aromatik esterleri hidrolize etmesi dolayısı ile paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerine sahiptir (107). Paraoksonaz aktivitesi; bir insektisid olan paratyonun metaboliti olan paraoksonu toksik olmayan p-nitrofenol ve dietil fosfata hidrolize etmesinden yararlanılarak ölçülür. Paraoksonaz aktivitesi önce ortama NaCl katılmaksızın ve 1 M NaCl varlığında ölçülür. Paraoksonazın; NaCl ile değişen aktivitesi bireylerin NaCl-stimüle edilmiş QQ veya NaCl-stimüle edilmemiş QR ve RR tiplerinin sınıflandırılmasında kullanılır (42). Bu ölçüm ile QR ve RR fenotipleri birbirinden ayrılamazlar. Paraoksonaz aktivite ölçümü için uygun olan pH değeri 7.5 civarındadır.

PON1 enziminin arilesteraz aktivitesinin ölçümünde kullanılan substrat genellikle fenilasetattır (Şekil 3b).

Bu iki ayrı aktivite özelliğinden dolayı substrat olarak paraokson kullanıldığı zaman bulunan aktivite enzimin ‘paraoksonaz aktivitesi’, substrat olarak fenilasetat kullanıldığı zaman bulunan aktivite ise enzimin ‘arilesteraz aktivitesi’ olarak tanımlanır.

İnsan PON1 enziminin paraokson ve fenilasetat hidrolizine ilave olarak laktonaz, düşük de olsa peroksidaz ve fosfolipaz A2’ ye benzer etkiler gösterdiği bulunmuştur (116). PON1’in antiaterojenik etkilerinin biyolojik olarak aktiflenmiş fosfolipidlerin hidrolizinden ve lipid hidroperoksidlerinin yıkılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (116). PON 1’in aktif merkezinin ve katalitik etkisinin fosfolipaz A2 ile benzerlik göstermesi bu görüşü desteklemektedir (67).

### 3.2.5. PON 1 Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Bireylerin PON 1 enzim aktiviteleri arasında 10 ile 40 kat arasında değişen oranlarda farklılık görülür (74). PON1 enzim aktivitesinin, aynı genotipe sahip bireylerde 13 kat farklılık gösterdiği bulunmuştur (50). Kodlayan bölgedeki polimorfizmlerin PON 1 aktivitesini doğrudan etkilediği bilinmekte olup RR 192 ve LL 55 genotipine sahip bireylerde aktivite yüksek, QQ 192 ve MM 55 genotipine sahip olanlarda düşük ve heterozigot QR ve LM genotipine sahip bireylerde ise aktivite orta düzeydedir (100). Genetik faktörlere ek olarak birçok çevresel faktörün de PON 1 ekspresyonu ve aktivitesindeki bu farklılığa katkıda buldukları bilinmektedir (116). Karaciğer hücre soylarından HepG2 üzerinde yapılan bir çalışmada okside LDL, okside lipid, IL-β, tümör nekrosis faktör alfanın inkubasyonlarda PON 1 geninin ekspresyonunda azalmaya, simvastatinin ise ekspresyonda artışa neden olduğu gösterilmiştir (36,93). İnsanlarda; sigara içiminin PON 1 aktivitesini azalttığı, vitamin C ve E ile düşük miktarlarda alkol tüketiminin ise PON 1 aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir (144, 82). Sterol düzenleyici element-bağlayıcı protein 2 (SREBP-2)'nin insan PON 1 geninin promotör bölgesine bağlandığı ve promotör aktivitesini arttırdığı bildirilmiştir. Statinlerin antiaterojenik etkilerinden birisinin SREBP-2 artışına bağlı olarak PON 1 aktivitesini arttırdığı şeklinde düşünülmektedir (36).

PON 1 aktivitesinin HDL- kolesterol ve apolipoprotein A-I yoğunluğuna bağlı olup olmadığına dair pek çok çalışma mevcuttur. HDL eksikliği görülen Tangier hastalığı ve balık göz hastalığında (Fish eye disease) PON 1 aktivitesi önemli oranlarda düşerken diğer HDL eksikliklerinde ciddi bir düşüş görülmemektedir (80,106).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada körfez savaşından dönen askerlerde PON 1 aktivitesinin genotipe bağlı olmaksızın azaldığı bildirilmiş ve bunun uzun süre kimyasallara maruz kalma sonucu oluşabileceği düşünülmüştür (65).

### 3.2.6. Protein Yoğunluğunun Hesaplanması

Serum PON 1 protein düzeyi monoklonal antikorlar kullanılarak yapılan yarışmalı ELİZA (20) veya sandviç ELİZA teknikleri (92) ile ölçülebilir.

### 3.2.7. PON 1'in Antioksidan Özellikleri

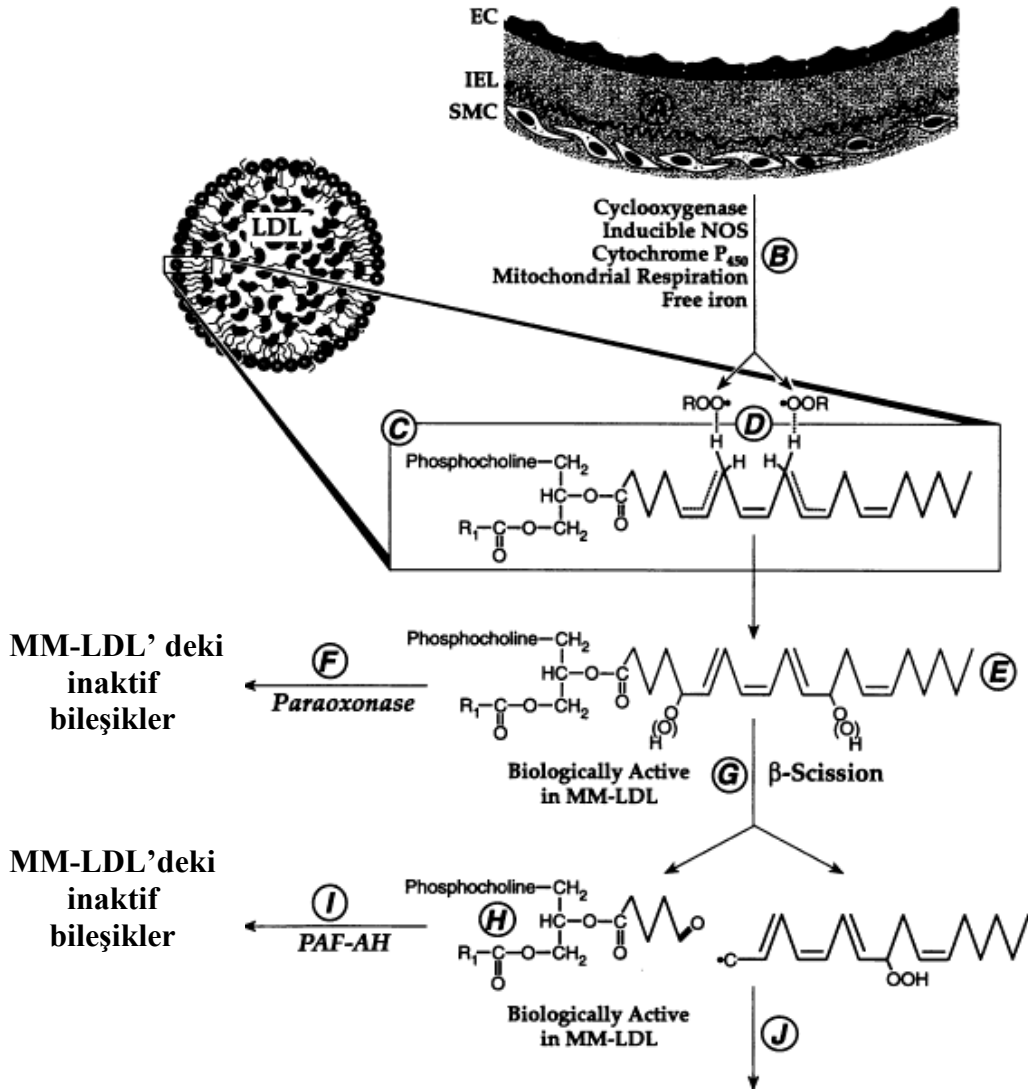
Plazma lipoproteinlerinin yapısında bulunan fosfolipidlerin oksidasyonu sonucu enzimatik hidroliz ile inaktive olabilen hidroperoksidler, izoprostanlar ve aldehidler gibi birçok ürün oluşur (162). Lipid oksidasyonundaki artışın oksidatif stresin artması veya endojen antioksidanların eksilmesinden kaynaklandığına inanılmaktadır. HDL'nin yapısında bulunan proteinlerin ayrıştırılıp saflaştırılması yolu ile insan PON 1 enziminin HDL'nin apolipoprotein A-I (apoA-I) ve apoJ, clusterin) fraksiyonları ile birlikte bulunduğu bildirilmiştir (18). *İn vitro* koşullarda saflaştırılmış PON 1 ve HDL bağlı PON 1'in ikisinin de LDL oksidasyonunu inhibe etmesi bu enzimin *in vivo* şartlarda LDL oksidasyonuna karşı etkin bir antioksidan olduğunu düşündürmektedir. PON 1' in LDL'yi Cu<sup>++</sup> iyonunun veya hücrel serbest radikallerin sebep olduğu oksidasyondan koruduğu bildirilmiştir (103). Ayrıca PON 1, LDL-fosfolipidlerin Sn-2 konumundaki okside olmuş araşidonik asit türevlerini metabolize edebilme yeteneğine sahiptir. Yine PON 1'in HDL ilişkili trombosit aktive edici faktör asetil hidrolaz (PAF-AH) ile birlikte çalışarak lipid peroksidlerini hidroliz ettiği ve bu işlemde PAF-AH'ın ikincil savunma elemanı olarak görev alarak PON 1'in etkisinden kurtulmuş olan peroksidleri hidrolize ettiği varsayılmaktadır (Şekil 4)

(162). Bu enzimlerin her ikisi birden veya muhtemelen PON 1 tek başına HDL'nin antioksidan rolünün devamından sorumludur. Zira transgenik farelerle yapılan çalışmalarda PON 1 geninden yoksun fakat normal PAF-AH geni taşıyan farelerin LDL oksidasyonunda etkisiz kaldığı gösterilmiştir (30). PON1'in antioksidatif etkisinin hangi mekanizma ile oluştuğu net olmamakla beraber bazı hipotezler ileri sürülmektedir. Proteinin 284. konumundaki serbest sistein amino asitinin PON 1'in antioksidan kapasitesinde önemli bir rolü olduğunu iddia eden çalışmalar mevcuttur. Aviram ve arkadaşları (12) PON 1' in bu amino asitinden yoksun gen ile transfeksiyona tabi tuttıkları hücrelerin süpernatantlarının LDL oksidasyonunu engelleyemediklerini buna karşın normal PON 1 ile transfekte ettikleri hücrelerin süpernatantlarının LDL oksidasyonunu engellediğini göstererek bu iddiayı güçlendirici veriler sağlamışlardır. Genelde serbest sistein içeren proteinlerin sülfhidril gruplarının metal şelatörleri ve serbest radikal yok edici olarak görev yapmaları bu hipotezi daha da güçlendirmektedir. Buna karşın PON 1 proteinin kristal yapısının incelenmesi bu sisteinin içe doğru gömülü olduğu ve böyle bir görevi yapamayacağı şeklinde karşı görüşler de mevcuttur. Harel ve arkadaşları (67) 284. sisteinden yoksun mutant PON 1 proteinlerinin ekspresyonunun düşük olması ve stabil olmamasından yola çıkarak bu sistein molekülünün proteinin yapısal korunmasında ve stabilizasyonundan sorumlu olabileceğini ileri sürmüştür. Rosenblat ve arkadaşları (134) PON 1 enziminin LDL, HDL, makrofaj ve aterosklerotik lezyonlardaki okside lipidleri modüle etmek suretiyle antioksidan etki gösterdiğini ileri sürmüşlerdir. Makrofajlarda kolesterol birikimi ve köpük hücre oluşumu aterojez için iki ön şarttır ve PON 1'in çeşitli mekanizmalar ile makrofajlarda kolesterol birikimini engellediği gösterilmiştir (13). Bu mekanizmalar arasında okside LDL'lerin hücreye alınımının

engellenmesi, makrofajların kolesterol biyosentezinin inhibisyonu ve makrofajlardan kolesterol atılımının artışı sayılabilir (136). Rosenblat ve arkadaşları (134) bu PON 1'in antioksidan etkilerinin enzimin lipolaktonaz aktivitesinden kaynaklandığını ve nokta mutasyon analizleri ile bu etkilerin oluşmasında enzimin yapısında bulunan iki histidin aminoasidinin (H<sup>115</sup> ve H<sup>134</sup>) anahtar rol oynadığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar bu iki amino asidin yerine mutant olarak oluşturdukları proteinde glutamin yerleştirildiğinde enzimin yapısında ve HDL 'ye bağlanmasında değişme olmamasına rağmen enzimin LDL oksidasyonunu önleme yeteneğinin kaybolduğunu bildirmişlerdir.

### **3.3. PON 2**

PON 2 bir hücre içi proteini olup yaklaşık olarak 44 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Fizyolojik veya patofizyolojik rolü tam olarak bilinmemekle beraber PON 1 gibi PON 2'de de bazı polimorfizmler gözlenmektedir. PON 2'nin A/G 148 polimorfizmini; kolesterol, LDL-kolesterol, açlık kan şekeri ve doğum ağırlığı ile ilişkilendiren çalışmalar mevcuttur (116). PON 1 C/S 311 polimorfizmi ise damar hastalıkları, menapoz sonrası dönemlerde düşük kemik yoğunluğu ile ilişkili bulunmuştur (116). Yüksek miktarlarda PON 2 sentezleyen hücrelerde yapılan çalışmalarda okside fosfolipid ve hidrojen peroksida maruz bırakılan hücrelerin oksidatif streslerinin düşük olduğu bildirilmiştir (117). Bu bulgular PON 2 nin hücreleri oksidatif stresten koruyan bir antioksidan olabileceğini düşündürmektedir. PON 2 ekspresyonunun düzenlenmesi PON 1'in aksine oksidatif strese cevaben oluşur. Fare periton makrofajlarının değişik oksidatif stres indükleyici ajanlarla muamelesi PON 2 mRNA sentezinde artışa neden olmuştur (133). İnsanlarda hiperkolesterolemik olan bireylerde PON 2 nin normallere göre daha düşük eksprese olduğu bildirilmiştir (135).



**MM-LDL 'deki biyolojik aktif bileşiklerle daha ileri düzeyde oksidasyon ve fazlaca okside LDL bileşiklerinin oluşması**

**Şekil 4.** HDL-bağlı PON 1 ve PAF-AH enzimlerinin minimal modifiye edilmiş LDL (MM-LDL)'deki aktif lipidleri yıkmalarına ilişkin hipotez. A-Reaktif oksijen türleri(ROS) arter duvarında şekillenebilirler. B- Değişik birçok mekanizma sonucu (siklooksijenazlar, sitokrom P<sub>450</sub>, mitokondriyal solunum, serbest demir) yine ROS'lar oluşabilmektedir. C- Oluşan bu ROS'lar LDL'de bulunan fosfolipidleri okside ederler. D- Bu etkiyi fosfolipidlerdeki H atomlarının çıkarılması ile gösterirler. E- Birçok noktaya moleküler oksijenin ilave edilmesi ile multi-oksijenlenmiş fosfolipidleri üretir. F- Bu şekilde oksijenlenmiş fosfolipidler PON 1 için substrat görevi görür ve inaktif hale getirilirler. G-PON 1 yoğunluğu düşük olduğu veya lipid peroksid miktarı fazla olduğu durumlarda okside fosfolipidler oksidatif parçalanmaya giderler. H- Oluşan bu moleküller MM-LDL tarafından endotel hücrelerinde uyarılan yangısal cevabı oluşturabilirler. I- Bu moleküller ikincil savunma hattı olan PAF-AH için substrat oluştururlar ve etkisizleştirilirler. J- LDL yapısında bulunan lipidlerin daha ileri düzeyde oksidasyonu ilerlemiş aterosklerotik lezyonlarda görülen yüksek düzeyde oksitlenmiş LDL birikimine neden olur. Kısaltmalar. EC: endotel hücresi, IEL; İç elastik lamina, NOS:nitrik oksid sintaz, SMC:Düz kas hücresi, •OOR:lipoperoksidler (162).

### **3.4. PON 3**

PON 3; HDL ile ilişkili yaklaşık 40 kDa molekül ağırlığında bir protein olup PON 1'e göre çok düşük miktarlarda bulunmaktadır (129). Üç PON üyesinden PON 3 en son tanımlananı olup üzerinde en az çalışılmıştır. PON 3 proteininde İtalya'da yapılan bir çalışmada gösterilen S/T311 ve G/D324 polimorfizmleri dışında bir polimorfizm bildirilmemiş olup bu polimorfizmlerin de proteinin fonksiyonunda herhangi bir rol alıp almadıkları henüz bilinmemektedir (116). PON 1 ve PON 2 gibi PON 3 de antioksidan etkiler göstermektedir. Tavşan serumundan saflaştırılan PON 3 'ün Cu ile indüklenmiş LDL oksidasyonunu inhibe ettiği ve protein yoğunluğu göz önünde bulundurulduğunda LDL oksidasyonunu inhibe etme kapasitesinde tavşan PON 3' ünün PON 1'den 100 kat daha fazla etkili olduğu bildirilmiştir (40). PON 1 ve PON 2'nin aksine PON 3 ekspresyonu oksidatif stresten etkilenmemektedir (129).

### **3.5. PON 1-Lipoprotein İlişkisi**

#### **3.5.1. Plazma Lipoproteinleri**

Lipidler tanım olarak suda çözünmeyen yapılar olması dolayısı ile kanda taşınmaları kendi başlarına mümkün değildir. Lipoproteinlerin genel işlevi, suda çözünmeyen lipidlerin lipid ve protein kompleksi şeklinde kanda taşınmalarını sağlamaktır. Lipidler; trigliserid, kolesterol esterleri, serbest kolesterol ve fosfolipidleri içerir. Lipoproteinin apolipoprotein denilen protein kısımları yaklaşık on farklı proteinden oluşur ve harflerle "A", "B", "C" vb. adlandırılırlar. Lipoproteinler ayrıca yağda eriyen vitaminler (A,D,E), ilaçlar (probukol, siklosporin vb.), bazı virüsler ve bazı antioksidan enzimler (paraoksonaz, trombosit kökenli aktive edici faktör hidrolaz-PAF-AH) gibi birçok maddeyi taşırlar (38).

### 3.5.1.1. Lipoproteinlerin Yapısı

Lipoproteinler, genellikle çekirdeği çoğunlukla hidrofobik lipidler, (trigliserid ve kolesterol esterleri) içeren protein yüzey tabakası, serbest kolesterol ve fosfolipidler (daha hidrofilik yapıtaşları) taşıyan küresel parçacıklardır. Altı önemli lipoprotein sınıfı lipid taşınmasında farklı roller oynarlar. Yüzeydeki özgün apolipoproteinler farklı lipoproteinlerin kaderini belirler. Bu nedenle, lipoprotein metabolizması ve lipid anormallikleri ile ilgili hastalıkların anlaşılması için, lipid metabolizmasını düzenleyen her bir apolipoproteininin rolünün bilinmesi gerekir (38).

#### 3.5.1.2. Lipoproteinlerin Yapısında Bulunan Başlıca Apolipoproteinler ve Fonksiyonları

Apolipoproteinler lipid bağlayıcı proteinler olup diyetle alınan lipidlerin kan dolaşımı aracılığı ile karaciğere ve karaciğerden endojen olarak sentezlenen lipidlerin depolandığı (adiposit), metabolize olduğu (kas, kalp, akciğer) ve sekrete olduğu (meme) dokulara taşınmasında görev alırlar. Başlıca 5 sınıfa (A,B,C,D,E) ayrılırlar ve her sınıf da yine değişik sayıda altsınıflara ayrılır.

Başlıca apolipoproteinler ve belli başlı fonksiyonları:

apoA-I: HDL için yapısal protein olup LCAT aktivatörüdür.

apoA-II: HDL için yapısal protein olup hepatik lipaz aktivatörüdür.

apoA-III: Lipoprotein lipaz ve LCAT aktivatörü olarak görev yapar.

apoB-48: Şilomikronların toplanması ve salınması için gereklidir.

apoB-100: VLDL, IDL, LDL ve Lp(a) için yapısal protein olup LDL reseptörü ligandı olarak görev yapar.

apoC-I: LCAT aktivatörü olarak görev yapar.

apoC-II: Lipoprotein lipaz için esansiyel kofaktör olarak görev yapar.

apoC-III: Lipoprotein lipaz ve hepatik lipaz aracılığı ile trigliserit hidrolizini önler.

apoD: Kolesterol ester transfer protein (KETP) için kofaktör olabileceği düşünülmektedir.

apoE: Hepatik şilomikron ve kalıntı VLDL kalıntı reseptör için ligand olup bu lipoproteinlerin dolaşımdan temizlenmesini sağlar. LDL reseptörü için ligand olarak görev yapar.

### *3.5.1.3. Plazma Lipoproteinlerinin Yapı İşlev ve Metabolizması*

#### ***Şilomikronlar***

Plazma lipoproteinlerinin en büyükleri olup % 98-99 oranında lipid ve %1-2 oranında içerir. Trigliseridlerle beraber hem fosfolipidler hem de kolesterol büyük şilomikron partiküllerinin yapımında kullanılırlar. Şilomikronlar başlangıçta apoB-48 ve apoA içerir. Daha sonra dolaşım sürecinde HDL ile etkileşme sonucunda apoE ve lipoprotein lipazı aktive eden apoC-II apolipoproteinleri şilomikronlara katılır.

Şilomikronlar, aktive olan lipoprotein lipaz (LPL) etkisiyle trigliserid içeriğinin çoğunu kaybederler ve daha küçük çaplı 'şilomikron kalıntıları'na dönüşürler. Karaciğer hücrelerindeki ApoE reseptörleri şilomikron kalıntılarını tanır. Bu reseptörlerin etkisiyle şilomikron kalıntıları endositoz yoluyla karaciğer hücresi içine alınırlar ve orada yıkılırlar. Karaciğerde şilomikron kalıntılarında VLDL'ler oluşur ve bunlar da dolaşıma verilirler (38).

#### ***Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL)***

Yüzde 85-90 arasında lipid ve % 10-15 protein içerir. VLDL'ler, endojen trigliseridlere ek olarak serbest kolesterol, kolesterol esterleri, fosfolipid, apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoE apolipoproteinlerini de içerirler.

ApoC-II, lipoprotein lipazı aktive ederek VLDL trigliseridlerinden serbest yağ asitlerinin salınmasına neden olur ve lipid içeriği gittikçe azalan VLDL'ler, yaklaşık olarak eşit miktarlarda trigliserid ve kolesterol içeren ara dansiteli lipoprotein (IDL) ve daha sonra düşük dansiteli lipoprotein (LDL) haline değiştirilirler (38).

### ***Orta Yoğunluklu Lipoproteinler (IDL)***

Normal olarak plazmada çok düşük konsantrasyonlarda bulunur ve büyüklük ve içerik açısından VLDL ve LDL arasında yer alır. Başlıca apolipoproteinleri apoB100 ve apoE'dir. VLDL'nin katabolizma ürünü, LDL'nin öncülüdür (38).

### ***Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL)***

LDL, plazmada başlıca kolesterol taşıyıcı lipoproteindir; total plazma kolesterolünün yaklaşık % 70'i LDL'dedir. LDL yaklaşık % 75 lipid ve % 25 proteinden oluşur. LDL'ler, trigliserid içerikleri çok az, kolesterol ve kolesterol esterlerinden çok zengin lipoproteinler olup temel apolipoproteinleri apoB-100'dür. LDL'ler, kolesterolü karaciğerden başka dokulara taşırlar. Ekstrahepatik doku hücrelerinde bulunan spesifik yüzey reseptörleri, apoB-100'ü tanıyarak LDL'lerin hücre içine alınmalarını sağlarlar. Ekstrahepatik doku hücrelerinde LDL'ler yıkılarak kolesterol ve türevlerine dönüşürler. LDL'lerin yıkılmasıyla meydana gelen kolesterol ve kolesterol türevleri çeşitli metabolik etkiler gösterir. Kanda aşırı miktarda LDL bulunması durumunda LDL'ler, süperoksit ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi etkenler vasıtasıyla oksitlenir. Oksitlenmiş LDL'ler retikuloendotelial sistem makrofajları tarafından reseptör aracısız olarak yutulur ve köpük hücre oluşumu meydana gelir (38).

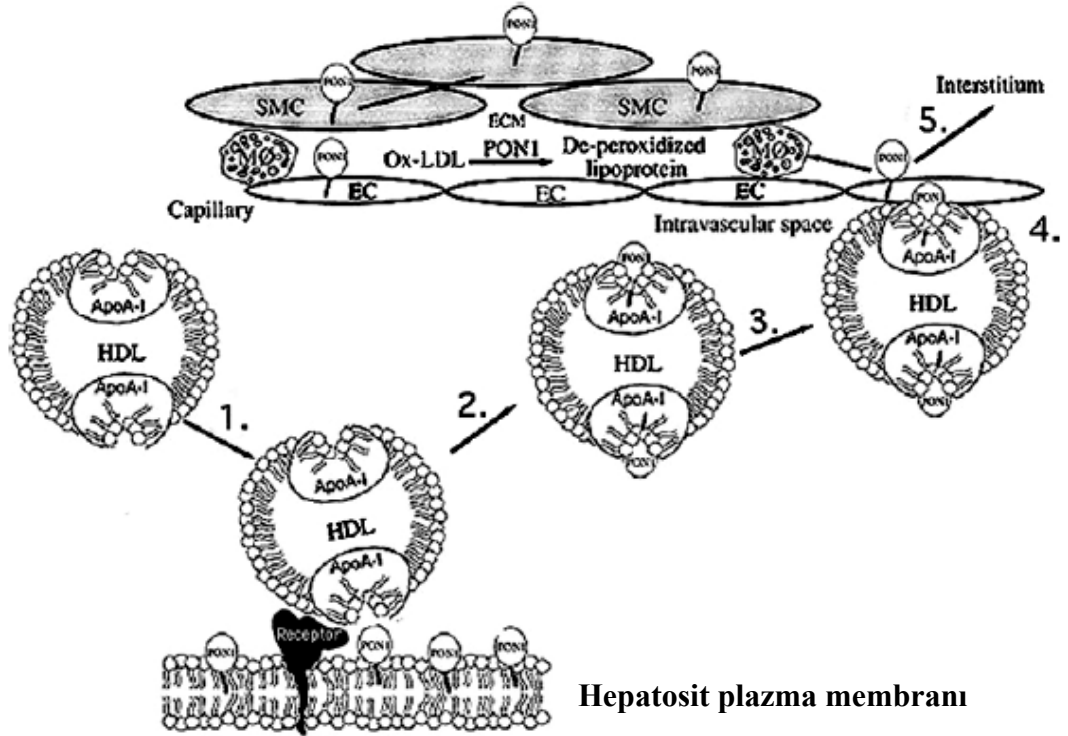
### ***Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler (HDL)***

Karaciğerde ve ince bağırsak duvarlarında sentezlenen bir önemli lipoprotein sınıfıdır. HDL<sub>2</sub> ve HDL<sub>3</sub> olmak üzere başlıca iki gruba ayrılabilir. HDL'ler, ağırlıkça %55 oranında protein (apoA-I, apoA-II, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoD, apoE apolipoproteinleri), %2 oranında serbest kolesterol, %15 oranında kolesterol esteri, %24 oranında fosfolipid, %4 oranında trigliserid içerirler. Yeni sentezlenen HDL, diskoid şekillidir; apoA-I, apoA-II, lesitin ve serbest kolesterol içerir ve dolaşım sırasında diğer lipoproteinlerden kolesterol esterlerini alır. Ayrıca yeni sentezlenen HDL' nin yüzeyindeki lesitin: kolesterol açil transferaz (LCAT) da serbest kolesterol ile lesitinden, kolesterol esteri ve lizolesitin oluşturur ve yapısındaki kolesterol esterlerinin artmasıyla küre şeklinde olgun HDL'ye dönüşür. İlk oluşan olgun HDL, HDL<sub>3</sub> olarak bilinir. Daha sonra kolesterol esterlerinin artması ve apoE katılmasıyla HDL<sub>2</sub> ve daha ileri aşamada HDL<sub>1</sub>(HDL<sub>C</sub>) oluşur. Dolaşım sırasında kolesterolden zenginleşen HDL, karaciğere dönünce kolesterolünü karaciğerde bırakır. HDL'nin kolesterolü özellikle damar endoteli gibi dokulardan karaciğere taşıma fonksiyonu 'antiaterojenik etki' oluşturur (38).

#### **3.5.2. HDL-PON 1 İlişkisi**

HDL, PON 1 için bir taşıyıcı görevi görür. Bu lipoprotein grubu aynı zamanda enzimin fonksiyonu için önemli olan hidrofobik ortamı da sağlar. Buna karşılık PON 1'de HDL'yi oksidasyondan korur (22). Genel olarak proteinlerde görülen amino ucunda bulunan sinyal dizininin ayrılması olayı PON 1 proteininde meydana gelmez ve enzim buradaki transmembran domaini sayesinde HDL' ye bağlanır (37). Bu bölgesi bulunmayan mutant PON 1'in HDL'ye bağlanamadığı görülmüştür (148). Enzimin HDL'ye bağlanan bölgesi triptofan ve tripsin amino

asitlerince zengindir (37). Önceleri PON 1'in sadece HDL<sub>2</sub> 'ye bağlandığı düşünülürdü ancak daha sonraki çalışmalar HDL<sub>3</sub> 'lerinde yüksek yoğunluklarda PON 1 taşıdıkları belirlenmiştir (18). HDL yapısında bulunan proteinlerin ayrıştırılıp saflaştırılması yolu ile insan PON 1 enziminin HDL'nin apoA-I ve apoJ (clusterin) fraksiyonları ile birlikte bulunduğu bildirilmiştir. Son zamanlarda apoA-II içeren HDL'lerin de PON 1 taşıdıkları tespit edilmiştir (37).



**Şekil 5.** PON 1 salınımı, HDL ile bağlanması ve lipid peroksidasyon alanına taşınması. 1- HDL geçici olarak reseptör aracılığı ile hepatosite bağlanır.2-Hidroforbik amino ucuyla hücre membranına bağlı olan PON 1, HDL'ye transfer olur ve apoA-I tarafından stabilize edilir. 3- PON 1 HDL ile birlikte damar içine geçer. 4- PON 1 difüzyon yoluyla plazma membranlarındaki fosfolipidlere geçer.5- Bundan sonra interstisyuma, LDL birikimi ve oksidatif hasarın olduğu bölgeye gider ve koruyucu etkisini gösterir. EC: endotel hücresi, SMC: düz kas hücresi, MØ: makrofaj, ECM: ekstraselüler matriks, Ox-LDL: okside LDL (148).

### 3.5.2.1. HDL Üzerinde, Enzimatik Etkiye Sahip Bazı Proteinler

HDL üzerinde antioksidan özelliği olan, HDL ile LDL'yi lipid peroksidasyona karşı koruduğu düşünülen birçok protein bulunur. HDL üzerinde PON 1 'den başka lesitin kolesterol açıltransferaz (LCAT), trombosit aktive edici

faktör-asetil hidrolaz (PAF-AH), proteinaz (elastaz benzeri), fosfolipaz D, albumin ve apoA-I gibi enzimatik aktiviteye sahip proteinler bulunur. Bu proteinlerin; LDL'lerin peroksidasyonuna karşı etkilerini karşılaştırmak için LDL tek başına ve bu proteinlerle oksidasyon şartlarında inkubasyona bırakılmış ve PON 1'in LDL'yi oksidasyona karşı koruma gücünün diğer bütün proteinlerden yüksek olduğu bulunmuştur (41).

### **3.6. PON 1 ve Hastalıklar**

#### **3.6.1. PON 1 ve Ateroskleroz ile İlişkili Hastalıklar**

PON 1'in HDL ile ilişkili bir enzim olmasının ortaya çıkması ve antioksidan fonksiyonunun belirlenmesinden sonra başta ateroskleroz ve tip 1 ve tip 2 diyabet olmak üzere birçok hastalık durumunun PON 1 ile ilişkisine bakılmıştır.

#### **3.6.2. PON 1 ve Koroner Kalp Hastalığı**

Koroner kalp hastalığı (KKH) risk faktörleri arasında düşük plazma HDL yoğunluğu ilk sırada yer almaktadır. HDL'nin KKH gelişimine karşı koruyucu etkisi kompleks bir olaydır. Çalışmalar HDL'nin tersine kolesterol taşınmasında veya arter duvarından kolesterol uzaklaştırılmasındaki etkisinin zayıflaması üzerine yoğunlaşmaktadır. Son zamanlardaki araştırmalar KKH oluşumunun HDL'nin LDL ve hücre membranlarını lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin azalması ile ilişkilendirilmişlerdir (105). PON 1; HDL'nin lipid peroksidlerini metabolize etmesinde ve LDL'ler üzerinde birikmelerine engel olma yeteneğindeki en önemli faktördür. Bu enzimdeki polimorfizmlerin KKH gelişmesi riski ile bağlantılarının araştırıldığı çalışmaların bazıları 192R alel varlığının yüksek KKH riski ile ilişkili bulmuşken (81), bazı çalışmalarda 192. konumda R veya Q varlığının KKH ile ilişkilendirilmemiştir (41). Yine L/M 55

konumundaki ve promotör bölgedeki polimorfizmlerin KKH ile ilişkili olup olmadığına dair çalışmalar kesin bir ilişki olduğu sonucuna varmamıştır ancak KKH hastalarında PON 1 aktivitesinin kontrollere göre yarı yarıya düşük olduğu bildirilmiştir (105).

### **3.6.3. PON 1 ve Ailesel Hiperkolesterolemi**

Ailesel hiperkolesterolemi (AH) heterozigotik formunun popülasyondaki oranı % 0.2'dir. LDL reseptör genindeki bir mutasyondan kaynaklanan LDL reseptör sayısındaki düşüş ile karakterizedir. Yapılan çalışmalar AH hastalarında normal bireylere göre PON 1 aktivitesinde HDL yoğunluğuna bağlı olmaksızın % 20-50'lik bir azalma olduğunu göstermektedir. Aynı düşüş hiperkolesterolemi oluşturulan deney hayvanlarında da gözlenmektedir (154).

### **3.6.4. PON 1 ve Metabolik Sendrom**

Uluslararası diyabet federasyonu (IDF); metabolik sendromu, yüksek açlık kan şekeri veya tip 2 diyabet tanısı konulması, abdominal obezite, glukoz intoleransı, yüksek trigliserit, düşük HDL değerleri yüksek kan basıncı gibi patolojik durumların bir arada görülmesi olarak tanımlamaktadır (145).

İnsülin direnci en önemli durum olmakla birlikte genetik, yaşam tarzı ve çevresel faktörler de sendromun gelişiminde rol alırlar. PON 1 enziminin değişik polimorfizmleri insülin direnci ile ilişkilendirilmektedir. Metabolik sendromlu hastalar kontroller ile karşılaştırıldığında, PON 1 aktiviteleri önemli derecede düşük bulunmuş fakat 192. pozisyondaki Q/R polimorfizminin bir etkisi bulunamamıştır (145).

### **3.6.5. PON 1 ve Sinirsel Hastalıklar**

Organofosfatlar çoğunlukla nörotoksik etkili bileşiklerdir ve bu tür bileşiklere uzun süre maruziyet çeşitli nöropatiler ve nöropsikolojik etkiler

oluştururlar (154). PON 1'in organofosfatları detoksifiye etme kapasitesi bu enzimin Alzheimer ve Parkinson gibi sinirsel hastalıklara duyarlılığını değerlendirmede bir ölçüt olarak kullanılmasını akla getirmektedir.

Koyunların ilaçlanmasında diazokson metaboliti veren organofosfatları kullanan çiftçilerin eğer PON 1 aktiviteleri düşük ise ciddi bir şekilde hastalandıkları görülmüştür (33). PON 1 antioksidan aktivitesindeki düşüşün Alzheimer hastalığının gelişiminde az da olsa katkıda bulunabileceği, ve 192. konumda R allel varlığının Alzheimer hastalık riskini düşürdüğü bildirilmiştir (69).

### **3.6.6. PON 1 ve Böbrek Yetmezliği**

Kronik böbrek yetmezliği genel olarak dislipidemi ve oksidatif stres ile ilişkili olup süperoksit dismutaz, katalaz ve PON 1 gibi antioksidan enzimlerin eksikliği görülür (6). Hemodiyaliz hastalarında ve üremi görülen hastalarda paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi ve HDL düzeyleri azalır (154). Böbrek naklinden sonra PON 1 aktivitesi normal düzeylere yükselir (68).

### **3.6.7. PON 1 ve Tangier Hastalığı**

HDL eksikliğine bağlı olarak gelişen bir hastalıktır. HDL ile birlikte plazma fosfolipid miktarıda önemli derecede düşüktür. Hastalığın HDL, apo I ve apo II düzeylerindeki azalmadan dolayı PON 1 aktivitesindeki azalma ile ilişkili olabileceği düşünülmüş ancak hastaların PON 1 yoğunluklarındaki düşüşe rağmen enzim aktivitelerinde bir değişim gözlemlenmemiştir (80).

## **3.7. PON 1 ile Diabetes Mellitus (DM) Arasındaki İlişki**

### **3.7.1. Diabetes Mellitus**

Diyabet (Diabetes mellitus-DM), insulin sekresyonu, insulin aktivitesi veya her ikisinden kaynaklanan bozukluklar sonucunda, kronik hiperglisemi,

karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasındaki düzensizliklerle karakterize bir hastalıktır (17).

DM yaşam boyu süren, sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini oldukça azaltan morbiditesi, mortalitesi ve topluma ekonomik yükü yüksek bir hastalıktır (8). Dünyada yaklaşık 150 milyon insan DM'den etkilenmekte ve bu sayının 2010 yılında 215 milyona, 2025 yılında ise 300 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (120).

Diyabet bariz nitelik kazanmışsa, açlıkta hiperglisemiyle karakterizedir, şayet henüz daha erken evrelerde ise kendini glukoz intoleransı ile gösterir. Sonuç olarak, diyabet, rutin olarak yapılan kan veya idrar glukoz testleri ya da komplikasyonlarının ortaya çıkması üzerine fark edilir. (17).

Kontrol altına alınmamış yüksek kan şekeri uzun vadede çeşitli komplikasyonların ortaya çıkmasına yol açar. Diyabetik hastalarda artmış aterosklerotik, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar yanında sıklıkla hipertansiyon ve lipoprotein metabolizmasındaki bozukluklar görülür (10).

### **3.7.1.1. Diyabetin Sınıflandırılması**

Amerika Diyabet Derneği (American Diabetes Association-ADA) tarafından 2007 yılında belirlenen etiyolojik sınıflandırmaya göre diyabet tipleri (10):

**I-** Tip 1 DM (genellikle insülin yetmezliği ile sonuçlanan beta hücre harabiyeti vardır)

**II-** Tip 2 DM (esasen insülin direnci ile birlikte insülin yetersizliği veya insülin sekresyon defektiyle seyreden insülin direnci)

**III-** Diğer spesifik tipler

A- Beta hücre fonksiyonunda genetik defektler

- 1-Kromozom 20, HNF-4 $\alpha$  (MODY 1)
  - 2-Kromozom 7, glukokinaz (MODY 2)
  - 3-Kromozom 12, HNF-1 $\alpha$  (MODY 3)
  - 4-Kromozom 13, İnsülin promotör faktör-1 (IPF-1) (MODY 4)
  - 5-Kromozom 17, HNF-1 $\beta$  (MODY 5)
  - 6-Kromozom 2, NeuroD1 (MODY 6)
  - 7-Mitokondriyal DNA
  - 8-Diğerleri
- B-İnsülinin fonksiyonunda genetik defektler
- C-Ekzokrin pankreas hastalıkları
- D-Endokrinopatiler
- E-İlaç, kimyasal maddeler
- F-Enfeksiyonlar
- G-İmmun orjinli diyabetin nadir formları
- H- Diyabetle birlikte olan diğerk genetik sendromlar
- IV- Gestasyonel diabetes mellitus (GDM)**

### **Tip 1 Diyabet**

Tam insülin yetmezliğine yol açan  $\beta$ -hücre yıkımı sonucu oluşmakta ve otoimmün (Tip 1A) veya idiyopatik (Tip 1B) olarak sınıflandırılabilir. Bu diyabet formunda hayatta kalmak için insuline ihtiyaç vardır. Tip 1 diyabetik hastalar, hastalık açıkça tanınır karakter kazanmadan önce metabolik olarak normaldirler, fakat  $\beta$ -hücre yıkımı, otoantikörlerin kesin olarak gösterilmesiyle erkenden yakalanabilir(17).

## **Tip 2 Diyabet**

Diyabetin en yaygın formunu oluşturur. İnsulin aktivitesinde veya insülin sekresyonundaki herhangi bir bozuklukla karakterizedir. Genellikle diabet klinik olarak kendini göstermeye başladığında bu mekanizmalardan her ikisi de hastada mevcuttur. Diyabetin bu formuyla ilgili spesifik bir etiyoloji bilinmemekle beraber,  $\beta$ -hücrelerinin otoimmün yıkımı görülmemektedir (17).

### **3.7.1.2.Diyabet Tanı Kriterleri**

ADA tarafından yayınlanan diyabet tanı kriterleri (10):

- 1) Klasik diyabet semptomları (poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı) ile birlikte günün herhangi bir saatinde, son öğün zamanı dikkate alınmaksızın, plazma glukoz konsantrasyonunun  $\geq 200$ mg/dl (11.1 mmol/L).
- 2) En az 8 saatlik açlık sonrasında plazma glukoz düzeyinin  $\geq 126$  mg/dl (7.0 mmol/L) olması.
- 3) 75 gram glukoz kullanılarak uygulanacak olan Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)'nin 2. saat glukoz düzeyinin  $\geq 200$  mg/dl (11.1 mmol/L) olması.
- 4) Eğer açlık kan şekeri 100-125 mg/dl aralığında ise kişide bozulmuş açlık glukozu (Impaired fasting glucose-IFG), OGTT sonrası 2. saat kan şekeri düzeyi 140-199 mg/dl aralığında ise kişide bozulmuş glukoz toleransı (Impaired glucose tolerance-IGT) mevcuttur (10).

### **3.7.2. Diyabetin Komplikasyonları**

#### **3.7.2.1. Akut Komplikasyonlar**

Tip 1 diyabetin başlıca komplikasyonu çok ciddi sonuçlar doğurabilen diyabetik ketoasidoz (DKA) dur. DKA insülinin mutlak veya göreceli eksikliğinden kaynaklanır. Tablonun oluşmasında insülin yetersizliğinin yanında insüline zıt fonksiyonlu hormonların (glukagon, katekolaminler, kortizol)

işlevlerinin artmasından dolayı glukoneogenezin artmasına bağlı olarak da gelişir. Çok az oranlarda olmakla birlikte tedavinin aksatılması, enfeksiyon durumları ve aşırı alkol tüketimi durumlarında Tip 2 diyabetli hastalarda da ortaya çıkabilmektedir. Glikojen yıkımı ve glukoz üretimi artarken glukozun yıkımı azalır. Bu durumda organizma enerjinin lipidlerden sağlanması yoluna gider ve yağ asitleri oksidasyonu artar. Bu durumun uzunca süreler devam etmesi kanda asidik karakterde olan keton cisimciklerinin artışına neden olur (155).

Genelde yaşlı tip 2 diyabetli hastalarda görülen başlıca akut komplikasyon poliüri, ortostatik hipotansiyon, mental problemler, nöbetler ve bazen koma ile tanımlanan hiperglisemik hiperosmolar nonketotik koma (non-ketotic hyperosmolar state-NKHS)'dir. Başlıca nedeni insülin fazlalığı yanında yetersiz ve dengesiz su alımı sonucu bozulan sıvı-elektrolit dengesidir. Sonuç olarak sıvı kaybından dolayı intravasküler hacimde düşüş görülür (155).

### **3.7.2.2. Kronik Komplikasyonlar**

Diyabetin kronik komplikasyonları birçok organ ve sistemi etkiler ve morbidite ve mortalitenin başlıca nedenleridir. Kronik komplikasyonlar genel olarak vasküler ve vasküler olmayanlar olarak sınıflandırılabilir. Vasküler komplikasyonlar, mikrovasküler (retinopati, nöropati, nefropati) ve makrovasküler (koroner arter hastalığı, periferel damar hastalığı, serebrovasküler hastalık) komplikasyonlar olarak sınıflandırılır. Vasküler olmayan komplikasyonlar ise gastroparesis, cinsel disfonksiyon ve deri lezyonları şeklinde görülür.

### **Diyabetik Retinopati**

Retinopati, 15 yıldan uzun süre tip 2 diyabeti olan hastaların % 75'inde görülür ve gerek ülkemizde gerekse dünyada körlüğün en önemli sebebidir.

Nonproliferatif ve proliferatif olmak üzere iki tipi vardır. Nonproliferatif Diabetik Retinopate, hasara uğramış damarlardan kan ve sıvı sızar. Bunun sonucunda ödem olur. Retinada beslenme bozulur ve tedavi edilmezse yavaş yavaş ilerler. Genelde hastalığın 8-12. yıllarında gözlenir. Proliferatif diabetik retinopati hastalığın daha da ileri evreleridir. Doku beslenmesi çok bozulunca yeni damar oluşumları meydana gelir. Bu yeni damar oluşumları çok incedir, kendi kendine göz içine kanama yapabilir, kanama çok yoğun olursa retina tabakasında çekintilere ve dekolmana neden olabilir (155).

### **Diabetik Nöropati**

Diabetli hastaların yaklaşık yarısında nöropatiler görülür ve bu nöropatiler polinöropati, mononöropati ve/veya otonom nöropatiler şeklinde olabilir. Polinöropatilerde perifer duyunun kaybı eğer mikrovasküler ve makrovasküler hasarlar ile birlikte ise kapanmayan ülseratif yaralar meydana gelir. Mononöropatiler daha az görülürler ve bazı kranial ve perifer sinirlerde hasar meydana gelir. Otonom nöropatiler kalp-damar, gastrointestinal ve metabolik sistemleri içine alır (155).

### **Diabetik Nefropati**

Diabetik nefropati son dönem böbrek yetmezliğinin en önemli sebebidir. Hem tip 1, hem de tip 2 diyabette görülür. Diyabette görülen ölümlerin yaklaşık % 10'u diabetik nefropatinin sonucu olarak gelişir (156).

### **3.8. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres**

Diabet, metabolik bir bozukluk olmakla birlikte bir oksidatif stres durumu olarak değerlendirilebilir. Diabet ve diabet komplikasyonlarının oksidatif stresle ilişkisi uzun yıllardan beri bilinmektedir (110). Kronik

hiperglisemi özellikle diyabet komplikasyonlarının geliştiği dokularda oksidatif streste artışa neden olmaktadır (159).

Normal koşullarda serbest radikallerin üretilme hızı ve bunların ortamdaki temizlenme hızı denge halindedir ve oksidatif denge olarak ifade edilir. Ancak hücrel mekanizmalar tarafından üretilen serbest radikal miktarının bunlarla mücadele etme gücü olan antioksidan kapasiteyi aşması durumunda oksidatif stres durumu meydana gelir (159). Hücrel antioksidanlar oluşan serbest radikalleri etkisizleştirmezse bu radikaller, protein, lipid ve nükleik asitlerle etkileşime girerek proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliklere, membran bütünlüğü ve fonksiyon kayıplarına ve bazı mutasyonlara neden olabilirler.

### **3.8.1. Serbest Radikaller**

Serbest radikaller normal fizyolojik koşullarda organizma tarafından çeşitli fonksiyonları ifa etmek üzere üretilirler. Serbest radikal dış yörüngelerinde ortaklanmamış elektron bulunduran, stabil olmayan ve stabil hale geçmeye meyil gösteren moleküllerdir. Örneğin süperoksid radikali ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve nitrik oksit (NO) normal fizyoloji için esansiyel üç reaktif oksijen türü (ROS) olmakla birlikte yaşlanmada ve hastalık durumunun oluşumunda rol aldıkları bilinmektedir (159).

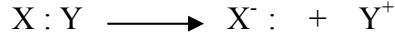
#### **3.8.1.1. Serbest Radikallerin Oluşumu**

Serbest radikaller üç yolla meydana gelir (7).

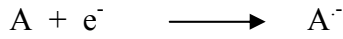
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu her bir parçasında ortak elektronlardan biri kalacak şekilde bölünmesi sonucu oluşabilirler.



2. Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi sonucu oluşabilirler. Bu şekilde bölünmenin sonucunda kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil, iyonlar meydana gelir.



3. Radikal olmayan bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşabilirler.



### 3.8.1.2. Diyabet Patogenezinde Önemli Olan Bazı Serbest Radikaller

#### 1. Süperoksid ( $O_2^{\cdot -}$ )

Mitokondriyal elektron transfer zincirinde redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'ın okside nikotinamid adenin dinükleotid ( $NAD^+$ )'a yükseltgenmesi ile üretilir. Yine pek çok oksidaz tarafından da üretilir (159). Süperoksid, nötrofillerin antibakteriyel aktivitesi, apoptozis, yangı ve vasküler fonksiyonların regülasyonu gibi yararlı etkilere sahiptir. Süperoksid molekülü kendi başına direkt olarak fazla zarar vermez ancak  $H_2O_2$  kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi olması ile zararlı etkilere neden olabilmektedir. Düşük süperoksid düzeyleri, bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlığa yol açabilir. Artmış süperoksid düzeyleri ise süperoksid dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve oksijene dönüştürülerek azaltılır. Diyabette artmış glukoz düzeyinin neden olduğu hücre metabolizmasındaki bozukluk sonucu aşırı miktarda üretilir ve komplikasyon gelişimine katkıda bulunur (159).

#### 2. Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )

Süperoksidin SOD ile dismutasyonu ile, kendiliğinden veya başka enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşur. (159). Süperoksit üretildiği yerde kaldığı halde  $H_2O_2$  üretildiği yerde kalmaz ve membranı geçerek sitozole geçer. Hidrojen

peroksid çok kuvvetli bir oksitleyici molekül olup hücrede, katalaz (CAT), glutasyon (GSH) ve tiyoredoksin (Trx) aracılığı ile oksijen ve H<sub>2</sub>O 'ya dönüştürülür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> serbest Fe<sup>+2</sup> ile reaksiyona girerse, demir okside olurken hidroksil radikali oluşur ve oluşan hidroksil radikali üretimi vazodilatasyon kaybına ve bu da doku hipoksisi ve endotel hasarına neden olmaktadır (159).

### **3. Nitrik Oksit (NO)**

Sitozolik bir enzim olan nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından oluşturulur. NO iyon kanallarını düzenleyen guanilat siklazı aktive ederek damar tonusunda önemli bir işlev görür. Ayrıca sitokrom oksidazın oksijen bağlayan yüzeyi ile oksijene karşı yarışmalı bir şekilde bağlanarak enzimi inhibe ederek hücre solunumunda rol alır. NO belli şartlar altında bir antioksidan olarak görev yaparak lipid peroksidasyonunu engeller (126). Buna karşın NO, O<sub>2</sub><sup>-</sup> radikalinin artması durumunda bu radikal ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşumuna neden olur ve böylece bir prooksidan olarak da hareket edebilir (126,159). Tartışmalı olmakla beraber diyabette görülen endotel fonksiyon bozukluğundan endoteldeki NO sentezinin düşüklüğü sorumlu tutulmaktadır (126,159).

### **4. Hidroksil Radikali (OH<sup>·</sup>)**

Oksidatif strete en reaktif radikal yani en etkin oksidan olarak bilinir. Amino asitler, nükleik asitler, organik asitler, fosfolipidler ve şekerler gibi hemen hemen bütün moleküller ile reaksiyona girebilmektedir (47).

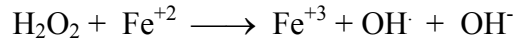
### **5. Singlet Oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>)**

Yapısında ortaklanmamış elektron bulundurmadığından dolayı serbest radikal tanımına uymadığı halde serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına neden olması dolayısı ile önem kazanmaktadır. (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), yörüngesindeki elektronlardan birisinin dışarıdan enerji alması sonucunda bulunduğu yörüngenin

tersine olacak şekilde yer değiştirmesi neticesinde veya süperoksit radikalının dismutasyonu ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in hipoklorit ile reaksiyonu sonucunda meydana gelebilir (138).

## 6. Geçiş Metalleri

Bir elektronun alınması veya verilmesinin söz konusu olduğu bazı reaksiyonlarda metal iyonları radikal reaksiyonunu hızlandırır. Metal iyonları lipid peroksidasyonu oluşumu esnasında oluşmuş lipid hidroperksitlerinin parçalanmalarını ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını katalize ederek lipid peroksidasyonunda önemli rol oynarlar. Bunun sonucu olarak az zararlı olan radikallerin daha zararlı hale gelmelerine katkıda bulunmuş olurlar. Örneğin fenton reaksiyonunda Fe<sup>+2</sup> iyonlarının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'i indirgemesi sonucu OH<sup>·</sup> oluşmaktadır (7).



### 3.8.1.3. Serbest Radikallerin Biyolojik Moleküller Üzerine Etkileri

Serbest radikaller bazı çevre kirliliği yapan maddelere maruz kalınması, normal metabolizmanın yan ürünü olarak ve radyasyon sonucu oluşurlar. Bunlar oldukça reaktif özellikte olduklarından hücre organellerine zarar verebilirler ve birçok hastalıkta rol oynayabilirler (141). Dejeneratif hastalıkların çoğunun serbest radikal reaksiyonları kaynaklı olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. Bu hastalıklar arasında ateroskleroz, kanser, enflamatuar eklem hastalığı, astım, diyabet ve dejeneratif göz hastalığı sayılabilir (46).

Reaktivitelerine bağlı olarak, serbest radikaller tüm hücrenel komponentlerde defalarca reaksiyona girer ve hücre için çok toksiktir. Tüm hücrenel komponentler doymamış bağlar ve tiyol grupları seviyesinde serbest oksijen radikalleriyle reaksiyona girebilir (112).

### **Proteinlere Etkileri**

Amino asit içerikleri, proteinlerin serbest radikal harabiyetinden ne derece etkileneceğini belirler. Triptofan, fenilalanin, tirozin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitleri içeren proteinlerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için, serbest radikal reaksiyonlarından kolaylıkla etkilenmektedirler (114).

### **DNA Üzerine Etkileri**

İyonize edici radyasyon sonucu oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkilemekte ve hücrede mutasyon ve ölüme yol açmaktadır (114). DNA hasarının önemli olabilmesi için yere spesifik, yüksek duyarlılık, zincir kırıklarına yol açacak şekilde olması veya replikasyon oluşmadan önce tamir sistemlerinin uzaklaşması ve mutasyonlara yol açması gerekir (32).

### **Membran Lipidleri Üzerine Etkileri**

Serbest radikallere en çok maruz kalan moleküller lipidlerdir. Hücre membranları doymamış yağ asitlerinden zengin olup okside edici radikaller tarafından kolayca tutulurlar. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı olan lipid peroksidasyonu hasar vericidir. Çünkü kendiliğinden ilerleyen zincir reaksiyonları devam eder (32). Lipid peroksidasyon ürünlerinden malondialdehid (MDA), membran komponentlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona yol açmakta ve DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girerek karsinojenik özellik taşımaktadır (87).

### **Sitozolik Moleküller Üzerine Etkileri**

Sitoplazmik serbest radikallerin etkisi ile sitozoldaki proteinler değişime uğramaktadır. Hemoproteinlerden olan oksihemoglobinin, süperoksit radikallerin

ya da hidrojen peroksidin demirle reaksiyonu sonucu methemoglobin'e dönüşmesi de serbest radikallerin toksik etkisinin bir başka örneğidir (87).

### **3.9. Diyabetik Komplikasyonların Oluşumuna Yol Açan Başlıca Mekanizmalar**

Diyabetik komplikasyonların oluşmasının esas nedeni hipergliseminin tetiklediği mekanizmalardır. Hiperglisemi sonucu aşağıdaki mekanizmalar devreye girmektedir.

#### **3.9.1. İlerlemiş Glikosilasyon Son Ürünleri (Advanced Glycosylation End Products-AGE) Aracılı ROS Oluşumu**

Yüksek glukoz yoğunluklarında glukoz, proteinlerin amino grupları ile enzimatik olmayan reaksiyonlara girerek proteinin bazı amino asitlerinin glikasyona uğramasına neden olur ve bu ürünler Amadori ürünleri olarak adlandırılır. Amadori ürünleri bir seri reaksiyondan sonra daha stabil olan AGE'ler meydana gelir (153). Bu reaksiyonlar geçiş metalleri aracılığı ile olur. Diyabetiklerde geçiş metallerini bağlama kapasitesi düştüğü için bu reaksiyonların oluşumu artmaktadır. AGE'ler endotelin-1 aracılığı ile vazokonstriksiyonu artırarak endotel hasarına yol açabileceği gibi reseptörleri aracılığı ile hücre yüzeyine bağlanır ve kompleks biyokimyasal mekanizmaları uyararak ROS üretimine sebep olur (167). Bununla birlikte artmış serbest radikallerin de hücre içi AGE oluşumunu artırdığı bildirilmiştir (54). Çalışmalar, AGE ve serbest radikallerin protein kinaz C (PKC)'yi aktive ettiğini ve PKC'nin damar kan akımını, damar geçirgenliğini, hücre dışı matriks bileşimini ve hücre büyümesini etkileyerek diyabetin vasküler komplikasyonlarının gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir (31). AGE 'lerin oksidatif stresteki rolünün daha iyi belirlenmesi ve antioksidanlarla engellenebileceğini göstermek için yapılan

çalışmalarda antioksidanların ve AGE reseptörlerine karşı oluşturulan antikorların oksidatif stresi önlediği bildirilmiştir (27).

### **3.9.2. Poliöl Yol**

Aldoz redüktaz enzimi, toksik aldehydleri inaktif alkollere dönüştürür ve normal yoğunluklarda glukoz bu enzim için iyi bir substrat değildir (61). Ancak yüksek glukoz yoğunluğunda bu enzim glukozu sorbitole dönüştürerek glukozun fruktoza çevrilmesi yolu olan poliöl yolunu başlatır. Aldoz redüktaz enzimi bu işlemi yaparken kofaktör olarak NADPH'yi kullanır. Bu şekilde aktive olan poliöl yolu sitozolik NADPH miktarının düşmesine ve bu da glutasyon miktarının azalmasına (glutasyon redüktaz da NADPH'ye gereksinim duyar) neden olur. Bunun sonucunda hücre normal hücresel fonksiyonlar sonucu oluşan serbest radikallerin etkisinde kalır. Buna ilaveten bu şekilde glukozdan üretilen sorbitölün kendisi de hücrede ozmotik stres oluşturur ve retinopati, nöropati, nefropati ve koroner kalp hastalığı patogenezinde rol alır (25).

### **3.9.3. Protein Kinaz C (PKC) Aktivasyonu**

Prooksidanlar PKC'nin katalitik domaini ile reaksiyona girerek enzimin aktivitesini stimüle ederken antioksidanlar aynı yere bağlanarak enzimin aktivitesini inhibe ederler (59). Diyabetik ratların böbrek ve retinalarında PKC aktivitesinin arttığı bilinmektedir (34). Yüksek glukoz yoğunlukları endotel hücrelerinde nükleer faktör kappa B aktivasyonuna yol açar ve böylece hücresel aktiviteye ve ROS üretimine sebep olur. PKC inhibitörlerinin varlığunda bu etki durmaktadır (150).

### **3.9.4. Glukozun Oto-Oksidasyonu Sonucu Mitokondrilerde Süperoksid Üretimi**

Glukoz, bir reaktif geçiş metalin varlığında reaktif ketoaldehidlere ve süperoksid anyonuna dönüştürülür. Daha sonra süperoksid radikali hidrojen peroksid üzerinden çok reaktif bir molekül olan hidroksil radikaline dönüşür. Yine glukoz fazlalığında glikozun oksidasyonu artar ve daha çok NADH'nın açığa çıkmasına neden olur. NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP sentezi için gereken enerjinin sağlanmasında kullanılır. Bu aşamada süperoksid radikali meydana gelir (24). Yukarıda bahsedildiği üzere süperoksid radikali ( $O_2^-$ ) hücrenin normal metabolik olaylarının bir ara ürünüdür. Bu ürünün oluşması sonucu doğuran olaylardan glikoliz, elektron transferi ve oksidatif fosforilasyonun akut veya kronik bir şekilde artması durumunda fazlaca oluşacak olan süperoksid radikali hücre için oksidatif stres kaynağını oluşturur (159).

### **3.10. Diyabet ve Antioksidan Sistemler**

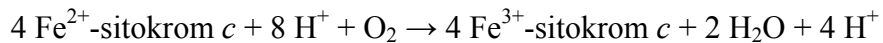
Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu veya bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için organizma bazı savunma mekanizmalarına sahiptir. Oksidan maddelerin etkilerini ortadan kaldıran bu sistemlere antioksidan savunma sistemleri denir (9). Normal koşullarda serbest radikaller ile antioksidanlar denge halindedir ancak diyabette denge serbest radikallerin lehine bozulur ve bu durum diyabetin komplikasyonlarının gelişmesine önemli katkılar sağlamaktadır. Antioksidan savunma sistemlerinin daha etkin hale getirilmesi ve dengenin antioksidan sistem lehine çevrilmesi diyabetin komplikasyonları ile mücadelede başarılı olmayı sağlamaktadır. Antioksidanlar oksidanların etkilerini dört mekanizma ile ortadan kaldırırlar (111):

1. Temizleme veya süpürme (Scavenging) etkisi: Antioksidan enzimler tarafından oluşturulan bir savunma sistemi olup oksidanların daha zayıf bir moleküle çevirme şeklinde cereyan eder.
2. Baskılama (Quencher) etkisi: Vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır ve oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olur.
3. Zincir koparma etkisi: E vitamini, hemoglobin, seruloplazmin tarafından gerçekleştirilir ve oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engellemek şeklinde gelişir.
4. Onarma etkisi

### **3.10.1. Antioksidan Savunma Sisteminin Enzimatik Üyeleri**

#### **3.10.1.1. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi**

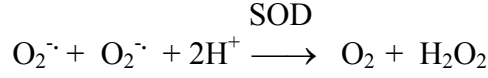
Mitokondri membranında bulunan bir enzim olan sitokrom oksidaz, mitokondrielerde bulunan solunum zincirinin son komponenti olup dehidrogenazlarca substrat moleküllerinin oksidasyonu sonucu ortaya çıkan elektronların, son akseptörleri olan moleküler oksijene transferinden sorumludur. Hücredeki oksijenin % 96'sının elimine edilmesini sağlar. Aşağıdaki şekilde oksijeni ve H<sup>+</sup> iyonlarını kullanarak H<sub>2</sub>O üretiminde görev alır (125).



#### **3.10.1.2. Süperoksid Dismutaz (SOD)**

Üç tür SOD bulunmaktadır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki süperoksid radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dir (168).

Metalloprotein olan SOD, süperoksid moleküllerini O<sub>2</sub> molekülüne yükseltgeyip, diğer süperoksid molekülünü H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'e indirger.



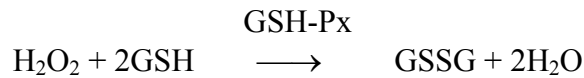
Diyabette SOD düzeylerinin arttığı, değişmediği veya azaldığını bildiren ve birbiriyle çelişen çalışmalar vardır (91,110,2,14).

### 3.10.1.3. Katalaz (CAT)

Peroksizomlarda yerleşik olup her biri bir prostetik grup olan ve yapısında  $\text{Fe}^{+3}$  bulunduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. SOD'ın oluşturduğu  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i katalaz peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. Katalazın  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'e karşı  $K_m$ 'i glutatyon peroksidaza göre daha yüksek olduğundan düşük konsantrasyonlarda  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i glutatyon peroksidaz parçalarken, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz devreye girer. Katalaz aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur (111). Tip 2 diyabetli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada diyabetli hastaların artmış serum katalaz aktivitesine sahip oldukları vurgulanmaktadır (110). Ancak bu artışın organizmanın kendisini lipid peroksidasyonundan korumak için kompensatuvar bir mekanizma olabileceği vurgulanmakla beraber başka çalışmalarda da azalmış olduğu açıklanmıştır (2,91).

### 3.10.1.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Her birinde selenosistein bulunan 4 alt birimden oluşur. Selenyum eksikliği glutatyon peroksidaz yetersizliği sonucu doğurabilir (168). Redükte glutatyonu yükseltirken  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (7).



Glutatyon peroksidaz eritrositlerdeki en kuvvetli antioksidandır ve E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda membranı peroksidasyona karşı korur. Yapılan

çalışmalarda diyabetli hastalarda serum glutatyon peroksidaz aktivitesinin azalmış olduğu rapor edilmektedir (91,110).

#### **3.10.1.5. Glutatyon Redüktaz (GR)**

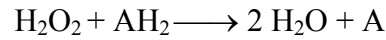
Yükseltgenmiş glutatyonu indirgeyen bu enzim her birisi NADPH bağlayan, FAD bağlayan ve ara bölge olmak üzere üç yapısal alan içeren iki alt birimden oluşur. Glutatyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra altbirimlerdeki iki sistein arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyon aktarılmış olur (168). Glutatyon reduktaz aktivitesinin diyabette azalmış olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (91).

#### **3.10.1.6. Glutatyon S-Transferaz (GST)**

GST glutatyon ile toksik metabolitlerin konjugasyonunu katalizleyerek detoksifikasyonlarını sağlar (158).

#### **3.10.1.7. Hidroperoksidazlar**

Hidroperoksidazlar, substrat olarak hidrojen peroksit veya organik peroksit kullanan oksidoredüktazlar olup, zararlı peroksitlere karşı vücudu korurlar. Birkaç maddeyi elektron akseptörü olarak kullanıp peroksitleri indirgerler. Peroksidazlar tarafından katalizlenen reaksiyonlarda hidrojen peroksit suya indirgenir (90).



#### **3.10.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**

##### **3.10.2.1. Vitamin A ( $\beta$ -karoten)**

$\beta$ -karoten radikal yakalayıcı olarak görev yapar. Singlet oksijeni baskılayarak, süperoksid radikalini temizleyerek ve peroksid radikalleri ile doğrudan etkileşime girerek antioksidan etkiler gösterir. Alfa-tokoferolle

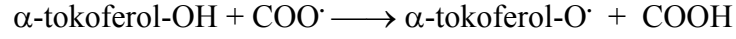
karşılaştırıldığında oldukça zayıf bir antioksidandır ve  $\alpha$ -tokoferol bittikten sonra kullanılır (168).

### **3.10.2.2. Vitamin C (Askorbik Asit)**

Askorbik asit; kollajen sentezinde, tirozin yıkımında, epinefrin sentezinde, safra oluşumunda ve pek çok hidroksilasyon reaksiyonunda indirgeyici ajan olarak görev görmesinin yanında moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine neden olan ve sulu ortamlarda serbest radikallerle reaksiyona girebilme kabiliyetinde olan suda eriyen bir vitamindir. Plazmada oksidan ajanlara karşı ilk antioksidan savunma ajanı olarak görev alıp bir çok reaktif oksijen türevini ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{HOCl}$  ve  $\text{O}_3$ ) ve reaktif nitrojen türevlerini ( $\text{ONOO}^-$ ) toplayıcı etkiye sahip güçlü bir antioksidandır (28). Bu etkilerine ek olarak tokoferoksil radikalının tekrar tokoferole dönüşmesini sağlayarak E vitamininin rejenerasyonunda görev alır. Bu sırada kendisi de dehidroaskorbik asite (DHA) okside olur. Böylece C vitamini, E vitamini ile birlikte LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek ateroskleroza karşı korunmada yardımcı olur. Diyabetli hastalarda C vitamini düzeylerinin, sağlıklı kişilere göre anlamlı şekilde düşük olduğu bulunmuştur (28,163).

### **3.10.2.3. Vitamin E ( $\alpha$ -tokoferol)**

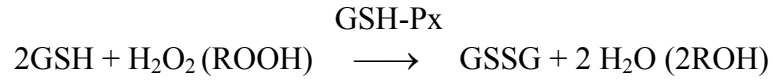
Zincir kırıcı bir antioksidan olan vitamin E, yağda çözünen vitamin olduğu için hem sellüler hem de subsellüler membranlarda ve lipoproteinlerde bulunur. Membranlarda oksijen radikallerinin ana temizleyicisidir. En aktif formu  $\alpha$ -tokoferoldür. Hidrofobik kısmına hidrojenini kolaylıkla verebilen  $-\text{OH}$  grubu bağlıdır. Bu yüzden lipid peroksidasyonu sırasında oluşan peroksil ve alkoksil radikalleri yağ asidi yerine  $\alpha$ -tokoferolle birleşerek reaksiyon zinciri kırılmış olur (43).



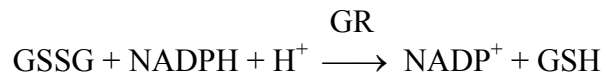
Böylece  $\alpha$ -tokoferol yeni bir radikal olan  $\alpha$ -tokoferol-O<sup>·</sup>’e dönüştürülmüş olur. Bu radikalın ise başka bir yağ asidiyle birleşebilme aktivitesi düşüktür. Sonuçta zincir reaksiyonunu durdurur. Deneysel olarak streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda vitamin E ve C suplementasyonunun lipid peroksidasyonunu azalttığı rapor edilmiştir (94). Başka bir çalışmada da tip 2 diyabetli hastalara tip 2 diyabetten korunmada ve tedavisinde E vitamininin yararlı etkiler sağladığı belirtilmiştir (57).

#### 3.10.2.4. Glutasyon (GSH)

Glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Hücre içerisinde indirgenmiş formda (GSH) bulunur. Aktif grubu sülfhidril (-SH) grubu olup endojen üretilen peroksidlere karşı okside olarak onları indirger. Glutasyon peroksidaz bu reaksiyonu katalizler:



Bu şekilde okside olan glutasyon, NADPH bağımlı bir reaksiyonla glutasyon redüktaz tarafından tekrar indirgenir:



Glutasyonun etkin olarak hücreyi koruyabilmesi için büyük kısmı redükte halde tutulmalıdır. GSH ayrıca proteinlerdeki -SH gruplarının redükte halde kalmalarını sağlayarak onları oksidasyondan korur. Diyabette GSH düzeylerinin sağlıklı kişilere göre anlamlı şekilde düşük olduğu bildirilmektedir (2).

#### 3.10.2.5. Melatonin

Antioksidan özelliklerinin yanında tümör oluşumunun sınırlandırılması, immun sistemin düzenlenmesi, reproduktif fonksiyonların kontrolü gibi

fonksiyonlara sahip bir hormondur. Yapılan çalışmalarda diyabette artmış oksidatif stresi azalttığı belirtilmektedir. Bilinen en reaktif radikal olan hidroksil radikali ile reaksiyonu sonucu indolil katyon radikali oluşturur. Bu radikal de ortamdaki süperoksid radikalini tutarak etkisizleştirir (62).

#### **3.10.2.6. Lipoik Asid**

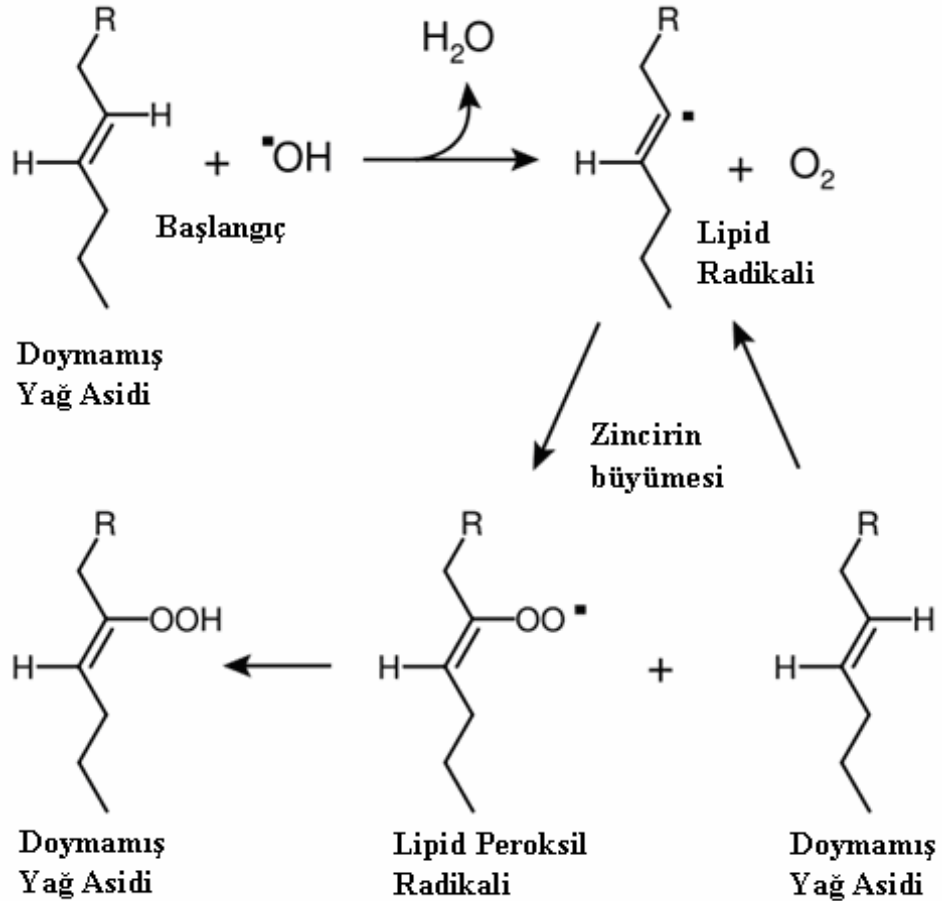
Lipoik asit, hızla absorbe edilmesi, redükte ve okside formlarının antioksidan etki göstermesi, hem su hemde lipid fazlarda çözünmesi, glutatyon düzeylerini artırması, diğer antioksidanlarla pozitif yönde etkileşmesi, metallerle şelat yapması ve serbest radikalleri nötralize etmesi bakımından ideal bir antioksidan olarak kabul edilmektedir (19). Alfa lipoik asid ağır metallerle oluşan zehirlenmelerde detoksifikasyon ajanı olarak kullanılan bir antioksidandır. Antioksidan özelliği kendisinin dihidro lipoik aside indirgenirken, serbest radikalleri temizlemesinden ve de metal iyonlarıyla şelat yapmasından kaynaklanmaktadır. Hücrelerin glukoz kullanımını artırdığı, protein glikasyonu ve AGE oluşumunu önlediği için diyabet tedavisinde de kullanılmaktadır (19).

#### **3.11. Lipid Peroksidasyonu ve Diabetes Mellitus**

Hücrel membranlarda bulunan doymamış fosfolipidler, glikolipidler ve kolesterol hücrel işlemler sonucu oluşan veya iyonize ve non-iyonize radyasyon gibi dış etmenler tarafından üretilmiş olan reaktif oksijen türevleri için oksidan saldırının başlıca hedefleridir. Bu reaksiyonlar hedef hücrelerde yıkıcı sonuçlar doğuran lipid peroksidasyonu işlemini başlatır (56).  $H_2O_2$ 'nin fenton reaksiyonu ile şelat yapan bir metal ( $Fe^{2+}$ ) aracılığı ile indirgenmesi sonucu (HO) açığa çıkar ve bu da doymamış yağ asitlerinden (LH) alilik hidrojenleri alarak peroksidasyonu tetikler. Fosfolipidlerde hedef olan hidrojen atomu sn-2 yağ açıl grubunda bulunan atom iken kolesterolde 7. karbondaki hidrojen en reaktif

atomdur. Yağ asitleri önce hidrojen atomunu kaybeder ve kendi üzerinde bir elektron kalacak şekilde parçalanır ve lipid radikali oluşur. Reaktif oksijen türevlerinin oluşan lipid radikallerine (L $\cdot$ ) eklenmesi ile reaksiyon peroksil radikal (LOO $\cdot$ ) ara ürünleri ile gelişir ve lipid hidroperoksit (LOOH) türleri oluşur (56).

Lipid peroksil radikali diğer doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu devam ettirir ve bu olay zincirleme şekilde devam eder (Şekil 7). Bunların yüksek polariteli ve uzun ömürlü olmaları LOOH'lar daha hassas bölgelere göç etmelerine ve peroksidasyonun yaygınlaşmasına neden olabilirler (56).



Şekil 6. Lipid peroksidasyonunun başlaması ve gelişmesi.

Lipid peroksidasyonunun diyabet komplikasyonlarının gelişmesinde önemli dercede katkı yaptığı bir çok çalışmada vurgulanmıştır (63,66). Lipid peroksidasyonunun bu etkilerinin endojen ve eksojen antioksidanlarla hafifletildiği bildirilmektedir (63).

### **3.12. PON 1 Polimorfizmleri ve Diabetes Mellitus**

PON 1 genetik polimorfizmleri ve enzim aktivitelerinin diyabet ile ilişkilerine çok sayıda çalışmada rastlanmaktadır. Konu ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir çoğunluğunda PON 1 enzim aktivitesinin diyabetik hastalarda kontrollere göre düşük olduğu vurgulanmakla beraber (85) bazı araştırmacılar (84) PON 1 aktivitesinin diyabetiklerde kontrollere göre daha yüksek bulmuştur. Ayrıca deneysel olarak streptozosin ile oluşturulmuş diyabette de PON 1 aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir (123).

Lipoprotein oksidasyonunun diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının gelişmesinde en önemli faktör olduğu bildirilmektedir (73). Diyabetik nöropati (1) ve nefropatisi (76) olan hastalarda düşük PON 1 aktiviteleri olduğu bildirilmiştir. PON 1 enziminin lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkileri, bu etkilerin enzimin geninde bulunan polimorfizmlerden etkilenmesi dolayısı ile diyabet komplikasyonlarının gelişmesi ile PON 1 gen polimorfizmleri arasında önemli ilişkilerin olabileceğini akla getirmektedir. Genin kodlayan bölgesindeki L/M 55 ve Q/R 192 polimorfizmleri enzimin belli substratlara ve lipid peroksidlerine karşı olan aktivitelerinde belirleyici olmaktadır. PON 1 RR 192 ve LL 55 genotiplerinin tip 2 diyabetli hastalarda görülme sıklığının yüksek olduğu bazı çalışmalarda bildirilirken (137,146) bazı çalışmalarda böyle bir ilişki bulunamamıştır (11). LL 55 genotipine sahip diyabetik bireylerde retinopati gelişmesi riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir (86).

PON 1 promotör bölgesinde rastlanan polimorfizmlerin de enzimin aktivitesi, antioksidan kapasitesi ve DM ile ilişkisi olabileceği bildirilmektedir (15). Polimorfizmlerden -907. konumda GG homozigot bireyler retinopati gelişimine karşı korunmuş bulunurken -1074 GG ve -162 AA genotipli bireylerin yüksek mikroalbuminüri riski altında oldukları bulunmuştur (73).

PON 1 enzimi HDL üzerinde bulunur ve HDL ve LDL'leri peroksidasyona karşı korur. Lipid peroksidasyonu tip 2 diyabette komplikasyonların gelişmesine önemli bir katkı sağlar. Diyabette PON 1 enzim aktivitesinin düştüğü kabul edilmektedir. PON 1 geninin kodlayan bölgesinde iki önemli gen polimorfizmi görülmekte ve bu polimorfizmler enzimin lipid peroksidasyona karşı rolünde belirleyici olabilmektedir.

Diyabette vücudun oksidan /antioksidan dengesinin genelde oksidanlar lehine bozulmuş olması oksidatif strese artışa ve komplikasyonların gelişmesinde önemli rol oynar.

Bu çalışmanın amacı; tip 2 diyabetli hastalarda ve kontrol bireylerde PON 1 L/M 55 ve Q/R 192 gen polimorfizminin dağılımını tespit etmek ve bu polimorfizmlerin PON 1 enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmak,

Vücudun enzimatik antioksidan savunma sistemi üyelerinden SOD, CAT ve GSH-Px enzim aktivitelerinin diyabet ve kontrol gruplarındaki düzeylerini ve PON 1 polimorfizmlerinin bu düzeylere etkilerini araştırmak,

Lipid peroksidasyon ölçütü olarak malondialdehid (MDA)'in diyabet ve kontrol gruplarındaki düzeyleri ve PON 1 polimorfizmlerinin MDA düzeyleri üzerine etkilerini araştırmak,

PON 1 polimorfizmlerinin hasta ve kontrol gruplarında plazma lipid düzeyleri üzerine etkilerini araştırmaktır.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

### 4.1. Hasta ve Kontrol Grupları İçin Birey Seçimi

Bu çalışmanın materyali, Fırat Üniversitesi Tıp Merkezi Endokrinoloji polikliniğine başvuran tip 2 diyabet tanısı konmuş olan ve en az iki yıllık diyabet geçmişi bulunan 200 hasta (115K/85 E) ve normal muayene için polikliniğe başvuran diyabetik olmadığı rutin biyokimyasal testlerle tespit edilmiş olan 102 (57 K/45 E) kontrol olmak üzere toplam 302 kişiden sağlandı. Tip 2 diyabet teşhisi Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre konuldu (130).

### 4.2. Örneklerin Hazırlanması

Hasta ve kontrol gruplarından sabah 12 saatlik açlıktan sonra oturur halde venöz kan örnekleri alındı. DNA izolasyonu, plazma ve eritrosit hemolizati hazırlanması için ve HbA1c ölçümü için ayrı ayrı olmak üzere K<sub>3</sub>EDTA içeren tüplere 2 ml kan alındı. PON 1, glukoz, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid ve kolesterol ölçümlerinde kullanılmak üzere serum elde etmek için jelli biyokimya tüpüne 5 ml kan alındı. K<sub>3</sub>EDTA'lı tüpler 3500 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Plazma örnekleri MDA ölçümü yapılması için -80°C'de derin dondurucuda saklandı. DNA izolasyonu için plazmanın son 50-100 µl'si ile birlikte lökosit tabakası toplanıp kullanılıncaya kadar -80°C'de derin dondurucuda saklandı. Dipte kalan ve eritrosit içeren kısım serum fizyolojik ile 3 kez aynı hız ve sürede yıkanarak 4 kat (v/v) oranında distile su ile sulandırılarak hemoliz edildi ve SOD, CAT, GSH-Px tayinleri için kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı.

### 4.3. DNA İzolasyonu ve Genotiplendirme

### **4.3.1. DNA İzolasyonu**

Lökosit örneklerinden ticari bir DNA izolasyon kiti (EZNA Blood DNA Isolation Kit, Omega Bio Tek, katalog no: D3481, ABD) kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen 200 µl DNA solüsyonundan 1 µl PCR karışımında kalıp DNA olarak kullanıldı.

### **4.3.2. L/M 55 ve Q/R 192 Polimorfizmi İçin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve PZR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesimi**

#### **Gereç**

**Primerler, TaqDNA Polimeraz, 10X PCR buffer, MgCl<sub>2</sub>, Agaroz** (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, ABD)

**dNTP'ler** (Larova GmbH, Teltow, Almanya)

**Thermocycler** (ThermoHybaid PCR Express, Hybaid company, Middlesex, İngiltere)

**Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane, Borik asit** (Amresco, Ohio, ABD)

**EDTA.2H<sub>2</sub>O, Ethidium bromide** (Merck, Darmstadt, Almanya)

**100 bp'lik DNA ladder** (Generuler 100 bp DNA ladder SM 0241 Fermentas Life sciences, Glen Burnie, MD, ABD)

**Alw I** (New England Biolabs, Cambridge, İngiltere)

**Hsp 92 II** (Promega, Madison, ABD)

**1XTBE Tamponu:** 21,8 gr Tris, 11.2 gr borik asit ve 1.66 gr EDTA.2H<sub>2</sub>O 2 L distile suda çözülerek hazırlandı.

#### **Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)**

PON 1 geninin L/M 55 polimorfik bölgesini çoğaltmak için **5' GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G 3'** (sense) ve **5' TTT AAT CCA GAG CTA**

**ATG AAA GCC 3'** (antisens) ve PON 1 geninin Q/R 192 polimorfik bölgesini çoğaltmak için **5' TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G 3'** (sense) ve **5' CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC 3'** (antisense) primerleri kullanıldı (74). PZR reaksiyon karışımı yaklaşık 100 ng kalıp DNA, her primerden 0.5 µM, 4 dNTP'den 200 µM, 1 U Taq DNA polimeraz, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 µl 10X PCR tamponu içerecek şekilde 50 µl olarak hazırlanarak thermocyclerda amplifikasyona bırakıldı. Amplifikasyonda bir defa 95 °C'de 4 dakikalık ön denatürasyondan sonra denatürasyon için 95 °C'da 1 dk, bağlanma için 59 °C'de 1 dk, sentez için 72 °C'de 1 dk olacak şekilde 32 döngü gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucu oluşan PZR ürünü 1X TBE tamponu içerisinde hazırlanmış % 2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduktan sonra ethidium bromide (10 mg/ml) ile 30 dk süreyle boyandı ve Ultraviole (UV) transilluminatörde incelenerek sonuçlar gözlemlendi. Oluşan bantların moleküler ağırlığını saptamak amacıyla 100 bp 'lik DNA ladder kullanıldı.

### **RFLP ile Genotiplendirme**

Elektroforez işlemini müteakip Q/R 192 polimorfizmi için 99 bp'lık ve L/M 55 polimorfizmi için 170 bp'lık bantlar veren PZR ürünleri restriksiyon endonükleaz (RE) ile kesim işlemine tabi tutuldu.

Q/R 192 polimorfizmi için 99 bp'lık PZR ürününün RE kesimini gerçekleştirmek amacıyla 25 µl PZR ürünü, 8 U Alw I enzimi, 5 µl 10X NEB tamponu steril distile su ile 50 µl'ye tamamlanarak iyice karıştırılıp 3-5 sn santrifüjlenerek 37 °C'de 8 saatlik inkubasyona bırakıldı. 192. konumda R varlığı Alw I enzimi için kesim noktası oluşturur ve 192 RR homozigot bireylerde kesim sonrası 66 ve 33 bp'lık iki bant görülür. 192. konumda Q varlığında ise Alw I enzimi kesim noktası ortadan kalkmakta ve 192 QQ homozigot bireylerde kesim

sonrası esas ürün olan 99 bp'lık bant görülür. 192 Q/R heterozigot bireylerde ise hem kesilmeyen 99 bp, hem de kesim ürünleri olan 66 ve 33 bp'lık bantlar görülür ve böylece PON 1 192 genotipinin tayininde kullanılır.

L/M 55 polimorfizmi için 170 bp'lık PZR ürününün RE kesimini gerçekleştirmek amacıyla 25 µl PCR ürünü, 8 U Hsp92 II enzimi, 5 µl 10X NEB tamponu, sığır serum albümini (BSA 0.1 µg/µl yoğunluğunda) steril distile su ile 50 µl'ye tamamlanarak iyice karıştırılıp 3-5 sn santrifüjlenerek 37 °C'de 12 saatlik inkubasyona bırakıldı. 55. konumda M varlığı Hsp 92 II enzimi için kesim noktası oluşturur ve 55 MM homozigot bireylerde kesim sonrası 126 ve 44 bp'lık iki bant görülür. 55. konumda I varlığında ise Hsp 92 II enzimi kesim noktası ortadan kalkmakta ve 55 LL homozigot bireylerde kesim sonrası esas ürün olan 170 bp'lık bant görülür. 55 L/M heterozigot bireylerde ise hem kesilmeyen 170 bp, hem de kesim ürünleri olan 126 ve 44 bp'lık bantlar görülür ve böylece PON1 55 genotipinin tayininde kullanılır.

RE işlemine maruz bırakılan ürünler % 3.5'luk agaroz jelde yukarıda bahsedildiği şekilde elektroforeze tabi tutulduktan sonra boyanıp görüntülendi ve Polaroid GelCam ile fotoğraflandı.

#### **4.4. Biyokimyasal Ölçümler**

##### **4.4.1. Glukoz Ölçümü**

Serum glukoz düzeyleri; Randox firması tarafından üretilen glukoz-oksidadaz yöntemine göre geliştirilen ticari kit (Randox Laboratories Ltd., U.K.) kullanılarak OLYMPUS AU-600 otoanalizöründe yapıldı. Bu yöntemde Glukoz, havadaki oksijen varlığında glukoz oksidadaz (GOD) enzimi tarafından enzimatik oksidasyona uğrar ve glikonik asit ile hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) meydana gelir. Oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ise peroksidaz (POD) enzimi ile 4-aminofenazon ve fenol ayıraçları

kullanılarak kırmızı-menekşe renkli bir bileşik olan quinoeimine dönüştürülür. Bu renkli bileşiğin konsantrasyonu kan glukoz konsantrasyonu ile orantılıdır. Glukoz-oksidadaz yöntemi 400 mg/dl glukoz düzeyine kadar lineerdir.

#### **4.4.2. Lipid Ölçümleri**

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin serum lipid düzeylerinin ölçülmesinde Olympus AU 600 (Olympus Optical Co Ltd, Japan) marka klinik kimya otoanalizörü kullanıldı. Serum lipidlerinden; Total Kolesterol (Katalog No: OSR 6116) HDL-Kolesterol (Katalog No: OSR 6187 ), LDL-Kolesterol (Katalog No: OSR 6283) ve Trigliserid (Katalog No: OSR 6133) düzeyleri Olympus marka kitler kullanılarak kit içeriğine uygun enzimatik yöntemler ile ölçüldü.

#### **4.4.3. Glikolize Hemoglobin (HbA1c) Ölçümü**

Glikolize hemoglobin düzeyleri (% HbA1c), K<sub>3</sub>EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinden Roche (Roche Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim, Germany) firmasının ticari kiti kullanılarak HITACHI-911 otoanalizörü ile immunotürbidimetrik olarak tayin edildi. Bu yöntem ile % HbA1c düzeyi 4.8-6.0 normal kabul edilmekte ve 6.0'dan yukarısı patolojik olarak değerlendirilmektedir.

#### **4.5. Serum Paraoksonaz Aktivitesi Ölçümü**

Serum PON 1 aktivite ölçümü Eckerson ve arkadaşlarının (42) yöntemi ile yapıldı.

#### **Prensip**

Paraoksonaz aktivite ölçümü, substrat olarak kullanılan paraoksonun enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Reaksiyon, 1 mol/L NaCl ilaveleri yapılarak NaCl-stimüle paraoksonaz aktiviteleri tespit edilmiştir. PON 1'in enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün 412 nm dalga boyunda Techcomp 8500 II uv/vis (Techcomp, China) spektrofotometre kullanılarak ölçüldü (1, 64).

### **Avıraçlar**

**Paraokson, 4-nitrofenol, Tris-HCl:** Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, ABD

**CaCl<sub>2</sub>, NaCl:** Merck, Darmstadt, Almanya

**Reaksiyon Çözeltisi:** 0.1 M Tris-HCl (pH:8) çözeltisi ile içerisinde 2mM kalsiyum klorür, 2 mM Paraokson ve 1 mM NaCl bulunur.

**Standart Çözeltisi:** 0.1 mM 4-nitrofenol hazırlanır, her deneyde standart çözeltisi olarak kullanılır.

### **Denevin Yapılışı**

Kör, standart ve örnekler aşağıdaki oranlarda hazırlanır.

|                         | Kör   | Örnek | Standart |
|-------------------------|-------|-------|----------|
| Reaksiyon çözeltisi(µl) | 3500  | 3500  | 3500     |
| Serum(µl)               | ..... | 100   | .....    |
| Standart çözelti(µl)    | ..... | ..... | 100      |
| Distile su(µl)          | 100   | ..... | .....    |

İyice karıştırılır, 25 °C sıcaklıktaki su banyosunda 10 dakika bekletilir. Daha sonra spektrofotometrede 412 nm'de 0. 60. ve 120. sn'deki absorbans ölçümleri yapılır ve 1 dakikadaki absorbans farkı belirlenerek ortalaması alınır.

PON1 aktivitesi için 1 Ünite, 1 nmol 4-nitrofenol/ml serum/dk olarak tanımlanmıştır.

### **Faktör Hesaplanması**

$$\text{Faktör} = \frac{\text{Standart konsantrasyonu} \times 10^3 \times 3.6}{\text{Standartın optik dansitesi} \times 0.1}$$

3.6: Spektrofotometri küvetindeki toplam hacim

$10^3$  : Litreye dönüştürmek için kullanılmıştır.

0.1: Örnek serum hacmi

Paraoksonaz için faktör değeri 3813 olarak bulundu.

$U/L = \Delta \text{ Abs} \times 3813$  formülü ile hesaplandı.

#### **4.6. Eritrosit SOD Aktivitesi Ölçümü**

##### **Prensip**

Bu metotta süperoksit dismutaz aktivite ölçümü ksantin-ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalının nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgeyerek renk oluşması esasına dayanır. Bu şekilde üretilen süperoksit radikalının nitroblue tetrazoliumu indirgemesi 560 nm'de maksimum absorbanans veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlanır (151).

Ortamda enzim olmadığı durumda bu indirgenme maksimal olup, koyu mavi bir renk oluşmaktadır. Ortamda SOD varlığında ise enzim süperoksit anyonunu  $H_2O_2$ 'ye çevirmekte böylece NBT indirgenmesi azalmakta ve renk değişikliği meydana gelmemektedir. Renkli formazon oluşumu ortamın enzim konsantrasyonu ile ters orantılı olarak gerçekleşmektedir. Böylece oluşan formazonun 560 nm'de verdiği absorbanstan SOD aktivitesi hesap edilmektedir (151).

##### **Ayırıcılar**

**Na<sub>2</sub>EDTA, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CuCl<sub>2</sub>, Koloroform, Etanol:** Merck, Darmstadt, Almanya

**Nitroblue tetrazolium(NBT), Ksantin, Bovine serum albumine (BSA):** Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, ABD

**Ksantin Oksidaz:** Calbiochem, EMB Biosciences, Lo Jolla, CA, ABD

##### **Ölçüm Reaktifi**

- a) **0.3 mmol/L Ksantin**; 9.13 mg alınıp 200 ml distile suda çözülür.  
Çözme işlemi birkaç damla 1M NaOH ilavesi ve hafif ısıtılarak yapılır.
- b) **0.6 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA**; 23 mg alınıp 100 ml distile suda çözülür.
- c) **150 µmol/L NBT**; 12.3 mg alınıp 100 ml distile suda çözülür.
- d) **400 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>**; 2.54 gr alınıp 60 ml distile suda çözülür.
- e) **1 gr/L Bovine Serum Albumine (BSA)**; 30 mg, 30 ml distile suda çözülür.

Hepsi karıştırılır (toplam 490 ml) koyu renkli şişede +4°C’de saklanır.

**2M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**; 2.64 g Amonyum sülfat tartılır bir miktar distile suda çözülür ve toplam hacim 10ml’e tamamlanır.

**Ksantin Oksidaz (167 U/L)**: 10 U/0.5 ml Ksantin oksidaz stok çözeltiliden 8.3 µl alınıp +4°C’de soğutulmuş 991.7 µl 2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile karıştırılır.

**Kloroform/Etanol (3/5) karışımı**: Üç kısım kloroform 5 kısım etanol ile karıştırılır.

**0.8 mmol/L CuCl<sub>2</sub> çözeltisi**: 13.6 mg CuCl<sub>2</sub> alınıp bir miktar distile suda çözülerek toplam hacim 100 ml’ye tamamlanır.

### Denevin yapılışı

Steril distile su ile beş kat oranında dilüe edilmiş eritrosit hemolizatu eşit hacimde kloroform/etanol ile karıştırıldı, vortekste iyice karıştırıldıktan sonra 4°C’de 3000 rpm’de 45 dakika santrifüje edildi. En üstteki berrak kısım SOD aktivite tayininde kullanılmak üzere reaksiyona şu şekilde bırakıldı:

|                             | Kör (ml) | Örnek (ml) |
|-----------------------------|----------|------------|
| Ölçüm reaktifi              | 2.85     | 2.85       |
| Süpernatant                 | —        | 0.10       |
| Distile su                  | 0.1      | —          |
| Ksantin oksidaz             | 0.05     | 0.05       |
| Toplam reaksiyon hacmi (ml) | 3        | 3          |

25°C’de 20 dakika inkübe edildi. Sürenin sonunda bütün tüplere 1 ml CuCl<sub>2</sub> çözeltisi ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Spektrofotometre 560 nm’de ölçüm reaktifi ile sıfırlanarak kör ve örneklerin absorbanları kaydedildi.

### **Hesaplama**

$$\% \text{ İnhibisyon} = \frac{\text{Absorbans (Kör)} - \text{Absorbans (Örnek)}}{\text{Absorbans(Kör)}} \times 100$$

1 Ünite SOD: NBT indirgenmesini % 50 inhibe eden enzim aktivitesidir.

$$\text{Ü/ml SOD} = \frac{\% \text{ İnhibisyon}}{50} \times 2 \times 10 \text{ (dilasyon faktörleri)}$$

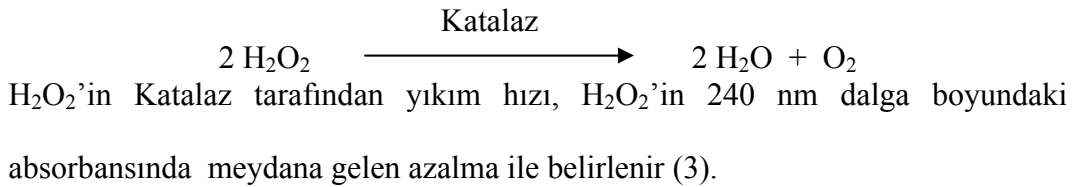
Gram hemoglobin başına SOD aktivitesi, spesifik aktiviteyi verir ve;

$$\text{Ü / gr Hbml}^{-1} = \frac{\text{Ü/ml SOD}}{\text{gr / Hbml}^{-1}} \text{ formülü ile bulunur.}$$

### **4.7. Eritrosit Katalaz Aktivitesi Ölçümü**

#### **Prensip**

Katalaz enzimi H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>’i yıkarak H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>’e dönüşümünü katalize eder.



#### **Avıraçlar**

**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>:** Merck, Darmstadt, Almanya

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, ABD

**50 mM Fosfat Tamponu ( pH: 7.0):** 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>’tan 600 ml ile 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>’tan 400 ml karıştırılır.

**30 mM Hidrojen Peroksit:** 0.34 ml %30’luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fosfat tamponu ile 100 ml’ye tamamlanır.

### Denevin Yapılışı

|                               | Kör (ml) | Örnek (ml) |
|-------------------------------|----------|------------|
| Fosfat tamponu                | 1        | -          |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | -        | 1          |
| Örnek                         | 2        | 2          |

Reaksiyonun başlaması ile absorbanstaki düşüş 0., 30., 60., 90. ve 120. saniyede kaydedilip bir 30 sn'lik absorban azalması esas alınarak hesaplandı.

$$k/sn = k \times sn^{-1} = \frac{\text{Log} \frac{A_1}{A_2} \times 2.31}{30}$$

$$k/gr \text{ Hbml}^{-1} = \frac{k \times sn^{-1}}{gr \text{ Hb ml}^{-1}}$$

k: katal; katalitik aktivite birimi

A1: Başlangıçtaki absorban

A2: 30 sn sonundaki absorban

### **4.8. Eritrosit GSH-Px Aktivitesi Ölçümü**

Eritrosit GSH-Px aktivitesi ölçümü için OxixResearch, CA, ABD firmasının BIOXYTECH GPx-340 (Katalog no: 21017) kiti kullanıldı.

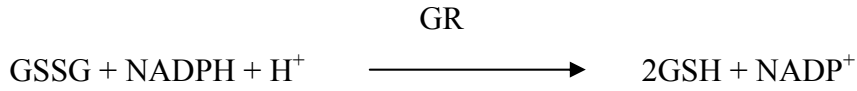
### Prensip

GSH-Px, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vasıtasıyla redükte glutatyonun (GSH), okside glutatyona (GSSG) oksidasyonunu katalize eder.



Burada R-O-O-H bir hidroperoksit olup, t-bütil hidroperoksit (t-BOOH) enzim analizi için en uygun substrattır. GSSG'nin oluşum oranı, glutatyon redüktaz (GR) reaksiyonu vasıtasıyla ölçülür.

GSSG, GR vasıtası ile yine eski indirgenmiş haline döner:



Bu reaksiyonda NADPH'nin okside olup NADP<sup>+</sup>'ya yükseltgenmesi esnasında 340 nm'deki absorbansta düşüş meydana gelecektir ve 1 dakikalık değerler kullanılarak bir örnekteki GSH-Px değeri hesaplanabilir (121).

### **Hesaplama**

Kit ayıraçları tarif edildiği şekilde karıştırılıp 340 nm'ye ayarlı spektrofotometrede 0., 60., 120. ve 180. saniyedeki absorbanları ölçüldü ortalamalar alınarak 1 dakika başına absorbansta görülen düşüş bulundu. Bu absorban düşüşü tüketilen NADPH miktarı ile doğru orantılıdır. Örnekten kaynaklanan net düşüş örnek yerine su kullanılarak yapılan kör ölçüm değerinin çıkarılması ile bulunur.

Absorbanstaki düşüşü tüketilen NADPH miktarına çevirmek için:

$$1\text{mU/mL} = 1 \text{ nmol NADPH} / \text{dk} / \text{mL} = (A_{340}/\text{dk}) / 0.00622$$

Bulunan değer dilüsyon katsayısı ile çarpılır, bulunan sonuç ml'deki Hb miktarına bölünerek mU/gHbml<sup>-1</sup> olarak ifade edilir.

$$\text{mU/ grHb} = \frac{\text{Abs X dk}^{-1} \text{ X 16}}{0.00622 \text{ gr Hb/ml}}$$

16: Dilüsyon faktörü

0.00622: 340 nm'de NADPH için ekstinksiyon katsayısı

### **4.9. Hemoglobin Ölçümü**

Eritrosit hemolizatlarından Drabkin yöntemi ile siyanomethemoglobin oluşumuna dayanan metod ile ölçülmüştür (44).

### Prensip

Ferrisiyanür hemoglobindeki  $Fe^{2+}$ 'yi  $Fe^{3+}$ 'ya dönüştürerek methemoglobine dönüşmesini sağlar ve bunu takiben KCN ile siyanmethemoglobin meydana gelir. Oluşan siyanmethemoglobinin sebep olduğu absorban farkının 546 nm'de okunması ile Hb miktarı tespit edilmiş olur.

### Avıraçlar

**KCN,  $K_3Fe(CN)_6$ ,  $NaHCO_3$ :** Merck, Darmsatdt, Almanya

**Hemoglobin standardı:** Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, ABD

**Drabkin Çözeltisi:** 50 mg KCN, 200 mg  $K_3Fe(CN)_6$  ve 1 g  $NaHCO_3$  tartılarak bir miktar distile suda çözülür ve 1 litreye tamamlanır. Koyu şişede 1 yıl dayanır.

**Hb Standardı:** 18 gr liyofilize Hb standardı 100 ml distile suda çözülür. Bu standart 18 gr/dl Hb içerir.

### Denevin Yapılışı

|                      | Kör (ml) | Standart (ml) | Örnek (ml) |
|----------------------|----------|---------------|------------|
| Drabkin Çözeltisi    | 5.0      | 5.0           | 5.0        |
| Hemoglobin Standardı | —        | 0.02          | —          |
| Hemolizat            | —        | —             | 0.02       |
| Distile su           | 0.02     | —             | —          |

Tüpler iyice karıştırılır. Oda ısısında 20 dakika bekletilir. 546 nm'de köre karşı diğer tüplerin absorbanları okunur.

### Hesaplama

$$Hb \text{ ( gr/dL)} = \frac{\text{Örnek Absorbansı}}{\text{Standart Absorbansı}} \times \text{standart Kons. (18gr/dL)}$$

#### **4.10. Plazma MDA Ölçümü**

Plazmada lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA ölçümü Satoh (142) ve Yagi'den (165) modifiye edilen yöntemle göre spektrofotometrik olarak Techcomp 8500 II UV-VIS spektrofotometresi kullanılarak yapıldı.

##### **Prensip**

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu MDA oluşur. Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile aerobik şartlarda pH 3.4'de 95 °C'de reaksiyona girerek pembe renkli bir kompleks oluşturur. Pembe renk oluşumu 532 nm'de ölçülür.

##### **Ayırıcılar**

**Glasiyel asetik asit,:** Merck, Darmstadt, Almanya

**n-Butanol:** Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, ABD

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:** Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, ABD

**1,1,3,3-Tetraetoksipropan (TEP) standardı (1000nmol/ml), Fosfotungustik asit (PTA), Tiyobarbitürik asit (TBA):** Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, ABD

**0,084 N ( N/12) Sülfürik asit (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>):** 0.23 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 ml'ye tamamlanır.

**% 10 Fosfotungustik asit (PTA):** 10 g PTA 100 ml distile suda çözülür.

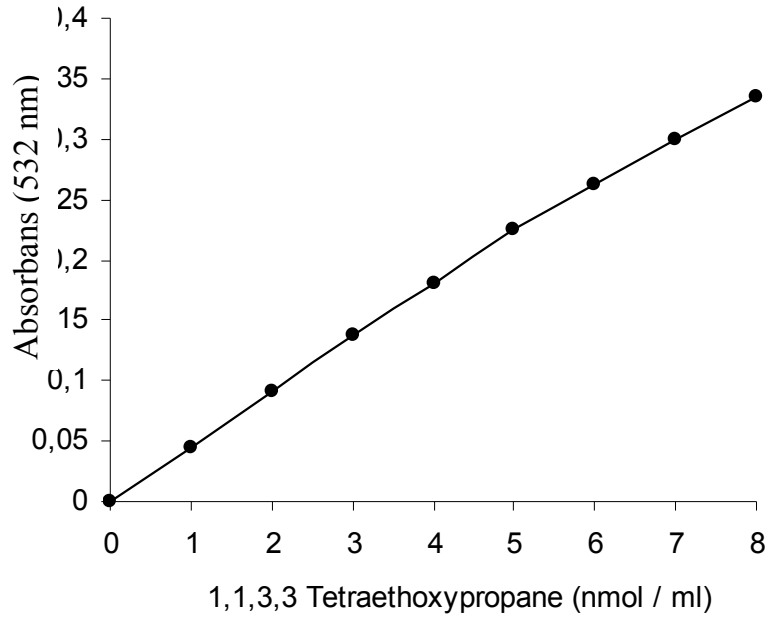
**Tiyobarbitürik asit (TBA) ayıracı:** 0.67 g TBA 50 ml distile suda çözülür ve 50 ml glasiyel asetik asit eklenerek 100 ml'ye tamamlanır. Ayırıcı günlük hazırlanır.

##### **Standard Eğri Çizimi**

Standarttan dilüsyon yapılarak 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 nmol/ml yoğunlukta çalışma standartları hazırlandı. Hazırlanan standartlar tüplere aşağıdaki miktarlarda kondu:

|                            | Kör | Std 1 | Std 2 | Std 3 | Std 4 | Std 5 | Std 6 | Std 7 | Std 8 |
|----------------------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Distile su (ml)            | 4   | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     | 3     |
| TBA ayıracağı (ml)         | 1   | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| Standart (ml)              | -   | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     | 1     |
| Std yoğunlukları (nmol/ml) |     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     |

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra ağızları cam bilye ile kapatılarak 95 °C'de 60 dakika kaynamaya bırakıldı. Kaynama bittikten sonra tüpler soğutuldu ve her tüpe 3 ml n-butanol ilave edildikten sonra vorteksle karıştırıldı ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Standartların n-butanol fazı körün n-butanol fazına karşı 532 nm'de okundu ve çıkan değerlerden aşağıdaki eğri çizildi. Örnekler için bu eğri kullanılarak MDA düzeyleri belirlendi.



Şekil 7. MDA standart grafiği.

### **Denevin Yapılışı**

Ayıracılar tüplere şu miktarlarda konuldu:

|  | Kör | Standart | Örnek |
|--|-----|----------|-------|
| Plazma(ml)                               | -   | -        | 0.3   |
| N/12 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml) | -   | -        | 2.4   |
| %10 PTA(ml)                              | -   | -        | 0.3   |

İyice karıştırılıp oda ısısında 5 dk bekletildikten sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak altta kalan çökeltinin üzerine 3 ml distile su ilave edilerek vortekste karıştırıldı, tekrar aynı şekilde santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırıldı. Kör ve standart tüpleri ile birlikte örnek tüplerde dipte kalan çökeltinin üzerine aşağıdaki karışımlar ilave edildi:

|                 | Kör | Standart | Örnek |
|-----------------|-----|----------|-------|
| Distile su(ml)  | 4   | 3        | 4     |
| TBA ayıracı(ml) | 1   | 1        | 1     |
| Standart (ml)   | -   | 1        | -     |
| Toplam(ml)      | 5   | 5        | 5     |

Vortekste karıştırılıp üstüne cam bilyeler konulan tüpler 95 °C'de 60 dakika tutuldu. Çeşme altında soğutulduktan sonra her tüpe 3 ml n-butanol eklenerek karıştırıldı ve 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Üst faz alınarak 532 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu.

### **Hesaplama**

Standart değerleri kullanılarak örneklerden okunan absorbans değerleri şu formülle hesaplandı:

Örnek Absorbansı

Örnek MDA (nmol/ml) = \_\_\_\_\_ X Std. Yoğunluğu

Standart Absorbansı

#### **4.11. Biyoistatistiksel Analizler**

Çalışmadan elde edilen sonuçların biyoistatistiksel değerlendirmesi için SPSS 12.0 paket programı kullanıldı. Biyokimyasal parametrelerin kontrol ve hasta grupları arasında karşılaştırılmasında Student's t testi kullanılmıştır. Genotipler arasındaki değişkenlerin değerlendirilmesi ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. PON genotipleri ile allellerinin görülme sıklığının ve gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde  $\chi^2$  testi kullanılmıştır.  $p < 0.05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 5. BULGULAR

### 5.1. Kontrol ve DM Grubunu Oluşturan Bireylerin Genel Özellikleri

Çalışmadaki bireylerin seçimi kontrol ve diyabet gruplarının cinsiyet oranları ve yaş ortalamaları arasında önemli bir fark olmayacak şekilde yapıldı. Kontrol grubundaki bireylerin cinsiyete bağımlı değişimi % 55.9 kadın ve % 44.1 erkek olarak bulunmuştur. Diyabetli hastaların kadın ve erkek oranları ise; % 57.5 ve % 42.5 olarak bulundu ve cinsiyete bağımlı olarak ve gruplar arasında önemli bir fark görülmedi ( $p>0.05$ ). Yaş ortalaması kontrol grubunda  $52.07\pm 7.65$ , diyabet grubunda  $53.57\pm 10.12$  bulundu ve gruplar arasında önemli bir fark görülmedi ( $p>0.05$ ). Açlık kan şekeri düzeyi kontrol grubunda  $97.10\pm 9.62$  mg/dL, tip 2 diyabet hastalarında  $202.18\pm 67.80$  mg/dL olarak bulunmuş olup gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p<0.001$ ). HbA1c oranları kontrol grubunda  $5.50\pm 1.51$  iken tip 2 diyabet hastalarında  $9.19\pm 2.08$  olarak bulundu. Vücut kitle indeksi kontrol grubunda  $24.08\pm 2.33$  iken tip 2 diyabet hastalarında  $29.58\pm 4.12$  olarak belirlendi. HbA1c ve vücut kitle indeksi bakımından gruplar arasındaki farklılık önemli bulundu ( $p<0.001$ ). Kontrol grubu ve tip 2 diyabet hastalarında sistolik kan basıncı sırası ile  $122.54\pm 11.40$  ve  $138.60\pm 18.56$  ( $p<0.001$ ), diastolik kan basıncı ise  $72.35\pm 6.91$  ve  $80.45\pm 10.81$  ( $p<0.01$ ) olarak bulundu.

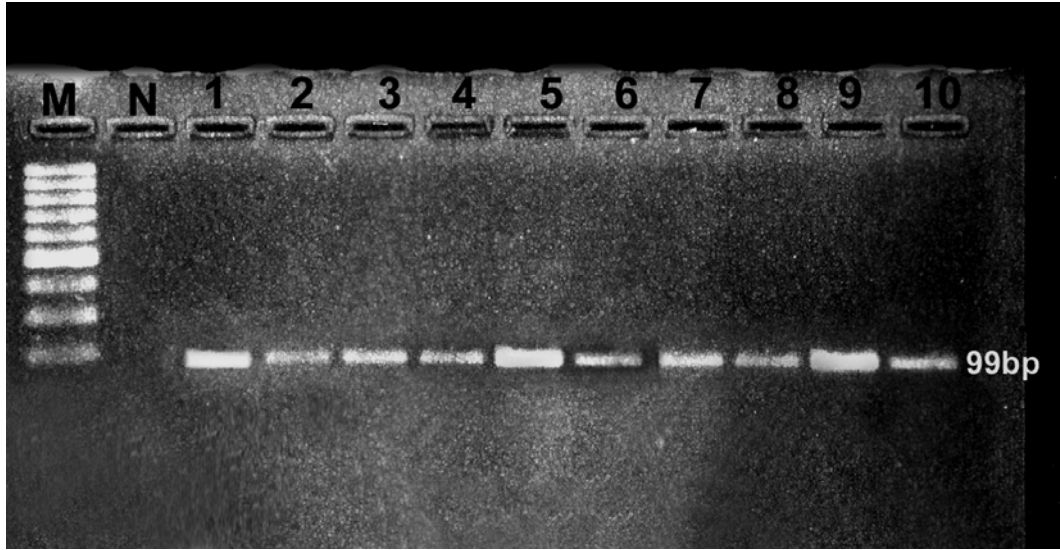
**Tablo II.** Kontrol ve Tip 2 diyabetli (DM) hasta gruplarının klinik ve biyokimyasal değerleri.

|  | <b>Kontrol</b> | <b>DM</b>     | <b>Önemlilik (p)</b> |
|--|----------------|---------------|----------------------|
| <b>n(Kadın/Erkek)</b>                        | 102(57/45)     | 200(115/85)   | AD                   |
| <b>Yaş (yıl)</b>                             | 52.07±7.65     | 53.57±10.12   | AD                   |
| <b>AKŞ (mg/dL)</b>                           | 97.10±9.62     | 202.18±67.80  | <0.001               |
| <b>Diyabet süresi (yıl)</b>                  | -              | 6.48±4.26     | -                    |
| <b>HbA1c (%)</b>                             | 5.50±1.51      | 9.19±2.08     | <0.001               |
| <b>HDL-kolesterol (mg/dL)</b>                | 44.67±7.27     | 43.46±11.65   | AD                   |
| <b>LDL-kolesterol (mg/dL)</b>                | 120.32±25.23   | 135.27±37.12  | <0.001               |
| <b>T- kolesterol (mg/dL)</b>                 | 171.95±35.32   | 207.60±59.80  | <0.001               |
| <b>Trigliserid (mg/dL)</b>                   | 141.17±41.68   | 175.64±92.50  | <0.001               |
| <b>SKB (mmHg)</b>                            | 122.54±11.40   | 138.60±18.56  | <0.001               |
| <b>DKB (mmHg)</b>                            | 72.35±6.91     | 80.45±10.81   | <0.01                |
| <b>VKİ (kg/m<sup>2</sup>)</b>                | 24.08±2.33     | 29.58±4.12    | <0.001               |
| <b>Serum PON 1 aktivitesi (U/L)</b>          | 544.92±302.52  | 500.87±328.58 | AD                   |
| <b>Eritrosit SOD aktivitesi (U/grHb)</b>     | 408.79±85.42   | 396.90±65.20  | AD                   |
| <b>Eritrosit Katalaz aktivitesi (k/grHb)</b> | 414.64±89.55   | 384.01±90.40  | <0.05                |
| <b>Eritrosit GSH-Px aktivitesi (mU/grHb)</b> | 251.10±53.65   | 193.39±50.91  | <0.01                |
| <b>Plazma MDA (nmol/ml)</b>                  | 4.66±0.96      | 6.34±1.65     | <0.001               |

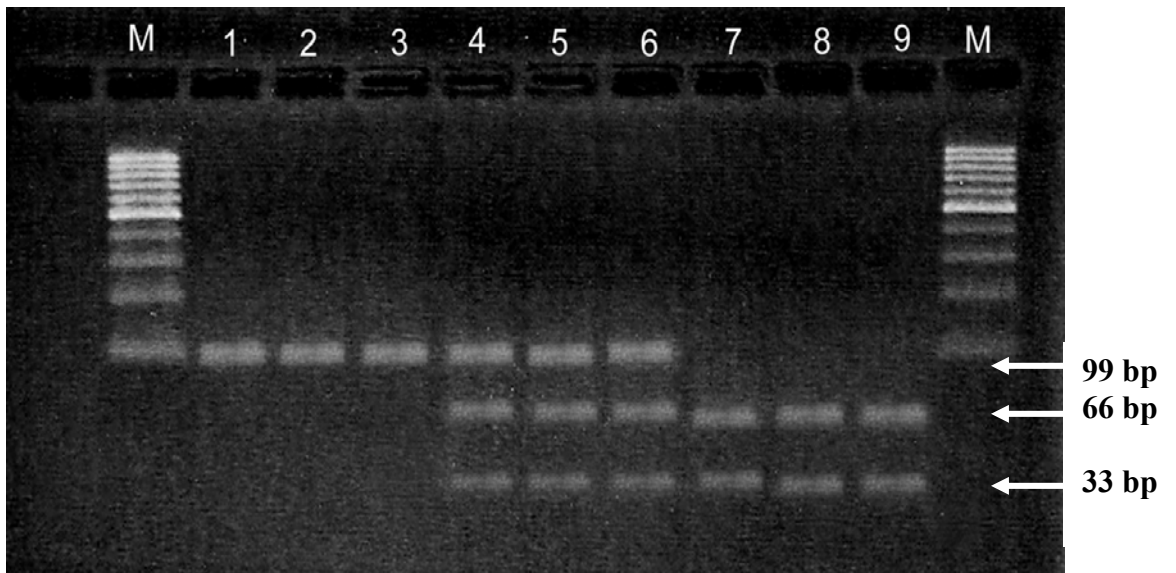
**AD: İstatistiksel olarak anlamlı değil.**

## 5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve RFLP ile Genotiplendirme

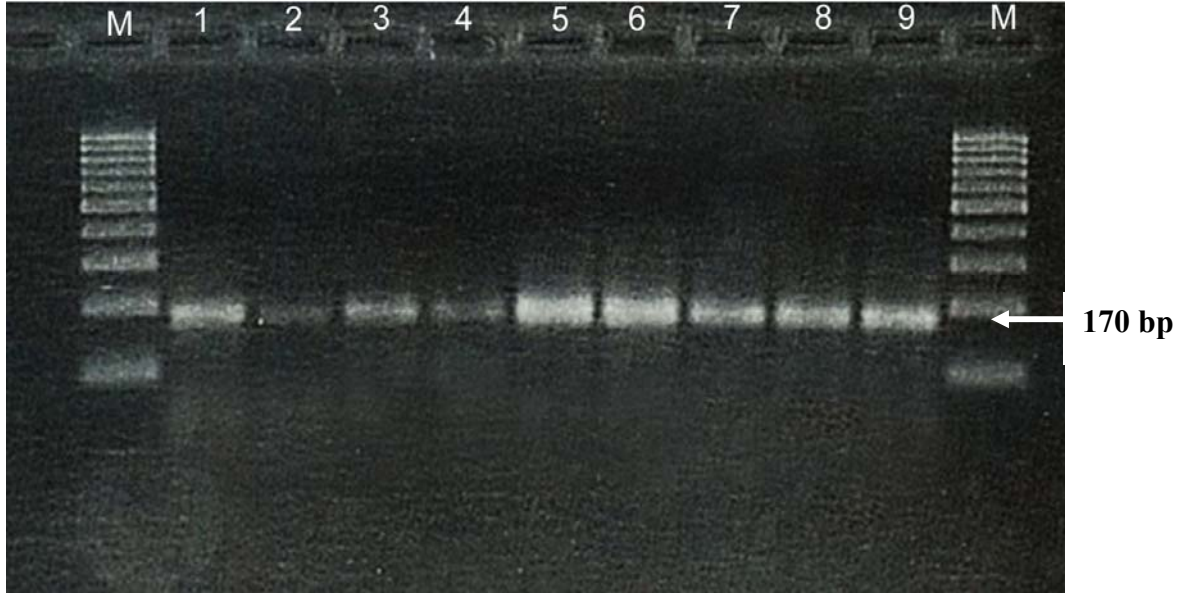
### Bulguları



**Şekil 8a.** Lökositlerden izole edilen DNA'lardan Q/R 192 polimorfik bölgesine spesifik primerler kullanılarak elde edilen PZR ürününün ethidium bromide ile boyanmış % 3,5'luk agaroz jelin ultraviyole transilluminatördeki görüntüsü. M: DNA ladder (100bp), N: Negatif kontrol, 1-10. sıralar: 99 bp'lik PZR ürünleri.



**Şekil 8b.** Q/R polimorfik bölgesine spesifik primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününün Alw I restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası ethidium bromide ile boyanmış % 3,5'luk agaroz jelin ultraviyole transilluminatördeki görüntüsü. M: DNA ladder (100bp), 1-3. sıralar: 99 bp'lik Alw I enziminin kesim noktası içermeyen (Q/Q 192 homozigot bireyler) örnekler, 4-6. sıralar: Alw I restriksiyon enziminin kısmen kestiği (Q/R heterozigot bireyler) örnekler, 7-9. sıralar: Alw I restriksiyon enziminin tamamen kestiği (R/R homozigot bireyler) örnekler.



**Şekil 9a.** Lökositlerden izole edilen DNA'lardan L/M 55 polimorfik bölgesine spesifik primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününün ethidium bromide ile boyanmış % 3,5'luk agaroz jelin ultraviyole transilluminatördeki görüntüsü. M: DNA ladder (100bp), 1-10. sıralar: 170 bp'lik PCR ürünleri.



**Şekil 9b.** L/M 55 polimorfik bölgesine spesifik primerler kullanılarak elde edilen PCR ürününün Hsp92 II restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası ethidium bromide ile boyanmış % 3,5'luk agaroz jelin ultraviyole transilluminatördeki görüntüsü. M: DNA ladder (100bp), 1,4,5,7,8,12,14,15 ve 17. sıralar: 170 bp'lik Hsp92 II enziminin kesim noktası içermeyen (L/L 55 homozigot bireyler) örnekler, 2,3,10,11 ve 16. sıralar: Hsp92 II enziminin kısmen kestiği (L/M heterozigot bireyler) örnekler, 6,9 ve 13.sıralar: Hsp92 II restriksiyon enziminin tamamen kestiği (M/M homozigot bireyler) örnekler.

### **5.3. PON 1 Q/R 192 ve L/M 55 Genotip Dağılımı ile Q/R ve L/M Allel Sıklığının Kontrol ve DM Gruplarındaki Dağılımları**

#### **5.3.1. PON 1 Q/R 192 Genotip Dağılımı ve Q/R Allel Sıklığı**

Kontrol grubu ve tip 2 diyabetli hastaların oluşturduğu DM grubunun PON 1 Q/R 192 genotip dağılımı ile Q ve R alel sıklığı Tablo 3'te gösterilmiştir. Kontrol grubunda QQ, QR ve RR genotip sıklığı sırası ile % 44.1, % 45.1 ve % 10.8 iken DM grubunda bu oranlar sırası ile % 47.5, % 40.5 ve %12 olarak bulundu. QQ ve RR genotipleri DM grubunda daha sık görülürken QR genotipi kontrol grubunda daha sık görüldü ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ). Kontrol grubunda Q alleli % 66.6, R alleli %33.4 oranlarında bulunurken DM grubunda Q alleli %67.7, M alleli %32.3 oranında bulundu. Her iki grupta en sık bulunan allel Q alleli olup Q ve R allel sıklığı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ ).

#### **5.3.2. PON 1 L/M 55 Genotip Dağılımı ve L/M Allel Sıklığı**

Kontrol grubu ve tip 2 diyabetli hastaların oluşturduğu DM grubunun PON 1 L/M 55 genotip dağılımı ile L ve M allel sıklığı Tablo 3'te gösterilmiştir. Kontrol grubunda LL, LM ve MM genotip sıklığı sırası ile % 42.2, % 44.1 ve % 13.7 iken DM grubunda bu oranlar sırası ile %39.5, %48 ve %12.5 olarak bulundu. Her iki grupta da en sık görülen genotip LM genotipi olup kontrol grubuna göre DM grubunda daha fazla görüldü ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ). LL ve MM genotipleri, DM grubuna göre kontrol grubunda daha sık bulunurken bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ). Kontrol grubunda L alleli % 64.2, M alleli %35.8 oranlarında bulunurken DM grubunda L alleli %63.5, M alleli %36.5 oranında bulundu. Her

iki grupta en sık bulunan allel L alleli olup L ve M allel sıklığı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ ).

**Tablo III.** Kontrol ve DM Gruplarında PON 1 Q/R 192 ve L/M 55 Genotip Dağılımı ve Q/R ve L/M Allel Sıklığı.

|                                 | <b>Kontrol</b> | <b>DM</b>    | <b><i>p</i></b> |
|---------------------------------|----------------|--------------|-----------------|
| <b>Q/R 192 Genotip dağılımı</b> |                |              |                 |
| <b>QQ</b>                       | 45(%44.1)      | 95(%47.5)    | <b>AD</b>       |
| <b>QR</b>                       | 46(%45.1)      | 81(%40.5)    | <b>AD</b>       |
| <b>RR</b>                       | 11(%10.8)      | 24(%12)      | <b>AD</b>       |
| <b>Allel sıklığı</b>            |                |              |                 |
| <b>Q</b>                        | 136(%66.6)     | 271(%67.7)   | <b>AD</b>       |
| <b>R</b>                        | 68(%33.4)      | 129(%32.3)   | <b>AD</b>       |
| <b>L/M 55 Genotip dağılımı</b>  |                |              |                 |
| <b>LL</b>                       | 43 (% 42.2)    | 79 (% 39.5)  | <b>AD</b>       |
| <b>LM</b>                       | 45 (% 44.1)    | 96 (% 48)    | <b>AD</b>       |
| <b>MM</b>                       | 14 (% 13.7)    | 25 (% 12.5)  | <b>AD</b>       |
| <b>Allel sıklığı</b>            |                |              |                 |
| <b>L</b>                        | 131 (% 64.2)   | 254 (% 63.5) | <b>AD</b>       |
| <b>M</b>                        | 73 (% 35.8)    | 146 (% 36.5) | <b>AD</b>       |

**AD: İstatistiksel olarak anlamlı değil.**

**Tablo IVa.** Kontrol ve DM gruplarının PON 1, SOD, CAT, GSH-Px Enzim Aktiviteleri, MDA Düzeyleri ve Lipid Profillerinin PON 1 Q/R 192 Genotiplerine Göre Dağılımı

| Q/R 192 Genotipi        | Kontrol Grubu                  |                               |                             | DM Grubu                     |                 |                 |
|-------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|
|                         | QQ                             | QR                            | RR                          | QQ                           | QR              | RR              |
| PON 1 (Ü/L)             | 414.22±188.48 <sup>a,b</sup>   | 539.69± 249.87 <sup>b,g</sup> | 1101.45 ± 263.43            | 413.65 ± 269.88 <sup>k</sup> | 443.23 ± 228.23 | 1040.60± 328.89 |
| SOD (Ü/grHb)            | 402.68 ± 43.91                 | 405.58 ± 83.55                | 447.18 ± 178.79             | 393.63 ± 65.82               | 399.50 ± 67.02  | 401.04 ± 58.06  |
| Katalaz (k/grHb)        | 401.40 ± 54.30                 | 418.17 ± 71.73 <sup>g</sup>   | 454.09 ± 205.71             | 380.28 ± 88.61               | 386.85 ± 92.47  | 389.16 ± 93.57  |
| GSH-Px (mÜ/grHb)        | 267.33± 46.35 <sup>c,d,e</sup> | 240.34 ± 51.72 <sup>h</sup>   | 229.72 ± 73.22              | 197.15 ± 52.00               | 186.83 ± 49.19  | 200.62 ± 51.92  |
| MDA (nmol/ml)           | 4.52± 0.87 <sup>e</sup>        | 4.78± 0.98 <sup>h</sup>       | 4.71± 1.24                  | 6.33± 1.90                   | 6.48 ± 1.33     | 5.90 ± 1.53     |
| HDL-kolesterol (mg /dL) | 44.44 ± 8.75                   | 45.43 ± 6.02                  | 42.45 ± 5.10                | 43.61 ± 8.70                 | 43.56 ± 14.59   | 42.50 ± 11.11   |
| LDL-kolesterol (mg /dL) | 117.31 ± 25.38 <sup>f</sup>    | 121.89 ± 25.93 <sup>i</sup>   | 126.09 ± 21.97              | 134.13 ± 36.18               | 138.30 ± 39.76  | 129.50 ± 31.59  |
| Kolesterol (mg /dL)     | 169.31 ± 33.46 <sup>f</sup>    | 174.54 ± 35.88 <sup>h</sup>   | 171.90 ± 42.60 <sup>j</sup> | 205.44 ± 58.65               | 210.34 ± 63.30  | 206.87 ± 53.82  |
| Trigliserid(mg /dL)     | 132.97 ± 31.93 <sup>e</sup>    | 149.32 ± 49.44 <sup>i</sup>   | 140.63 ± 38.08              | 170.95 ± 69.03               | 186.79 ± 111.84 | 156.54 ± 100.68 |

<sup>a</sup>P<0.01, kontrol grubunda QR ile karşılaştırıldığında  
<sup>c</sup>P<0.05, kontrol grubunda QR ile karşılaştırıldığında  
<sup>e</sup>P<0.0001, DM grubunda QQ ile karşılaştırıldığında  
<sup>g</sup>P<0.05, DM grubunda QR ile karşılaştırıldığında  
<sup>i</sup>P<0.01, DM grubunda QR ile karşılaştırıldığında  
<sup>k</sup>P<0.0001, DM grubunda RR ile karşılaştırıldığında

<sup>b</sup>P<0.0001, kontrol grubunda RR ile karşılaştırıldığında  
<sup>d</sup>P<0.05, kontrol grubunda RR ile karşılaştırıldığında  
<sup>f</sup>P<0.01, DM grubunda QQ ile karşılaştırıldığında  
<sup>h</sup>P<0.0001, DM grubunda QR ile karşılaştırıldığında  
<sup>j</sup>P<0.05, DM grubunda RR ile karşılaştırıldığında

**Tablo IVb.** Kontrol ve DM gruplarının PON 1, SOD, CAT, GSH-Px Enzim Aktiviteleri, MDA Düzeyleri ve Lipid Profillerinin PON 1 L/M 55 Genotiplerine Göre Dağılımı

| L/M Genotipi            | Kontrol Grubu               |                              |                           | DM Grubu                     |                            |               |
|-------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------------|---------------|
|                         | LL                          | LM                           | MM                        | LL                           | LM                         | MM            |
| PON 1 (Ü/L)             | 605.14±272.86 <sup>a</sup>  | 581.22±321.06 <sup>a,g</sup> | 242.57±81.13              | 601.50±351.33 <sup>k,l</sup> | 476.39±299.74 <sup>l</sup> | 276.84±224.58 |
| SOD (Ü/grHb)            | 414.90±114.54               | 400.15±55.54                 | 417.78±58.30              | 396.81±71.01                 | 399.23±62.73               | 388.20±56.45  |
| Katalaz (k/grHb)        | 427.04±112.58               | 406.84±70.63                 | 401.64±59.78              | 394.08±88.92                 | 380.77±87.81               | 364.60±103.77 |
| GSH-Px (mÜ/grHb)        | 243.90±55.28 <sup>b,d</sup> | 248.91±55.60 <sup>h</sup>    | 280.28±30.35 <sup>l</sup> | 197.74±52.17                 | 190.20±51.93               | 191.88±43.21  |
| MDA (nmol/ml)           | 4.45±0.77 <sup>c,d</sup>    | 4.66±1.08 <sup>b,h</sup>     | 5.31±0.83 <sup>l</sup>    | 6.14±1.63 <sup>j</sup>       | 6.25±1.67 <sup>l</sup>     | 7.28±1.29     |
| HDL-kolesterol (mg/ dL) | 45.55±7.97                  | 44.88±7.12                   | 41.28±4.35                | 43.82±15.26                  | 44.26±8.79                 | 39.24±6.48    |
| LDL-kolesterol (mg /dL) | 116.16±23.50                | 121.06±28.66                 | 130.71±14.36              | 135.29±38.72                 | 134.94±35.09               | 136.44±40.89  |
| Kolesterol (mg /dL)     | 173.58±38.42 <sup>f</sup>   | 168.22±34.05 <sup>k</sup>    | 178.92±29.80 <sup>j</sup> | 199.68±56.89                 | 210.37±61.26               | 221.96±61.86  |
| Trigliserit (mg/dL)     | 145.90±45.00 <sup>e</sup>   | 131.42±29.49 <sup>b,h</sup>  | 158.00±57.48              | 176.10±82.45                 | 171.56±91.62               | 189.84±123.86 |

<sup>a</sup>P<0.0001, kontrol grubunda MM ile karşılaştırıldığında,

<sup>c</sup>P<0.01, kontrol grubunda MM ile karşılaştırıldığında

<sup>e</sup>P<0.001, DM grubunda LL ile karşılaştırıldığında

<sup>g</sup>P<0.05, DM grubunda LM ile karşılaştırıldığında

<sup>l</sup>P<0.0001, DM grubunda MM ile karşılaştırıldığında

<sup>k</sup>P<0.01, DM grubunda LM ile karşılaştırıldığında

<sup>b</sup>P<0.05, kontrol grubunda MM ile karşılaştırıldığında,

<sup>d</sup>P<0.0001, DM grubunda LL ile karşılaştırıldığında,

<sup>f</sup>P<0.01, DM grubunda LL ile karşılaştırıldığında

<sup>h</sup>P<0.0001, DM grubunda LM ile karşılaştırıldığında

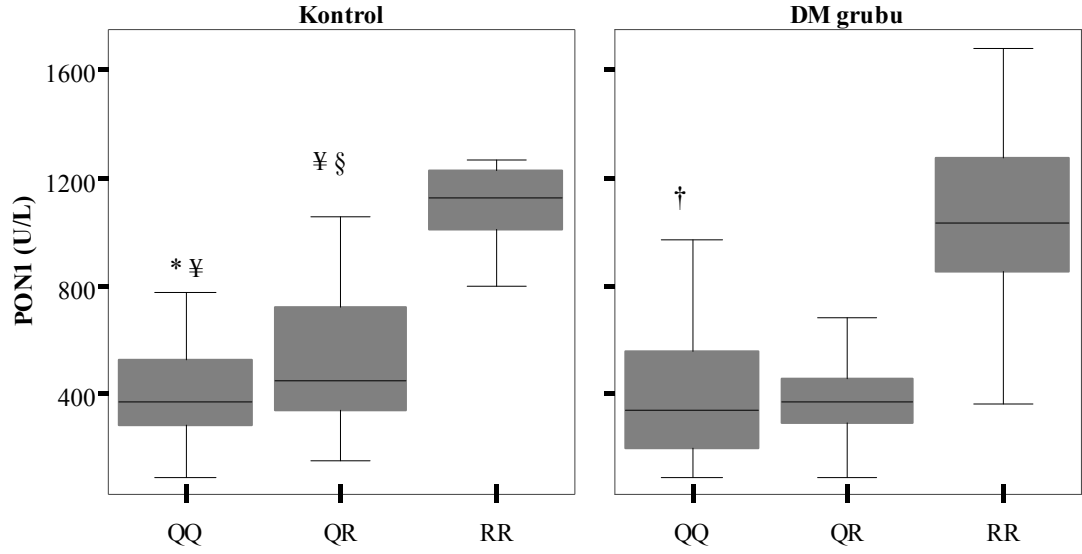
<sup>j</sup>P<0.01, DM grubunda MM ile karşılaştırıldığında

<sup>l</sup>P<0.05, DM grubunda MM ile karşılaştırıldığında

#### 5.4. Serum PON 1 Aktiviteleri

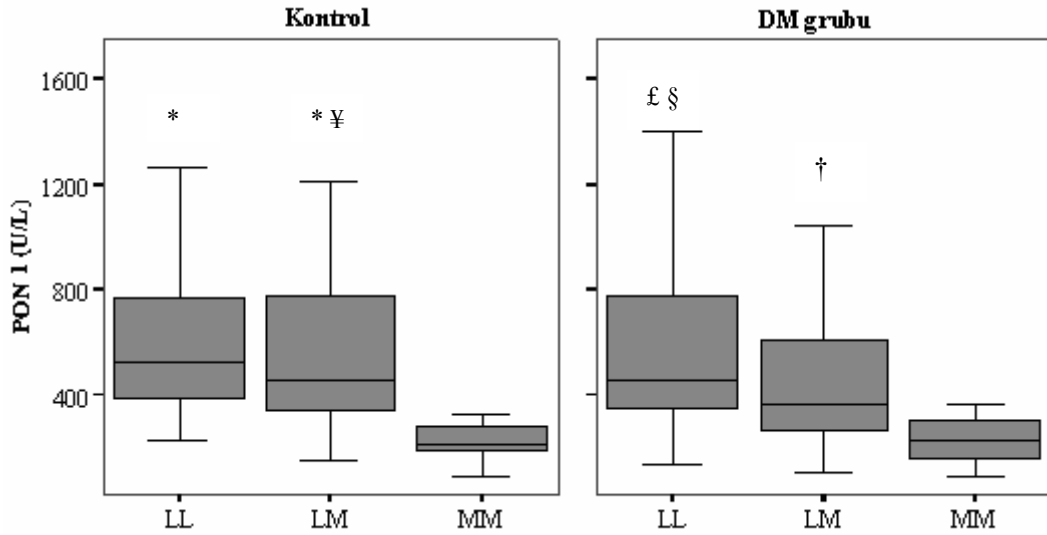
Serum PON 1 aktiviteleri kontrol grubunda ( $544.92 \pm 302.52$  U/L) DM grubunda ( $500.87 \pm 328.58$  U/L) olarak bulunmuş olup gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo II). Serum PON 1 aktiviteleri; DM ve kontrol grubunda, Q/R 192 genotiplerine göre incelendiğinde sırası ile  $413.65 \pm 269.88$  ve  $414.22 \pm 188.48$  U/L, QR genotipinde  $443.23 \pm 228.23$  ve  $539.69 \pm 249.87$  U/L ( $p < 0.05$ ), RR genotipinde  $1040.60 \pm 328.89$  ve  $1101.45 \pm 263.43$  U/L olarak bulundu. Her iki grupta RR genotipindeki bireylerin serum PON 1 aktivitesi QQ ve QR genotiplerindeki bireylerin PON 1 aktivitelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p < 0.0001$ ). Serum PON 1 aktiviteleri L/M 55 genotiplerine göre incelendiğinde, DM ve kontrol grubunda LL genotipinde sırası ile  $601.50 \pm 351.33$  ve  $605.14 \pm 272.86$  U/L, LM genotipinde  $476.39 \pm 299.74$  ve  $581.22 \pm 321.06$  U/L ( $p < 0.05$ ), MM genotipinde  $276.84 \pm 224.58$  ve  $242.57 \pm 81.13$  U/L ( $p > 0.05$ ) olarak bulundu. DM grubunda, LL genotipindeki bireylerin serum PON 1 aktiviteleri LM ( $p < 0.01$ ) ve MM ( $p < 0.0001$ ), genotiplerine göre, LM genotipindeki bireylerin PON 1 aktiviteleri MM genotipine göre ( $p < 0.05$ ) istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kontrol grubunda, LL genotipindeki bireylerin serum PON 1 aktiviteleri LM genotipindeki bireylerin PON 1 aktivitelerinden yüksek bulunmasına rağmen sonuçlar istatistiksel olarak anlamsız bulunurken aynı grupta LL genotipindeki bireylerin serum PON 1 aktiviteleri, MM genotipindeki bireylerin serum PON 1 aktivitelerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu.

DM grubu ve Kontrol grubunun Q/R 192 ve L/M 55 genotiplerine göre serum PON 1 aktiviteleri Şekil 10a ve 10b'de verilmiştir.



**Şekil 10a.** Grupların Q/R 192 genotiplerine göre serum PON 1 aktiviteleri.

\*:  $p < 0.01$ ; Kontrol grubunda QR ile karşılaştırıldığında  
 ¥:  $p < 0.0001$ ; Kontrol grubunda RR ile karşılaştırıldığında  
 §:  $p < 0.05$ ; DM grubunda QR ile karşılaştırıldığında  
 †:  $p < 0.0001$ ; DM grubunda RR ile karşılaştırıldığında



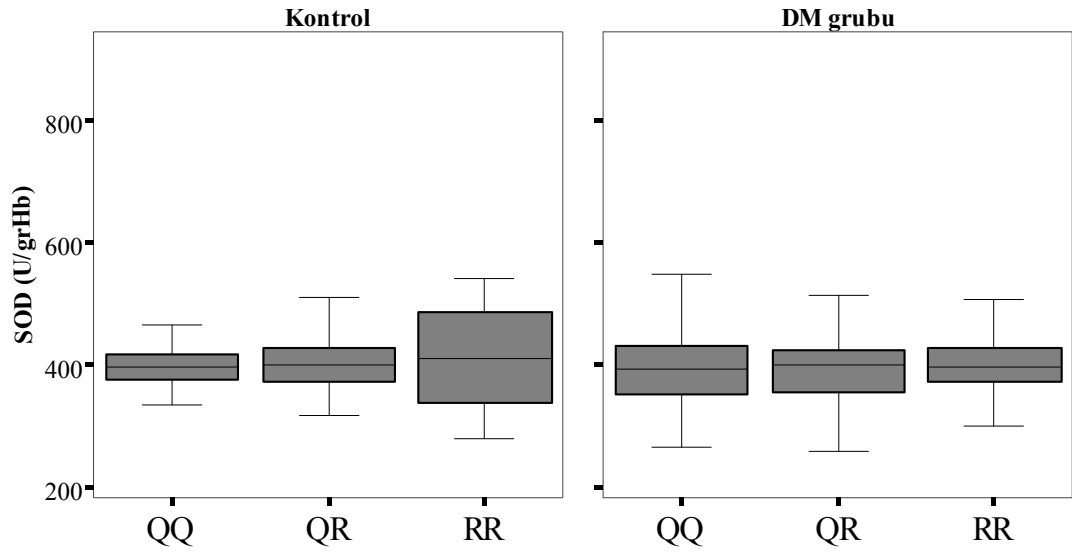
**Şekil 10b.** Grupların L/M 55 genotiplerine göre serum PON 1 aktiviteleri.

\*:  $p < 0.0001$ ; Kontrol grubunda MM ile karşılaştırıldığında  
 ¥:  $p < 0.05$ ; DM grubunda LM ile karşılaştırıldığında  
 £:  $p < 0.01$ ; DM grubunda LM ile karşılaştırıldığında  
 §:  $p < 0.0001$ ; DM grubunda LM ile karşılaştırıldığında  
 †:  $p < 0.05$ ; DM grubunda MM ile karşılaştırıldığında

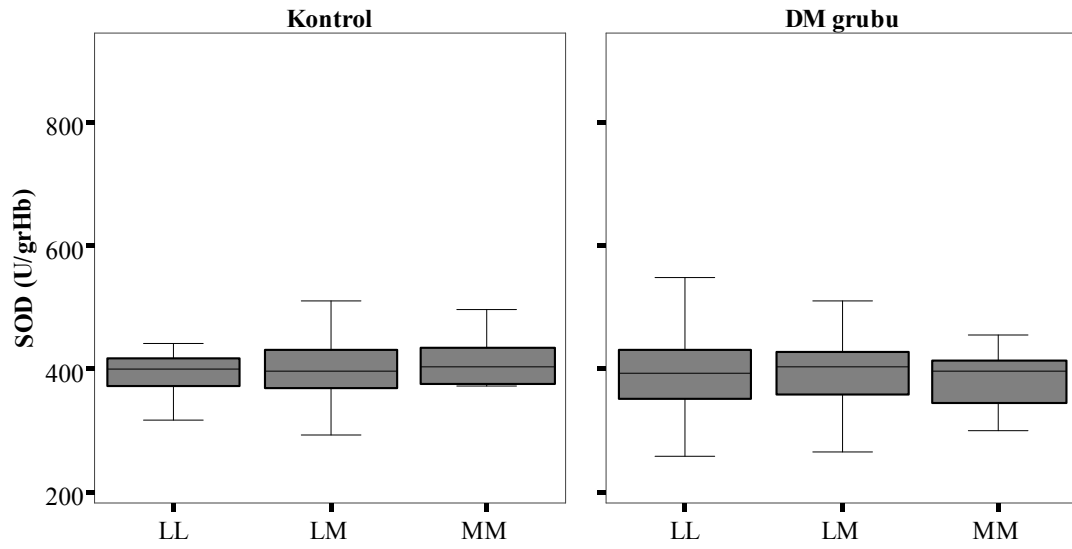
### 5.5. Eritrosit SOD Aktiviteleri

Eritrosit SOD aktiviteleri kontrol grubunda  $408.79 \pm 85.42$  U/grHb DM grubunda ise  $396.90 \pm 65.20$  U/grHb olarak bulundu. Gruplar arası farklılık istatistiksel olarak önemli değildir (Tablo II). Q/R 192 genotiplerine göre enzim aktivitesi incelendiğinde, DM ve kontrol grubunda, QQ genotipinde sırası ile  $393.63 \pm 65.82$  U/grHb ve  $402.68 \pm 43.91$  U/grHb, QR genotipinde  $399.50 \pm 67.02$  U/grHb ve  $405.58 \pm 83.55$  U/grHb, RR genotipinde  $401.04 \pm 58.06$  U/grHb ve  $447.18 \pm 178.79$  U/grHb bulundu. Q/R 192 genotiplerine göre eritrosit SOD aktiviteleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamsız bulundu. Her iki grupta RR genotipindeki bireylerin eritrosit SOD aktivitesi QQ ve QR genotiplerindeki bireylerin SOD aktivitelerine, QR genotipindeki bireylerin eritrosit SOD aktivitesi QQ genotipindeki bireylerin eritrosit SOD aktivitesi göre anlamlı olmayan derecede yüksek bulundu ( $p > 0.05$ ). L/M 55 genotiplerine göre incelendiğinde, eritrosit SOD aktiviteleri DM ve kontrol grubunda LL genotipinde sırası ile  $396.81 \pm 71.01$  U/grHb ve  $414.90 \pm 114.54$  U/grHb, LM genotipinde  $399.23 \pm 62.73$  U/grHb ve  $400.15 \pm 55.54$  U/grHb, MM genotipinde  $388.20 \pm 56.45$  ve  $417.78 \pm 58.30$  U/grHb ( $p > 0.05$ ) bulundu. L/M 55 genotipleri bakımından her iki grupta grup içinde ve gruplar arasında eritrosit SOD aktiviteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı.

DM grubu ve Kontrol grubunun Q/R 192 ve L/M 55 genotiplerine göre eritrosit SOD aktiviteleri Şekil 11a ve 11b'de verilmiştir.



**Şekil 11a.** Grupların Q/R 192 genotiplerine göre eritrosit SOD aktiviteleri.

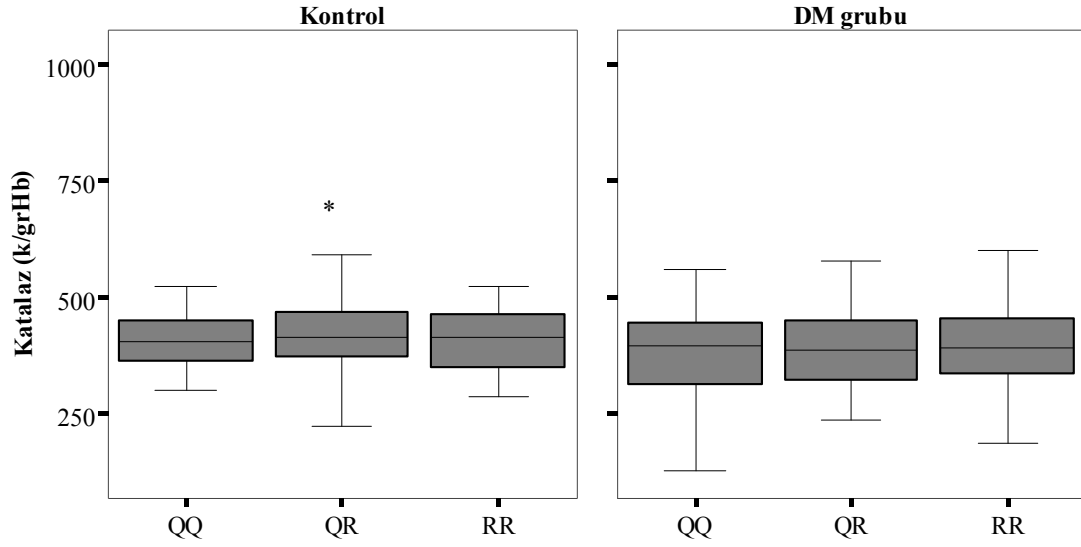


**Şekil 11b.** Grupların L/M 55 genotiplerine göre eritrosit SOD aktiviteleri.

## 5.6. Eritrosit Katalaz (CAT) Aktiviteleri

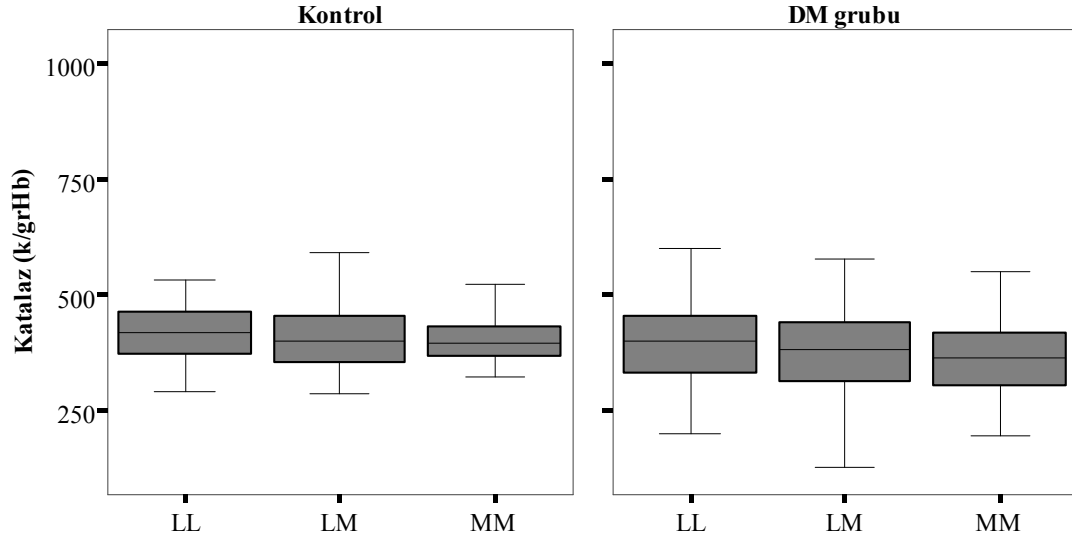
Eritrosit katalaz aktiviteleri incelendiğinde DM grubunda  $384.01 \pm 90.40$  k/grHb kontrol grubunda ise  $414.64 \pm 89.55$  k/grHb olup gruplar arası farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p < 0.05$ ) (Tablo II). Enzim aktiviteleri Q/R 192 genotiplerine göre incelendiğinde, DM ve kontrol grubunda, QQ genotipinde sırası ile  $380.28 \pm 88.61$  k/grHb ve  $401.40 \pm 54.30$  k/grHb, QR genotipinde  $386.85 \pm 92.47$  k/grHb ve  $418.17 \pm 71.73$  k/grHb ( $p < 0.05$ ), RR genotipinde  $389.16 \pm 93.57$  ve  $454.09 \pm 205.71$  k/grHb olarak bulundu. Her iki grupta RR genotipindeki bireylerin eritrosit katalaz aktivitesi QQ ve QR genotiplerindeki bireylerin katalaz aktivitelerine göre yüksek olmasına rağmen genotipler arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamsız bulundu. L/M 55 genotiplerine göre incelendiğinde, eritrosit katalaz aktiviteleri DM ve kontrol grubunda LL genotipinde sırası ile  $394.08 \pm 88.92$  k/grHb ve  $427.04 \pm 112.58$  k/grHb, LM genotipinde  $380.77 \pm 87.81$  k/grHb ve  $406.84 \pm 70.63$  k/grHb, MM genotipinde  $364.60 \pm 103.77$  k/grHb ve  $401.64 \pm 59.78$  k/grHb olarak bulundu. L/M 55 genotipleri bakımından her iki grupta grup içinde ve gruplar arasında eritrosit katalaz aktiviteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

DM grubu ve Kontrol grubunun Q/R 192 ve L/M 55 genotiplerine göre eritrosit katalaz aktiviteleri Şekil 12a ve 12b’de verilmiştir.



**Şekil 12a.** Grupların Q/R 192 genotiplerine göre eritrosit katalaz aktiviteleri.

\*:  $p < 0.05$ ; DM grubunda QR ile karşılaştırıldığında

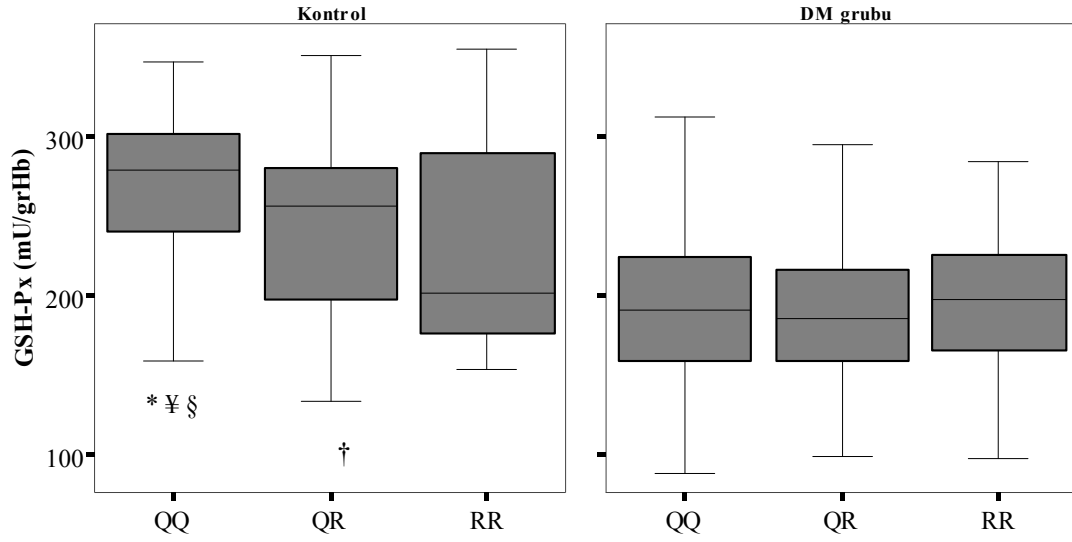


**Şekil 12b.** Grupların L/M 55 genotiplerine göre eritrosit katalaz aktiviteleri.

### 5.7. Eritrosit GSH-Px Aktiviteleri

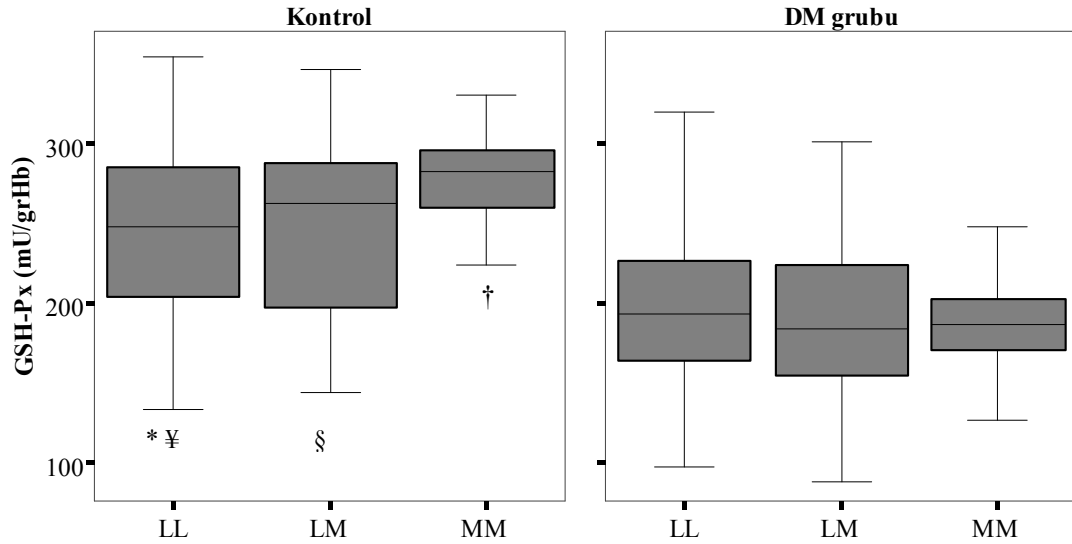
Eritrosit GSH-Px aktiviteleri incelendiğinde DM grubunda  $193.39 \pm 50.91$  mU/grHb) kontrol grubuna ( $251.10 \pm 53.65$  mU/grHb) göre istatistiksel olarak önemli derecede düşük bulundu ( $p < 0.01$ ) (Tablo II). Q/R 192 genotiplerine göre incelendiğinde, DM ve kontrol grubunda, QQ genotipinde sırası ile  $197.15 \pm 52.00$  mU/grHb ve  $267.33 \pm 46.35$  mU/grHb ( $p < 0.0001$ ), QR genotipinde  $186.83 \pm 49.19$  mU/grHb ve  $240.34 \pm 51.72$  mU/grHb ( $p < 0.0001$ ), RR genotipinde  $200.62 \pm 51.92$  mU/grHb ve  $229.72 \pm 73.22$  mU/grHb olarak bulundu. Her iki grupta QQ genotipindeki bireylerin eritrosit GSH-Px aktivitesi QR ve RR genotiplerindeki bireylerin GSH-Px aktivitelerine göre yüksek bulunmasına rağmen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. L/M 55 genotiplerine göre incelendiğinde, eritrosit GSH-Px aktiviteleri DM ve kontrol grubunda LL genotipinde sırası ile  $197.74 \pm 52.17$  mU/grHb ve  $243.90 \pm 55.28$  mU/grHb ( $p < 0.0001$ ), LM genotipinde  $190.20 \pm 51.93$  mU/grHb ve  $248.91 \pm 55.60$  mU/grHb ( $p < 0.0001$ ), MM genotipinde  $191.88 \pm 43.21$  mU/grHb ve  $280.28 \pm 30.35$  mU/grHb ( $p < 0.0001$ ) bulundu. L/M 55 genotipleri bakımından her iki grupta grup içinde eritrosit GSH-Px aktiviteleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı.

DM grubu ve Kontrol grubunun Q/R 192 ve L/M 55 genotiplerine göre eritrosit GSH-Px aktiviteleri Şekil 13a ve 13b'de verilmiştir.



**Şekil 13a.** Grupların Q/R 192 genotiplerine göre eritrosit GSH-Px aktiviteleri.

\*.  $p < 0.05$ ; Kontrol grubunda QR ile karşılaştırıldığında  
 ‡:  $p < 0.05$ ; Kontrol grubunda RR ile karşılaştırıldığında  
 §:  $p < 0.0001$ ; DM grubunda QQ ile karşılaştırıldığında  
 †:  $p < 0.0001$ ; DM grubunda QR ile karşılaştırıldığında



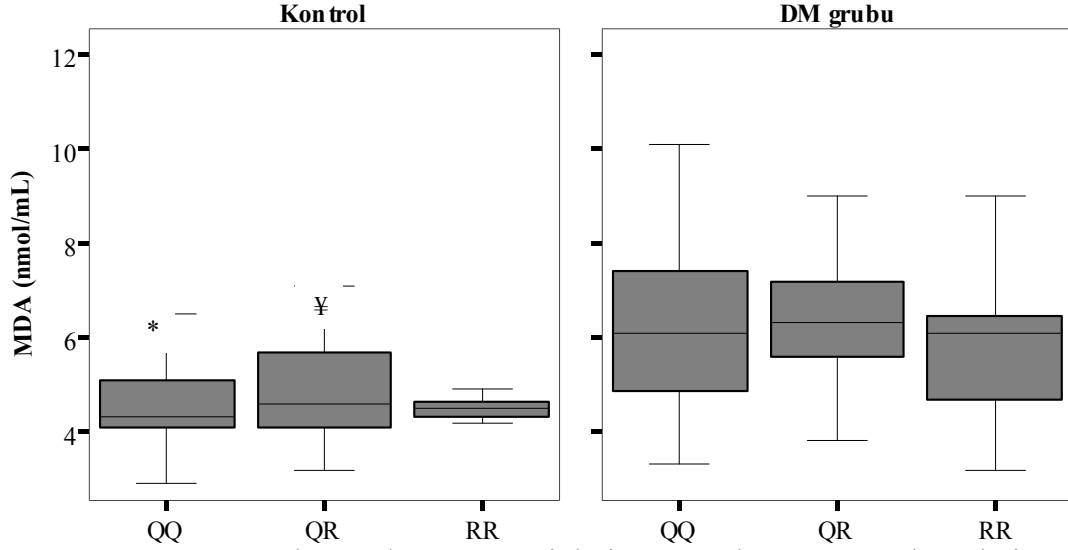
**Şekil 13b.** Grupların L/M 55 genotiplerine göre eritrosit GSH-Px aktiviteleri.

\*:  $p < 0.05$ ; Kontrol grubunda MM ile karşılaştırıldığında  
 ‡:  $p < 0.0001$ ; DM grubunda LL ile karşılaştırıldığında  
 §:  $p < 0.0001$ ; DM grubunda LM ile karşılaştırıldığında  
 †:  $p < 0.0001$ ; DM grubunda MM ile karşılaştırıldığında

## 5.8. Plazma MDA Düzeyleri

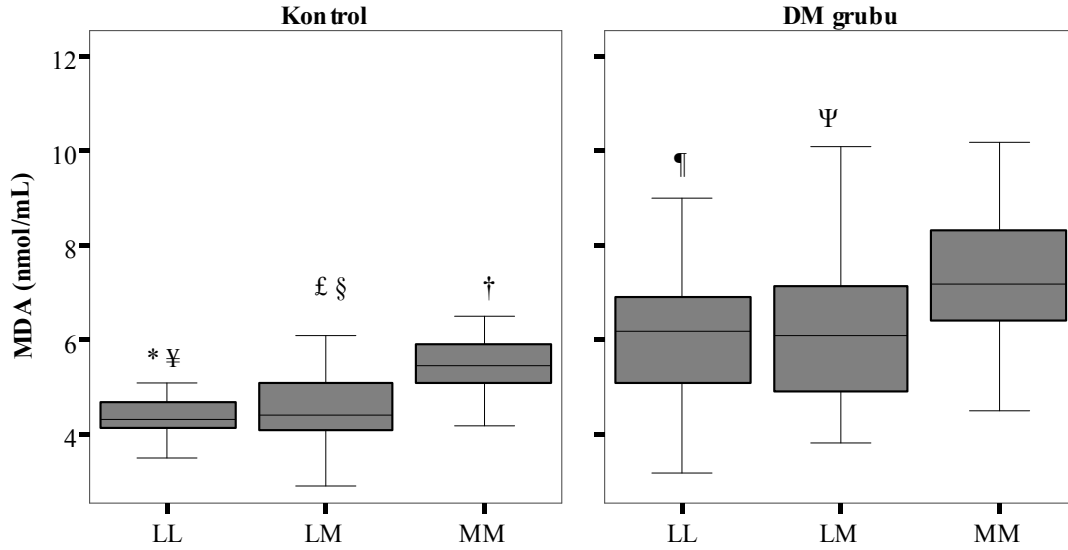
Plazma MDA düzeyleri DM grubunda ( $6.34 \pm 1.65$  nmol/ml) kontrol grubuna ( $4.66 \pm 0.96$  nmol/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ) (Tablo II). Q/R 192 genotiplerine göre incelendiğinde, DM ve kontrol grubunda, QQ genotipinde sırası ile  $6.33 \pm 1.90$  nmol/mL ve  $4.52 \pm 0.87$  nmol/mL ( $p < 0.0001$ ), QR genotipinde  $6.48 \pm 1.33$  nmol/mL ve  $4.78 \pm 0.98$  nmol/mL ( $p < 0.0001$ ), RR genotipinde  $5.90 \pm 1.53$  nmol/mL ve  $4.71 \pm 1.24$  nmol/mL olarak bulundu. Her iki grupta QR genotipindeki bireylerin plazma MDA düzeyleri QQ ve RR genotiplerindeki bireylerin plazma MDA düzeylerine göre yüksek olmasına rağmen sonuçlar istatistiksel olarak önmlü bulunmadı. L/M 55 genotiplerine göre incelendiğinde, plazma MDA düzeyleri DM ve kontrol grubunda LL genotipinde sırası ile  $6.14 \pm 1.63$  nmol/mL ve  $4.45 \pm 0.77$  nmol/mL ( $p < 0.0001$ ), LM genotipinde  $6.25 \pm 1.67$  nmol/mL ve  $4.66 \pm 1.08$  nmol/mL ( $p < 0.0001$ ), MM genotipinde  $7.28 \pm 1.29$  nmol/mL ve  $5.31 \pm 0.83$  nmol/mL olarak ( $p < 0.0001$ ) bulundu. Her iki grupta grup içinde plazma MDA düzeyleri MM genotipindeki bireylerde LL ( $p < 0.01$ ) ve LM ( $p < 0.05$ ) genotipindeki bireylere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu.

DM grubu ve Kontrol grubunun Q/R 192 ve L/M 55 genotiplerine göre plazma MDA düzeyleri Şekil 14a ve 14b’de verilmiştir.



**Şekil 14a.** Grupların Q/R 192 genotiplerine göre plazma MDA düzeyleri.

\*: p<0.0001; DM grubunda QQ ile karşılaştırıldığında  
 ¥: p<0.0001; DM grubunda QR ile karşılaştırıldığında



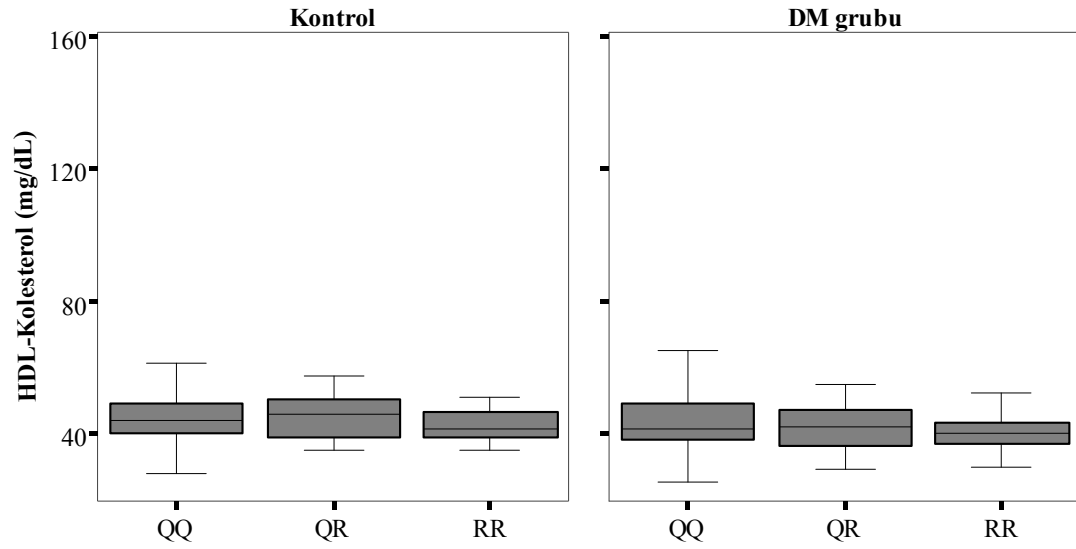
**Şekil 14b.** Grupların L/M 55 genotiplerine göre plazma MDA düzeyleri.

\*: p<0.01; Kontrol grubunda MM ile karşılaştırıldığında  
 ¥: p<0.0001; DM grubunda LL ile karşılaştırıldığında  
 £: p<0.05; Kontrol grubunda MM ile karşılaştırıldığında  
 §: p<0.0001; DM grubunda LM ile karşılaştırıldığında.  
 †: p<0.0001; DM grubunda MM ile karşılaştırıldığında  
 ¶: p<0.01; DM grubunda MM ile karşılaştırıldığında  
 Ψ: p<0.05; DM grubunda MM ile karşılaştırıldığında

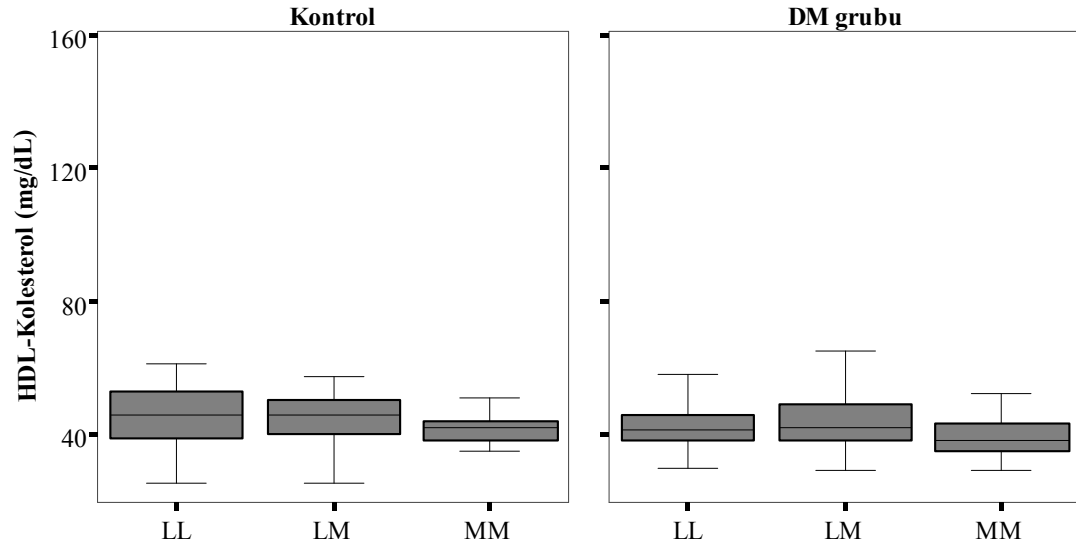
### 5.9. Serum HDL-Kolesterol Düzeyleri

Serum HDL-kolesterol düzeyleri DM grubunda  $43.46 \pm 11.65$  mg/dL, kontrol grubunda  $44.67 \pm 7.27$  mg/dL olarak bulundu (Tablo II). Q/R 192 genotiplerine göre incelendiğinde, DM ve kontrol grubunda, QQ genotipinde sırası ile  $43.61 \pm 8.70$  mg/dL ve  $44.44 \pm 8.75$  mg/dL, QR genotipinde  $43.56 \pm 14.59$  mg/dL ve  $45.43 \pm 6.02$  mg/dL, RR genotipinde ise  $42.50 \pm 11.11$  mg/dL ve  $42.45 \pm 5.10$  mg/dL olarak bulundu. Her iki grupta Q/R 192 genotipi bakımından gruplar arası ve grup içinde serum HDL-kolesterol düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı. L/M 55 genotiplerine göre incelendiğinde, serum HDL-kolesterol düzeyleri DM ve kontrol grubunda LL genotipinde sırası ile  $43.82 \pm 15.26$  mg/dL ve  $45.55 \pm 7.97$  mg/dL, LM genotipinde  $44.26 \pm 8.79$  mg/dL ve  $44.88 \pm 7.12$  mg/dL, MM genotipinde  $39.24 \pm 6.48$  mg/dL ve  $41.28 \pm 4.35$  mg/dL olarak bulundu. Her iki grupta L/M 55 genotipi bakımından gruplar arası ve grup içinde serum HDL-kolesterol düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.

DM grubu ve Kontrol grubunun Q/R 192 ve L/M 55 genotiplerine göre serum HDL-kolesterol düzeyleri Şekil 15a ve 15b'de verilmiştir.



**Şekil 15a.** Grupların Q/R 192 genotiplerine göre serum HDL-kolesterol düzeyleri.

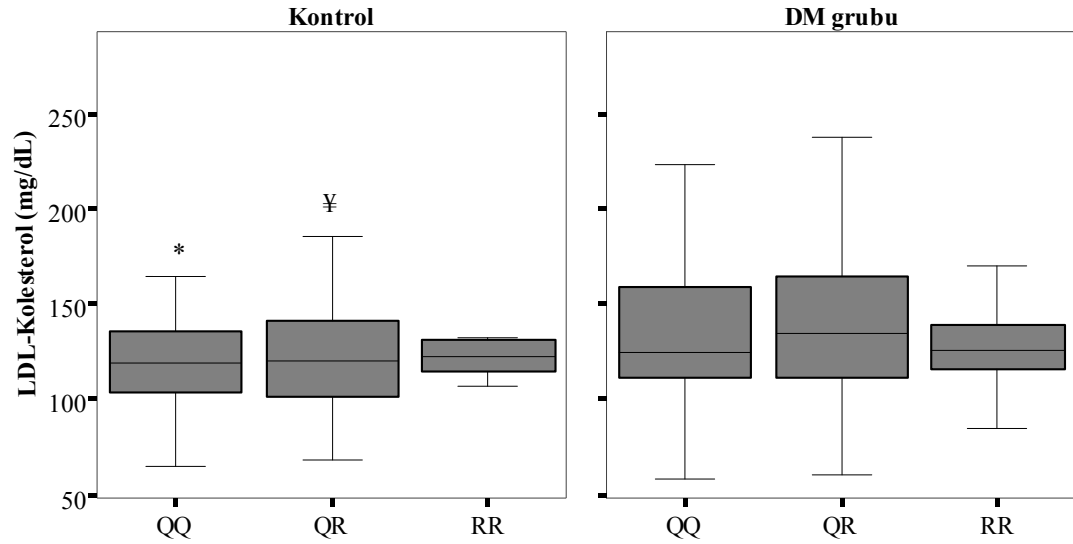


**Şekil 15b.** Grupların L/M 55 genotiplerine göre serum HDL-kolesterol düzeyleri.

### 5.10. Serum LDL-Kolesterol Düzeyleri

Serum LDL-kolesterol düzeyleri DM grubunda  $135.27 \pm 37.12$  mg/dL kontrol grubunda ise  $120.32 \pm 25.23$  mg/dL olarak bulundu. Serum LDL-kolesterol düzeyleri bakımından gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p < 0.001$ ) (Tablo II). Q/R 192 genotiplerine göre incelendiğinde, DM ve kontrol grubunda, QQ genotipinde sırası ile  $134.13 \pm 36.18$  mg/dL ve  $117.31 \pm 25.38$  mg/dL ( $p < 0.01$ ), QR genotipinde  $138.30 \pm 39.76$  mg/dL ve  $121.89 \pm 25.93$  mg/dL ( $p < 0.01$ ), RR genotipinde ise  $129.50 \pm 31.59$  mg/dL ve  $126.09 \pm 21.97$  mg/dL olarak bulundu. Kontrol ve diabet gruplarında QQ ve QR genotipleri bakımından serum LDL-kolesterol düzeyleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak önemli bulundu ( $p < 0.01$ ). L/M 55 genotiplerine göre incelendiğinde, serum LDL-kolesterol düzeyleri DM ve kontrol grubunda LL genotipinde sırası ile  $135.29 \pm 38.72$  mg/dL ve  $116.16 \pm 23.50$  mg/dL, LM genotipinde  $134.94 \pm 35.09$  mg/dL ve  $121.06 \pm 28.66$  mg/dL, MM genotipinde ise  $136.44 \pm 40.89$  mg/dL ve  $130.71 \pm 14.36$  mg/dL bulundu. Her iki grupta L/M 55 genotipi bakımından grup içinde serum LDL-kolesterol düzeyleri bakımından istatistiksel yönden anlamlı bir farklılık bulunmadı.

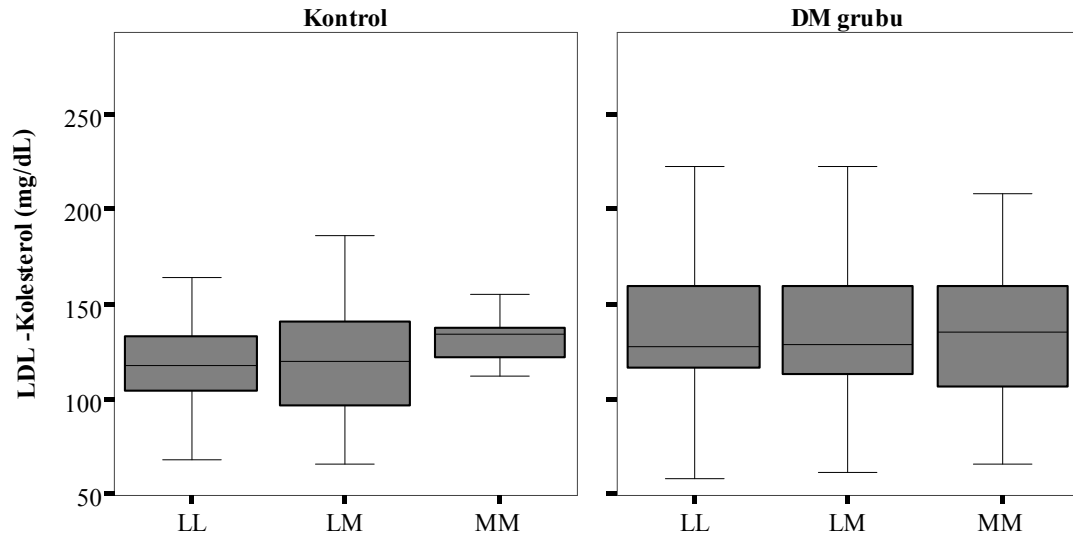
DM grubu ve Kontrol grubunun Q/R 192 ve L/M 55 genotiplerine göre serum LDL-kolesterol düzeyleri Şekil 16a ve 16b’de verilmiştir.



Şekil 16a. Grupların Q/R 192 genotiplerine göre serum LDL-kolesterol düzeyleri.

\*:  $p < 0.01$ , DM grubunda QQ ile karşılaştırıldığında

†:  $p < 0.01$ , DM grubunda QR ile karşılaştırıldığında

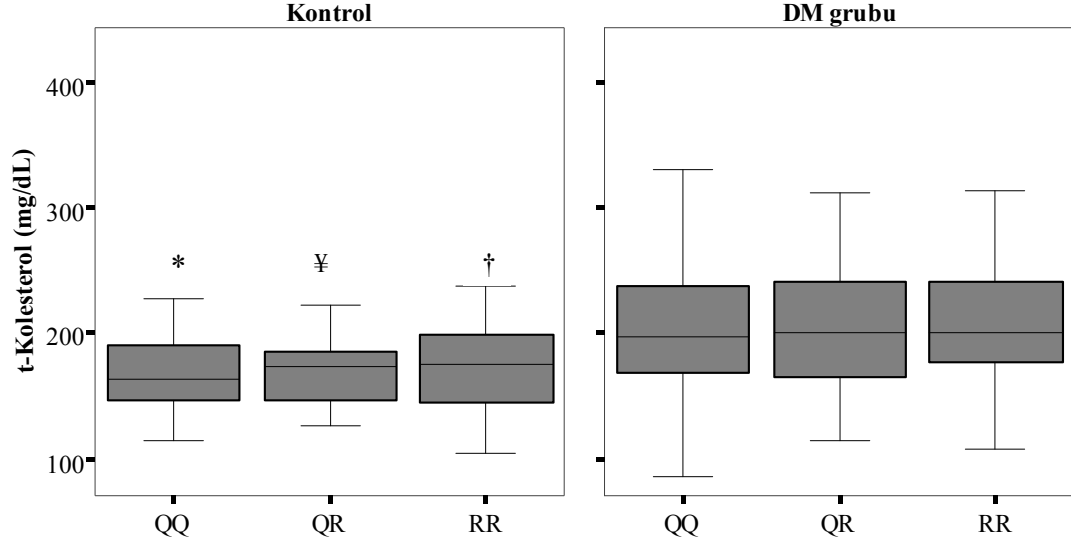


Şekil 16b. Grupların L/M 55 genotiplerine göre serum LDL-kolesterol düzeyleri

### 5.11. Serum Kolesterol Düzeyleri

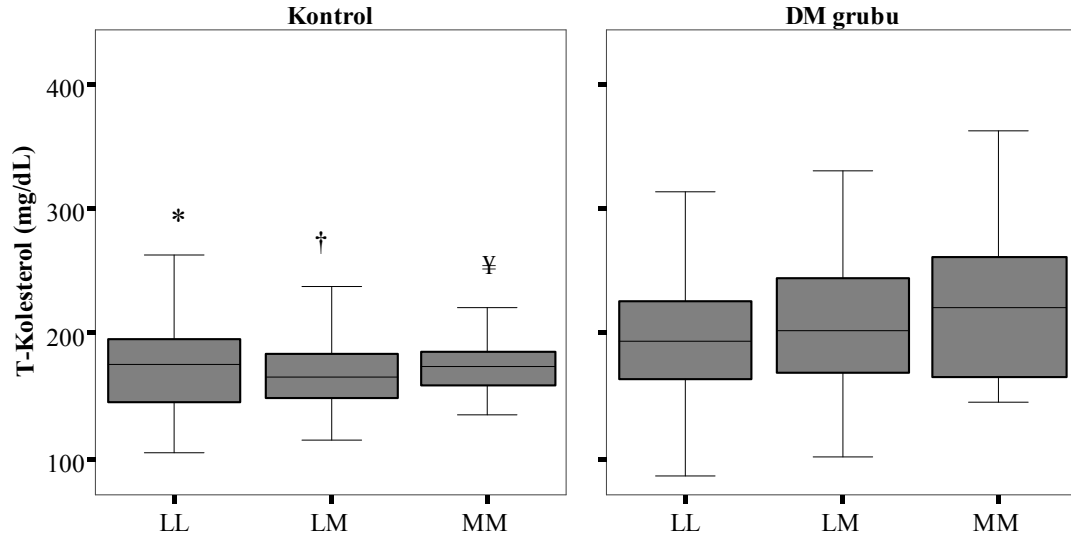
Serum kolesterol düzeyleri DM grubunda (207.60±59.80 mg/dL) kontrol grubuna (171.95±35.32 mg/dL) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.001) (Tablo II). Q/R 192 genotiplerine göre incelendiğinde, DM ve kontrol grubunda, QQ genotipinde sırası ile 205.44±58.65 mg/dL ve 169.31±33.46 mg/dL (p<0.01), QR genotipinde 210.34±63.30 mg/dL ve 174.54±35.88 mg/dL (p<0.0001), RR genotipinde ise 206.87±53.82 mg/dL ve 171.90±42.60 mg/dL olarak bulundu (p<0.05). Her iki grupta QR genotipindeki bireylerin serum kolesterol düzeyleri QQ ve RR genotiplerindeki düzeylerden yüksek bulunmuş olup grup içinde serum kolesterol düzeyleri bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık saptanmadı. L/M 55 genotiplerine göre incelendiğinde, serum kolesterol düzeyleri DM ve kontrol grubunda LL genotipinde sırası ile 199.68±56.89 mg/dL ve 173.58±38.42 mg/dL (p<0.01), LM genotipinde 210.37±61.26 mg/dL ve 168.22±34.05 mg/dL (p<0.01), MM genotipinde 221.96±61.86 mg/dL ve 178.92±29.80 mg/dL olarak bulundu (p<0.01). Her iki grupta L/M 55 genotipi bakımından grup içinde serum kolesterol düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi.

DM grubu ve Kontrol grubunun Q/R 192 ve L/M 55 genotiplerine göre serum kolesterol düzeyleri Şekil 17a ve 17b'de verilmiştir.



**Şekil 17a.** Grupların Q/R 192 genotiplerine göre serum kolesterol düzeyleri.

\*:  $p < 0.01$ ; DM grubunda QQ ile karşılaştırıldığında  
 ‡:  $p < 0.0001$ ; DM grubunda QR ile karşılaştırıldığında  
 †:  $p < 0.05$ ; DM grubunda RR ile karşılaştırıldığında



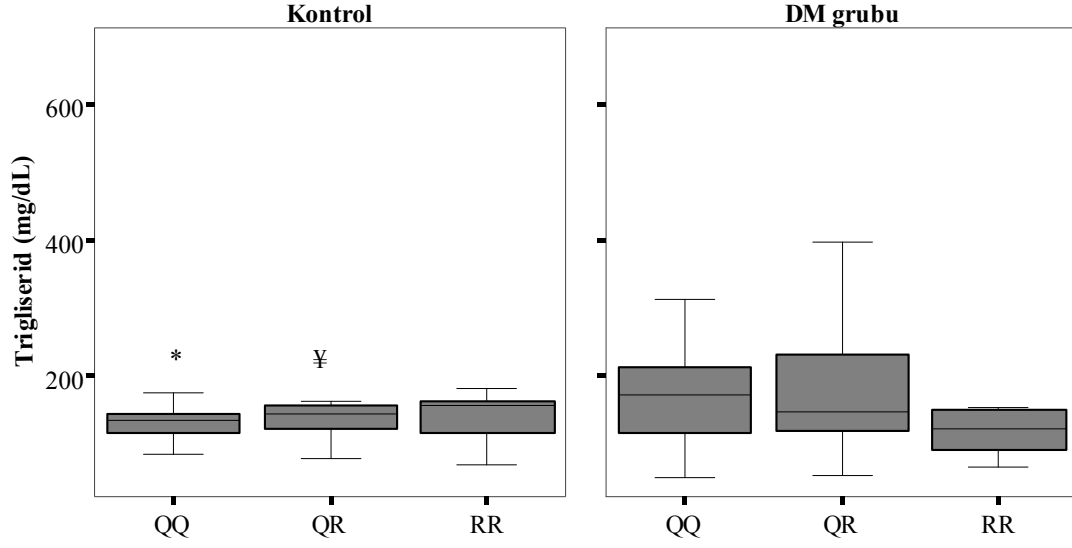
**Şekil 17b.** Grupların L/M 55 genotiplerine göre serum kolesterol düzeyleri.

\*:  $p < 0.01$ ; DM grubunda LL ile karşılaştırıldığında  
 †:  $p < 0.01$ ; DM grubunda LM ile karşılaştırıldığında  
 ‡:  $p < 0.01$ ; DM grubunda MM ile karşılaştırıldığında

### 5.12. Serum Triglisericid Düzeyleri

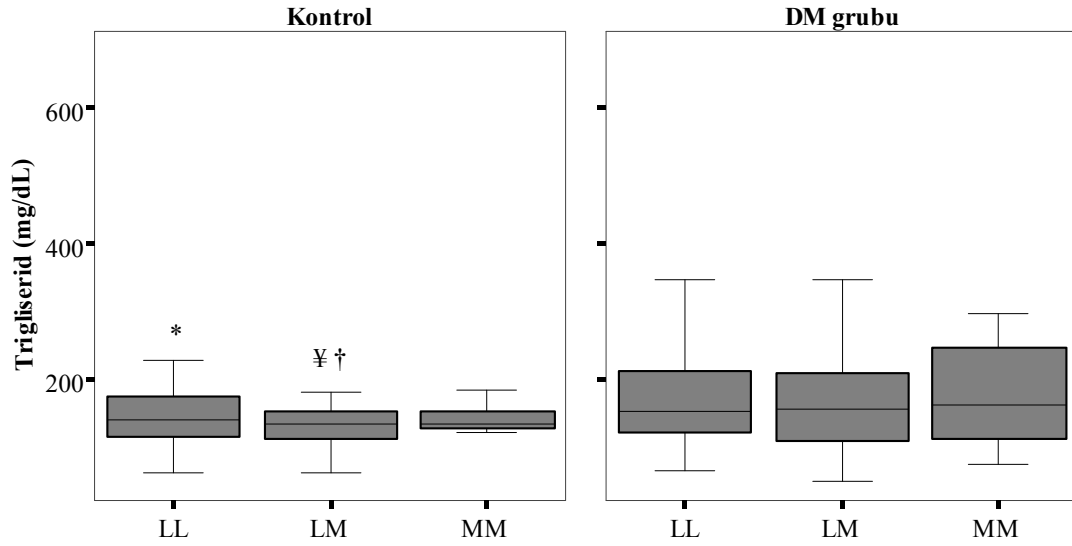
Serum triglisericid düzeyleri DM grubunda ( $175.64 \pm 92.50$  mg/dL) kontrol grubuna ( $141.17 \pm 41.68$  mg/dL) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ) (Tablo II). Q/R 192 genotiplerine göre incelendiğinde, DM ve kontrol grubunda, QQ genotipinde sırası ile  $170.95 \pm 69.03$  mg/dL ve  $132.97 \pm 31.93$  mg/dL ( $p < 0.0001$ ), QR genotipinde  $186.79 \pm 111.84$  mg/dL ve  $149.32 \pm 49.44$  mg/dL ( $p < 0.01$ ), RR genotipinde ise  $156.54 \pm 100.68$  mg/dL ve  $140.63 \pm 38.08$  mg/dL olarak bulundu. Her iki grupta QR genotipindeki bireylerin serum triglisericid düzeyleri QQ ve RR genotiplerindeki bireylerdeki düzeylerden yüksek bulunmuş olup grup içinde serum triglisericid düzeyleri bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmedi. L/M 55 genotiplerine göre incelendiğinde, serum triglisericid düzeyleri DM ve kontrol grubunda LL genotipinde sırası ile  $176.10 \pm 82.45$  mg/dL ve  $145.90 \pm 45.00$  mg/dL ( $p < 0.01$ ), LM genotipinde  $171.56 \pm 91.62$  mg/dL ve  $131.42 \pm 29.49$  mg/dL ( $p < 0.0001$ ), MM genotipinde ise  $189.84 \pm 123.86$  mg/dL ve  $158.00 \pm 57.48$  mg/dL olarak bulundu. DM grubunda L/M 55 genotipi bakımından grup içinde serum triglisericid düzeyleri bakımından istatistiksel yönden önemli bir farklılık tespit edilmez iken, kontrol grubunda MM genotipindeki bireylerin triglisericid düzeyleri LM genotipindeki bireylerin triglisericid düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p < 0.05$ ).

DM grubu ve Kontrol grubunun Q/R 192 ve L/M 55 genotiplerine göre serum triglisericid düzeyleri Şekil 18a ve 18b'de verilmiştir.



**Şekil 18a.** Grupların Q/R 192 genotiplerine göre serum trigliserid düzeyleri.

\*:  $p < 0.0001$ ; DM grubunda QQ ile karşılaştırıldığında  
 ¥:  $p < 0.01$ ; DM grubunda QR ile karşılaştırıldığında



**Şekil 18b.** Grupların L/M 55 genotiplerine göre serum trigliserid düzeyleri.

\*:  $p < 0.01$ ; DM grubunda LL ile karşılaştırıldığında  
 ¥:  $p < 0.05$ ; Kontrol grubunda MM ile karşılaştırıldığında  
 †:  $p < 0.0001$ ; DM grubunda LM ile karşılaştırıldığında

## 6. TARTIŞMA

Diabetes mellitus (DM), insülin hormonunun sekresyonunda veya fonksiyonunda eksiklik sonucu ortaya çıkan artmış kan glukozu ile karakterize bir sendromdur (10). Özellikle gelişmiş ülkelerde daha yüksek oranlarda rastlanmakla birlikte dünyadaki bütün ölümlerin sebepleri arasında 4. veya 5. sırayı almaktadır. Günümüzde 150 milyon olan diyabetli sayısının 2025 yılında 300 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (155).

Diyabette görülen kronik hiperglisemi uzun vadeli birçok hasara neden olmakta ve özellikle göz, böbrek, sinir, kalp ve damar gibi organlarda çeşitli bozukluk ve yetersizliklere neden olmaktadır (10).

Tip 2 DM multifaktöryel bir hastalık tablosu olup kalıtım ve çevre faktörleri arasındaki değişebilen karşılıklı etkileşimler sonucunda meydana gelir. Hastalığın meydana gelmesinde rol alan kalıtsal faktörlere bakıldığında birden fazla genin müdahil olduğu poligenik bir durum olduğu görülmektedir (166). Genetik çalışmalar genom üzerindeki bazı lokusların veya genlerin tip 2 DM için predispozisyon oluşturduğunu göstermekle beraber bu bölge veya genlerden her birisinin hastalıktaki rolü hala tam açıklığa kavuşmamıştır (166).

Lipidlerin oksidasyonunun diyabetin mikro ve makrovasküler komplikasyonlarının oluşmasında önemli rolü vardır. Diyabetli hastalarda yapılan çalışmalarda PON 1 aktivitesinin sağlıklı insanlara göre daha düşük olduğu bulunmuş ve böylece PON 1, tip 2 DM ile ilişkilendirilmiştir (4,101).

PON 1 geninde PON 1 gen ekspresyonu, protein yoğunluğu ve enzim aktivitesi üzerinde etkili oldukları bilinen, promotör ve kodlayan bölgelerde yer alan birkaç polimorfizm bulunmaktadır. PON 1 kodlayan bölgesinde L/M 55 ve

Q/R 192 polimorfizmleri görülmektedir. Bu iki polimorfizmin görülme sıklığı değişik etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir.

55. konumda L ve M allel sıklığı diyabetli ve kontrol gruplarının toplamı değerlendirildiğinde Almanlar'da % 67 ve % 33 (29), İngilizlerde % 66 ve % 34 (101), İspanyol toplumunda %61 ve % 39 (45), Fin toplumunda % 65 ve % 35 (132) ve Türkiye'de yapılan bir çalışmada ise (4) % 73 ve % 27 oranlarında bulunmuştur. Diyabet hastaları ve diyabet olmayan bireyler üzerinde yapılan çalışmalarda L/M genotip dağılımı ve L ve M allel sıklığı bakımından kontrol ve diyabetli gruplar arasında önemli bir fark bulunmamıştır (4). Bu çalışmada L ve M allel sıklığı sırasıyla kontrol grubunda %64.2 ve % 35.8, DM grubunda %63.5 ve %36.5 bulundu. Genotip dağılımı bakımından kontrol grubunda sırasıyla, % 42.2 LL, % 44.1, LM ve % 13.7 MM, DM grubunda % 39.5 LL, % 48 LM ve % 12.5 oranında MM genotipleri bulundu. Kontrol ve DM grubu karşılaştırıldığında L ve M allel sıklığı ile L/M 55 genotip dağılımı bakımından iki grup arasında önemli bir fark bulunmadı. Bu sonuçlar PON 1 L/M 55 polimorfizminin tip 2 diyabet riski için önemli bir genetik yatkınlık oluşturmadığı yönündeki bulgular (4,52) ile uyum içerisindedir. Q/R 192 polimorfizminin kontrol ve diyabetli gruplardaki dağılımının araştırıldığı çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmektedir. Ferre ve arkadaşları (45), Inoue ve arkadaşları (78), ve Ağaçhan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda (4); Q ve R allel sıklığı ile Q/R 192 genotip dağılımının kontrol ve diyabet grupları arasında istatistiksel yönden önemli bir farklılık göstermediğini bildirmişlerdir. Mevcut çalışmamızda Q ve R allel sıklığı ve Q/R genotipleri dağılımı açısından kontrol ve diyabet grupları arasında küçük farklılıklar olmakla birlikte bu farklar istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Kontrol grubunda Q ve R allel sıklığı %66.6

ve %33.4; QQ, QR ve RR genotipleri sırasıyla % 44.1, %45.1, %10.8 bulundu. DM grubunda Q ve R allel sıklığı %67.7 ve %32.3; QQ, QR ve RR genotipleri sırasıyla % 47.5, %40.5, %12 bulundu. Q/R 192 polimorfizmleri bakımından kontrol ve diyabet grupları arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık tespit edilmemiştir ( $p>0.05$ ). Bu bulgular; PON 1 192 polimorfizminin tip 2 diyabet için genetik bir risk oluşturmadığı kanısını oluşturmaktadır. Yapılan birçok çalışmada da PON 1 Q/R 192 polimorfizminin diyabet ve komplikasyonları için genetik bir risk faktörü olmadığı bildirilmiş olup (11,52,72)çalışmaların sonuçları bizim çalışmamız ile uyum göstermektedir. Ancak Mackness ve arkadaşları (101), Q allel sıklığını kontrol grubunda % 74, diyabetli hastalarda % 67, R allel sıklığını kontrol grubunda % 26 diyabetli hastalarda % 33 olarak bulmuş ve bu bulgulara göre R allel varlığının diyabet için bir risk faktörü olabileceğini bildirmiştir. Ruiz ve arkadaşları da (137) bu görüşü destekler mahiyette R allel varlığının tip 2 diyabetli hastalarda kardiyovasküler bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir. Farklı sonuçlar bu hastalık tablolarının gelişmesinde PON 1 polimorfizmlerinin tek başına bir rolü olmadığını, PON 2 veya diğer bazı genetik faktörlerinde rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan bir çalışmada PON 1 enziminin paraoksonaz aktivitesinin diyabet ve ailesel hiperkolesterolemi gibi artmış aterogenez ile seyreden hastalıklarda düşük olduğu bildirilmiştir (101). PON 1 aktivitesi genetik ve çevresel faktörlerden etkilenebilir ve bu da sonuçta HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruma kapasitesinde azalmaya neden olarak, aterogenez gelişimine katkıda bulunur (84). Diyabetik hastalarda PON 1 55 ve 192 polimorfizmlerinin enzimin paraoksonaz aktivitesi üzerine önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda PON 1 paraoksonaz aktivite düzeyleri diyabet grubunda kontrol grubuna göre düşük bulunmakla birlikte

bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı ( $P>0.05$ ). Kontrol ve diyabet gruplarında L/M 55 polimorfizminin PON 1 aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde her iki grupta da PON 1 paraoksonaz aktivitesi en yüksek LL, onu takiben LM ve en düşük MM genotipinde bulunmuştur ve bu sonuç yapılan diğer çalışmalar ile uyum içerisindedir (4,45,78,101). Substrat olarak paraokson kullanıldığı zaman, L55 taşıyan alkozimin M55 taşıyan alkozimden daha yüksek aktiviteye sahip olmasının muhtemel sebepleri vardır (21). L/M 55 polimorfizminin karaciğerdeki enzim ekspresyonunu etkilediği; L55 allelinin M55 alleleline göre daha çok eksprese olduğu ve dolayısıyla L55 alleli taşıyan bireylerin serumlarında PON 1 yoğunluğunun daha yüksek olduğu bildirilmektedir (21). Buna ilave olarak M55 izoformu L55 izoformuna göre daha az stabil bir yapı göstermektedir (4). PON 1 192 polimorfizminin paraoksonaz aktivitesi üzerine etkisi PON 1 55 polimorfizminden daha belirgindir. 192. konumda R bulunduran izozimin Q bulunduran izozime göre paraoksone karşı daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (127). Çalışmamızda; kontrol ve diyabet gruplarında PON 1 192 polimorfizminin PON 1 aktivitesi üzerine etkileri incelendiğinde her iki grupta da PON 1 paraoksonaz aktivitesi en yüksek RR homozigot, onu takiben QR heterozigot ve en düşük QQ homozigot genotipinde bulunmuştur ve bu sonuç yapılan bütün diğer çalışmalar ile paralellik göstermektedir (4,45,78,101). Aviram ve arkadaşları (12) saflaştırılmış PON 1 QQ homozigot genotipinin RR homozigot genotipine göre LDL oksidasyonuna karşı çok daha etkin olduğunu kanıtlamış ancak Cao ve arkadaşları (26) diyabet hastalarının QQ ve RR genotiplerinin LDL oksidasyonuna karşı koruyucu etkisinin aynı oranda olduğunu bildirmiştir. Bu bulgular diyabetteki PON 1 aktivitesinde görülen azalmanın esas nedeninin bu polimorfizmler olmadığını

göstermektedir. Diyabet grubunda PON 1 aktivitesinin azalmasının nedeni olarak birkaç hipotez ileri sürülmektedir. Öncelikle; diyabetli hastaların kan proteinlerinin ileri derecede glikasyona uğramasının sonucu olarak enzim aktivitesinin inhibe olduğu düşünülmektedir. Daha önemlisi PON 1'in kendisi de glukoz tarafından glikasyona uğramakta ve bu da enzim aktivitesinde bir inhibisyona neden olmaktadır. Yine diyabette lipoprotein kompozisyonu veya konformasyonu değişmektedir ve değişime uğramış olan HDL üzerinde bulunan PON 1 enziminin substrat ile etkileşimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (78).

Diyabet, insülinin üretilmesi veya işlevindeki bozukluklardan kaynaklanan metabolik bir bozukluk olmakla birlikte oksidatif stresin oldukça yoğun olduğu bir durumdur. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının oksidatif stresle ilişkisi uzun yıllardan beri bilinmektedir (110). Kronik hiperglisemi özellikle diyabet komplikasyonlarının geliştiği dokularda oksidatif strete artışa neden olmaktadır (159). Bir başka deyişle hiperglisemi oksidatif strese yol açmakta yani serbest radikal üretimi artmaktadır. Hücrenel antioksidanlar oluşan serbest radikalleri etkisizleştirmezse bu radikaller, protein, lipid ve nükleik asitlerle etkileşime girerek proteinlerin yapısını ve fonksiyonunu değiştirirler, membran bütünlüğü ve fonksiyon kayıplarına ve bazı mutasyonlara neden olabilirler. Bu reaktif oksijen türleri vücudun enzimatik ve enzimatik olmayan savunma mekanizmaları tarafından elimine edilirler (83). Bu enzimler arasında mitokondriyal ve sitozolik SOD; süperoksid radikalının düsmutasyonu ile oluşan  $H_2O_2$  'i mitokondrilerde glutatyon peroksidaz, lizozomlarda ise katalaz  $H_2O$  ve  $O_2 \cdot e$  dönüştürmektedir (83). Bu eliminasyon işlemlerinde önemli bir rol oynayan diğer bir enzim ise glutatyon redüktaz (GR) dır. GR okside olmuş

glutasyonu indirgeyerek hidrojen vericisi olarak glutasyon peroksidazın kullanımına sunar (83).

Antioksidan enzimlerin diyabetik koşullarda oksidatif durumun düzenlenmesinde önemi büyüktür. Fakat diyabetik şartlarda bu enzimlerin protein ekspresyonlarında ve aktivitelerinde önemli değişimler görülür. Diyabette SOD, CAT ve GSH-Px düzeylerinin arttığı, azaldığı veya değişmediğini bildiren çok sayıda birbirleri ile çelişen çalışma mevcuttur.

Tip 1 diyabet hastalarında yapılan bir çalışmada diyabetlilerde eritrosit SOD, GSH-Px ve CAT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan azalma saptanmıştır (128).

DeneySEL diyabet modelinde (147) streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratlarda SOD ve CAT aktivitelerinde azalma GSH-Px aktivitesinde ise bir değişiklik görülmediğini bildirmişlerdir. Ayrıca diyabetin bu enzimlerin protein ekspresyonlarında düşüşe neden olduğunu ve insülin tedavisinin her 3 enzimin protein ekspresyonlarını normal düzeylere getirdiğini bildirmişlerdir.

Abou-Seif ve arkadaşları (2), tip 2 diyabetli hastalarda SOD ve CAT aktivitelerinin azaldığını ve MDA düzeylerinin arttığını bildirmişlerdir.

Diyabetik koşullarda artan serbest oksijen radikallerinin SOD enzimini oksitleyerek denatüre etmesi veya uzun süreli hiperglisemide SOD'un glikolize edilerek inhibe olması enzimin aktivitesindeki düşüşün sebebi olarak gösterilmektedir (75). Diyabetten kaynaklanan bağırsak Zn emilimindeki bir bozukluğun SOD aktivitesinde düşüşe neden olduğu bildirilmektedir. (58). Sundaram ve arkadaşları (152), 467 tip 2 diyabetli hastada yaptıkları bir çalışmada lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığını ve SOD ve CAT aktivitelerinin önemli derecede düőüğünü

bildirmişlerdir. Diyabette SOD aktivitesinin düştüğüne dair bulguların aksine tip 2 diyabetlilerde SOD aktivitesinin kontrollere göre daha yüksek olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (91,109). Araştırmamızda; diyabetik grupta SOD aktivitesinde azalma görülmesine rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ).

Çalışmamızda CAT aktivitesi kontrol grubuna göre DM grubunda düşük bulunmuş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Diyabet grubunda CAT aktivitesinin düşük bulunması birçok çalışma ile paralellik gösterirken (2,91,157) bazı çalışmalarda bildirilen bulgular ile uyuşmamaktadır (88,109,110). Diyabetli ve diyabetli olmayan gebeler üzerinde yapılan bir çalışmada CAT aktivitesinin diyabetli olanlarda olmayanlara göre % 17 oranında daha düşük bulunmuştur (60). Halifeoğlu ve arkadaşları (66), tip 2 diyabetli hastalarda SOD ve CAT aktivitelerinin düştüğünü ve tedavi sonrasında önemli derecede arttığını, GSH-Px değerlerinde ise tedavi öncesi ile sonrası arasında önemli bir fark olmadığını belirtmişlerdir. Buna karşın tip 2 diyabetlilerde lipid peroksidasyonu ve CAT aktivitesinin arttığını, GSH-Px aktivitesinin düştüğünü ve SOD aktivitesinde ise önemli bir değişikliğin bulunmadığını bildiren çalışmalar mevcuttur (88,110).

Özellikle CAT aktivitesindeki farklı sonuçların elde edilmiş olması her çalışma grubundaki bireylerin oksidatif stres durumları ile ilişkili olabilir. Zira CAT aktivitesindeki artışın vücudun oksidatif stresi dengelemek amacıyla ortaya koyduğu bir savunma mekanizması olabilir. Dolayısı ile daha hafif oksidatif stres durumlarında CAT aktivitesi önemli derecede artış göstermeyebilir. Katalazın  $H_2O_2$ 'e karşı  $K_m$ 'i glutatyon peroksidaza göre daha yüksek olduğundan düşük konsantrasyonlarda  $H_2O_2$ 'i glutatyon peroksidaz parçalarken, yüksek konsantrasyonlarda ise katalaz devreye girer (111). Bu çalışmada diyabetik grupta

katalaz aktivitesinin artmamış olması muhtemelen hastaların büyük bir çoğunluğunun insülin veya oral diyabetik kullanmaları nedeni ile kan glukoz düzeyinin kontrol altında tutulmuş olması ve dolayısı ile serbest radikal üretiminin aşırı olmaması ve oluşmuş olan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in de bu moleküle karşı Km'si daha düşük olan GSH-Px tarafından katalazın ekspresyonunda bir artışa neden olmasına gerek kalmadan bertaraf edilmesi olabilir.

GSH-Px aktivitesinin tip 2 diyabette düştüğünü bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur (35,88,110). Çalışmamızda da GSH-Px aktivitesi diyabet grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0.01). GSH-Px aktivitesinin düşük olması bu enzimin oksidatif strese karşı mücadele etmesinden kaynaklanabilir (63). Fizyolojik değerlerde üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in en önemli yıkım mekanizması Glutasyon sistemidir. GSH-Px selenyum bağımlı bir enzim olup diyet veya başka nedenlerden oluşabilecek herhangi bir dokudaki Se eksikliği bulunması halinde bu enzimin aktivitesinde azalmaya neden olabilir. İnsülin yetersizliğinde yağ asitlerinin β oksidasyonunu ve bunun sonucunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretiminde artışa neden olur (63). Lipid peroksid düzeylerindeki artış GSH-Px düzeylerinde de artışa neden olur ve bu şekilde vücudun oksidatif sisteme karşı savunması devam etmiş olur (63). Ancak GSH-Px aktivitesindeki düşüş glukozun kullanılmaması sonucu pentoz fosfat metabolik yolunun yavaşlaması ve daha az NADPH üretilmesi, bunun sonucu olarak da okside glutasyonun glutasyon redüktaz tarafından indirgenmesindeki azalma nedeniyle de olabilir (35).

Diyabette artan oksidatif stresten dolayı serbest radikal üretimi artar (143). Serbest radikaller yüksek reaktivitelerinden dolayı membranların yapısında bulunan doymamış yağ asitleri ile etkileşime girerek peroksidasyonu başlatmaktadır. Oluşan

lipid peroksitleri kolaylıkla yıkılarak başta MDA olmak üzere birçok ürünler meydana getirirler. Bu ürünlerin birçoğu hızla yıkılarak başka ürünlere dönüşmeleri nedeni ile saptanmaları zorlaşır ve bu çalışmada lipid peroksidasyonun göstergesi olarak TBA reaksiyonu ile MDA düzeyleri ölçüldü. MDA, diyabet hastalarında oksidan/antioksidan durumun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Diyabet hastalarında MDA düzeyleri ile ilgili literatürde farklı sonuçlar bildirilmektedir. Önemli derecede artışların olduğunu bildiren çalışmalar (63,88,122,152) olduğu gibi normal düzeylerde kaldığını belirten çalışmalar da (16) mevcuttur. Hipergliseminin proteinlerde kimyasal değişimlere ve lipid peroksidasyonunda artışa sebep olduğu pek çok deneysel çalışma ile ortaya konmuştur (79). PON 1 enziminin yüksek düzeylerde ekspresyonunun LDL'leri oksidasyona karşı koruyucu etkisinin olup olmadığını araştırmak amacı ile yüksek düzeyde PON 1 ekspresyonu yapabilen transgenik fareler oluşturulmuş ve PON 1 düzeylerindeki artışın *in vivo* koşullarda antioksidatif ve antiaterojenik etkileri olduğu gösterilmiştir (118). PON 1 enziminin lipid peroksitlerin LDL üzerinde birikmelerinden önce elimine ettiği düşünülmektedir (98).

Lipid peroksidasyonunun PON 1 L/M 55 ve Q/R 192 polimorfizmlerinden nasıl etkilendiğine dair yapılan bir çalışmada (5) lipid peroksidasyon düzeyinin kontrol ve diyabet hastalarında MM ve QQ genotipi taşıyan bireylerde en yüksek değerlerde olduğu bildirilmiştir. Bu bulguların aksine Mackness ve arkadaşları (102), MM ve QQ genotiplerdeki PON 1 enziminin lipid peroksidasyonuna karşı en yüksek derecede etki gösterdiğini bildirmiştir. Çalışmamızda lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA düzeyleri kontrol grubuna göre diyabet hastalarında önemli derecede yüksek bulunmuştur( $p < 0.001$ ). Genotiplere göre incelendiğinde kontrol

grubu ve diyabet hastalarında en yüksek MDA düzeyleri MM ve QR genotipi taşıyan bireylerde tespit edilmiştir. Buna karşılık MM ve RR genotipine sahip bireylerin PON 1 enzimlerinin diğer genotiplere göre daha yüksek paraoksonaz aktivitesine sahip olmalarına rağmen *in vitro* koşullarda LDL oksidasyonuna karşı en düşük etki gösterdikleri bildirilmiştir (102). Çalışmamızda elde edilen bulguların Ağaçhan ve arkadaşlarının (5) bulgularına daha yakın ve Mackness ve arkadaşlarının (102) bulgularından farklı olmasının nedeni birinci çalışmanın bizim çalışmamız gibi *in vivo* koşullarda ve ikinci çalışmanın *in vitro* koşullarda yapılmış olmasının sonucu olabilir. Aynı zamanda *in vivo* ve *in vitro* koşullardaki farklı sonuçların nedeni PON 1 enziminin lipid peroksidasyonundaki artışa veya düşüğe neden olan tek etken olmadığını, başka faktörlerin bu değişimde rol aldığını göstermektedir.

Lipid peroksidasyonu ve antioksidan duruma göre grupların Q/R 192 genotip dağılımları incelendiğinde her iki grupta en yüksek PON 1, SOD ve CAT enzim aktiviteleri RR homozigot bireylerde görülürken en düşük değerler QQ homozigot bireylerde görülmüştür. GSH-Px aktivitesi kontrol grubunda QQ homozigot bireylerde en yüksek ve RR homozigot bireylerde en düşük bulunurken diyabet grubunda en yüksek GSH-Px düzeyleri RR homozigot genotipinde, en düşük düzeyler QR heterozigot bireylerde görüldü. MDA düzeyleri kontrol ve diyabet grubunda QR heterozigot bireylerde en yüksek bulunurken kontrol grubunda QQ homozigot bireylerde, diyabet grubunda RR homozigot bireylerde en düşük düzeylerde bulundu. Sonuçta, GSH-Px aktivitesindeki artış ile MDA düzeylerindeki azalmanın birlikte paralellik göstermesi, kontrol grubunda QQ genotipinin, diyabet grubunda ise RR genotipinin oksidatif strese karşı koruyucu gücünün daha yüksek olduğunu düşündürmektedir.

Lipid peroksidasyonu ve antioksidan durum L/M 55 genotipine göre incelendiğinde, her iki grupta en yüksek PON 1 aktivitesi LL homozigot bireylerde görülürken en düşük PON 1 aktivitesi MM homozigot bireylerde görülmüştür. Kontrol grubunda en yüksek CAT aktivitesi LL homozigot bireylerde görülürken aynı grupta en yüksek GSH-Px aktiviteleri ve MDA düzeyleri MM homozigot bireylerde görülmüştür. Diyabet grubunda en yüksek SOD aktivitesi LM heterozigot bireylerde, en yüksek GSH-Px aktiviteleri LL homozigot bireylerde ve en yüksek MDA düzeyleri MM homozigot bireylerde görüldü. Diyabet grubunda GSH-Px aktivitesindeki artış ile MDA düzeylerinde azalma birbirlerine paralellik göstermektedir. Kontrol grubunda ise GSH-Px aktivitesi artışı ile birlikte MDA düzeylerinde de artış görülmektedir. Sonuçta, diyabetik grupta LL genotipine sahip bireylerin MDA düzeylerinin azalması ve eritrosit GSH-Px aktivitelerinin artması oksidatif strese karşı bu genotipin koruyucu bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Diyabette insülin fonksiyonundaki eksiklik ve hiperglisemi lipoprotein düzeylerinde değişikliklere neden olur. Tip 2 diyabette görülen başlıca lipoprotein değişikliği HDL düzeylerinin düşmesi ve trigliserid düzeylerindeki artıştır (55).

PON 1 enziminin LDL oksidasyonunu engellediği ve Q/R 192 polimorfizminin ateroskleroz ile ilişkisi olduğu ve RR genotipinin koroner kalp hastalığı için bağımsız bir faktör olduğu birçok çalışmada iddia edilmiştir (119,137,140,146). Buna karşılık PON 1 L/M 55 polimorfizminin koroner kalp hastalıkları ile ilişkisine yönelik çalışmaların sayısı az olmakla birlikte LL genotipinin hastalık riskini artırdığı bildirilmiştir (21).

Çalışmamızda diyabet ve kontrol grupları arasında PON 1 Q/R 192 ve L/M 55 polimorfizmlerinin dağılımlarında önemli bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). Ancak,

diyabet grubunda, kontrol grubuna göre HDL-kolesterol düzeylerinde önemli bir fark görülmemekle birlikte ( $p>0.05$ ) kolesterol, LDL-kolesterol ve trigliserid düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu( $p<0.001$ ). Q/R 192 polimorfizmlerinin tip 2 diyabet hastalarında ve diyabetik olmayan bireylerde HDL, LDL ve kolesterol ile trigliserit düzeyleri üzerine etkileri incelendiğinde bazı önemli farklılıkların bulunduğu ve özellikle Q allel varlığının daha düşük aterojenik lipid profiline neden olduğu görüldü. Kontrol grubunda en düşük LDL-kolesterol, kolesterol ve trigliserid düzeyleri düşük paraoksonaz aktivite gösteren QQ genotipinde görülürken en yüksek kolesterol ve trigliserid düzeyleri orta derecede paraoksonaz aktivitesi gösteren QR genotipinde ve en yüksek LDL-kolesterol düzeyleri yüksek paraoksonaz aktiviteli RR genotipi taşıyan bireylerde tespit edildi. Diyabet grubunda en düşük LDL-kolesterol ve trigliserid düzeyleri yüksek paraoksonaz aktiviteli RR genotipinde, en düşük kolesterol düzeyleri ise düşük aktiviteli QQ homozigot genotipinde görülürken en yüksek LDL-kolesterol, kolesterol ve trigliserid düzeyleri orta derecede paraoksonaz aktiviteli QR genotipinde görüldü. Bu değişimlerin hemen hemen aynı sırayı takip ettiği göz önünde bulundurulduğunda Q/R 192 polimorfizminin kontrol ve diyabet grupları içerisinde lipoproteinler üzerine belirleyici bir faktör olduğunu göstermektedir. Genetik olarak izole bir yapı gösteren bir topluluğun sağlıklı bireyleri üzerinde yapılan bir çalışmada (71), PON 1 Q/R 192 polimorfizminin lipoprotein düzeyleri üzerinde önemli etkileri olduğu bulunmuş ve düşük paraoksonaz aktiviteli QQ homozigot bireylerin QR heterozigot ve yüksek aktiviteli RR homozigot bireylere göre önemli derecede düşük trigliserid, LDL-kolesterol apo B düzeylerine sahip oldukları bildirilmiştir. Sağlıklı Çin'liler üzerinde yapılan bir araştırmada (139), düşük aktiviteli homozigot olarak sınıflandırılan bireylerin heterozigot ve yüksek

aktiviteli homozigot bireylerden daha düşük apoB ve trigliserit düzeylerine sahip oldukları bildirilmiştir. Ancak kolesterol düzeyleri bizim çalışmamızda düşük aktiviteli QQ homozigot bireylerde düşük bulunurken bu çalışmada (139) yüksek aktiviteli RR homozigot bireylerde daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki kontrol grubu sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Türkiye’de yapılan bir çalışmada (4), kontrol grubunda en yüksek kolesterol düzeyleri bizim sonuçlarımıza paralel şekilde QR heterozigot bireylerde bulunurken en yüksek trigliserit QQ homozigot bireylerde ve en yüksek LDL-kolesterol düzeyleri ise QR heterozigot bireylerde bulunmuştur.

Kontrol grubuna göre diyabet grubundaki QQ homozigot bireylerin LDL-kolesterol ( $p<0.01$ ), kolesterol ( $p<0.0001$ ) ve trigliserid ( $p<0.0001$ ) düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Ağaçhan ve arkadaşlarının (5) sonuçları da bu çalışmanın sonuçları ile uyumludur. Diyabet grubu içerisinde Q/R 192 polimorfizmlerinin plazma lipoprotein düzeylerine etkileri incelendiğinde; istatistiksel olarak anlamlı farklar bulunmamakla birlikte Ağaçhan ve arkadaşları’nın (4) bulgularına benzer şekilde LDL- kolesterol ve trigliserid düzeylerinin RR homozigot bireylerde, kolesterol düzeylerinin QQ homozigot bireylerde en düşük olduğu görüldü. Ancak çalışmamızda en düşük kolesterol düzeyleri QQ homozigot bireylerde bulunurken Ağaçhan ve arkadaşları (4) nın çalışmasında en düşük kolesterol düzeylerinin QR heterozigot bireylerde olduğu bildirilmiştir.

PON 1 L/M 55 polimorfizminin plazma lipoproteinleri ile ilişkisini araştıran çalışmaların sayısı sınırlıdır (4). Çalışmamızda HDL-kolesterol düzeyleri bakımından diyabet grubu ile kontrol grubu arasında ve gruplar içerisinde istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadı. Diyabet grubundaki LL homozigot bireylerin kolesterol

( $p < 0.01$ ) ve trigliserid ( $p < 0.01$ ) düzeylerinin kontrol grubundaki LL homozigot bireylerin aynı parametrelerine göre istatistiksel yönden anlamlı derecede yüksek olduğu bulunurken diyabetik grubun LDL- kolesterol düzeyleri; kontrol grubundaki genotiplerin düzeylerine göre de yüksek bulunmuştur. Ancak bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ( $p > 0.05$ ). Grup içi genotip-lipoprotein düzeyleri ilişkisi incelendiğinde hem kontrol grubunda hem de diyabet grubunda LDL-kolesterol, kolesterol ve trigliserid düzeylerinin MM homozigot bireylerde en yüksek olduğu görüldü. Kontrol grubunda en düşük kolesterol ve trigliserid düzeyleri LM heterozigot bireylerde görülürken en düşük LDL-kolesterol düzeyleri LL homozigot bireylerde görüldü. Diyabet grubunda en düşük LDL-kolesterol ve trigliserit düzeyleri LM heterozigot bireylerde görülürken en düşük kolesterol düzeyleri LL homozigot bireylerde bulundu. Trigliserid düzeylerinin kontrol ve diyabet grubunda  $MM > LM > LL$  sırasını izlediği görüldü. Her iki grupta M allel varlığının plazma lipoprotein düzeylerinde artışa neden olduğu görülmektedir. Ağaçhan ve arkadaşları (4)'nin bulguları kontrol grubunda MM allel varlığının kolesterol ve trigliserid düzeylerinde artışa, LDL-kolesterol düzeylerinde düşüşe neden olduğunu göstermektedir. Diyabet grubunda ise bizim bulgularımız ile zıt sayılabilecek sonuçlar bildirilmektedir. En düşük LDL- kolesterol, kolesterol ve trigliserid düzeylerinin MM homozigot bireylerde görüldüğü bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulguların diğer çalışma bulguları ile tamamen uyum içerisinde olmadığı görülmektedir. Bu farklılıkların birçok nedeni olabilir. Plazma lipoprotein düzeylerindeki değişikliklerin nedenleri arasında genetik faktörler kadar çevresel faktörler, beslenme alışkanlıkları ve yaşam tarzı gibi çalışmaya alınan gruplar arasında çok değişebilen genetik olmayan faktörler de önemli rol oynamaktadır. İlk

olarak PON 1 polimorfizmlerinin bireylerin kolesterol düzeylerinde yaklaşık % 1'lik bir değişime neden olabileceği bildirilmiş olup (71) genetik faktörlerin plazma lipoprotein düzeylerine etkisinin araştırıldığı daha geniş çaplı bir çalışmada PON 1 geninin plazma lipoprotein düzeylerinde % 3.2 ile % 7.8 kadar değişmesine neden olan 9 genden birisi olduğu vurgulanmıştır (70). Pavkovic ve arkadaşları (124), hiperlipidemili hastaların % 75'inde PON 1 aktivitesinin düşük olduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlar PON 1 enzim aktivitesinin plazma lipoproteinleri ile bir ilişkisi olduğunu göstermekte fakat bu ilişkinin mekanizması tam olarak aydınlatılması gereken bir konu olarak durmaktadır. Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre diyabetik olmayan bireylerin oluşturduğu kontrol grubunda R ve M allel varlığı, diyabet grubunda Q ve M allel varlığı daha kötü bir plazma lipoprotein profiline neden olmaktadır. Her iki grupta MM homozigot bireylerin en kötü plazma lipoprotein profiline sahip oldukları görülmektedir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular birlikte ele alındığında;

-PON 1 L/M 55 ve Q/R 192 polimorfizmlerinin tip 2 diyabet hastaları ile diyabetik olmayan sağlıklı kontrol grubu arasında genotip dağılımı ve allel sıklığı bakımından önemli bir fark bulunmadı. PON 1 genotip ve allel dağılımının kontrol ve diyabet gruplarında farklı olmaması PON 1 L/M 55 ve Q/R 192 genotiplerinin diyabete yatkınlık için bağımsız bir risk faktörü olmadığını göstermektedir.

-PON 1 enziminin paraoksonaz aktivitesi her iki grupta RR ve LL homozigot bireylerde en yüksek, QR ve LM heterozigot bireylerde orta derecede ve QQ ve MM homozigot bireylerde en düşük düzeylerde bulundu.

-Diyabet hastalarında lipid peroksidasyonu önemli derecede artmaktadır.

- Diyabet hastalarında, kontrol grubuna göre eritrosit CAT aktivitesi ve GSH-Px aktivitesi istatistiksel yönden azalmış olarak bulunurken eritrosit SOD aktivitelerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Diyabette SOD aktivitelerinde önemli değişikliklerin görülmemesi diyabet hastalarında kan glukoz düzeylerinin iyi kontrol edilmesinin sonucu olduğu düşünülebilir.

-Diyabet hastalarında plazma lipoproteinlerinden HDL-kolesterol düzeylerinde önemli değişiklikler gözlenmezken LDL-kolesterol, kolesterol ve trigliserit düzeylerinde önemli derecede artışlar gözlemlendi. Kontrol grubunda R ve M allel varlığı, diyabet grubunda Q ve M allel varlığı daha kötü bir plazma lipoprotein profiline neden olurken her iki grupta MM homozigot bireylerin en kötü plazma lipoprotein profiline sahip oldukları görüldü.

Sonuç olarak, bu çalışmada elde edilen bulgulara göre PON 1 geninin kodlayan bölgesindeki L/M 55 ve Q/R 192 polimorfizmlerinin PON 1 enziminin paraoksonaz aktivitesi üzerine önemli etkileri olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Ancak bu polimorfizmlerin PON 1 enziminin antioksidan fonksiyonu, tip 2 diyabet gelişme riski, diyabette görülen oksidan-antioksidan sistemindeki değişiklik, lipoprotein düzeylerindeki değişimler ile doğrudan ilişkilendirilmesi zordur. Sonuç olarak, PON 1 enziminin kodlayan bölgelerindeki polimorfizmlerden başka promotör bölgesinde görülen 5 polimorfizmin enzimin paraoksonaz aktivitesi ve antioksidan fonksiyonunda rolleri vardır. Ayrıca aynı ailenin diğer üyeleri olan PON 2 ve PON 3 enzimlerinin antioksidan etkileri olduğu bilinmektedir. PON 1 enziminin tip 2 diyabetin patogenezindeki rolünün net olarak ortaya konabilmesi için kodlayan bölgedeki polimorfizmler ile birlikte promotör bölgesinde görülen polimorfizmlerin ve PON 2 ile PON 3 gibi genetik faktörler ile birlikte çalışma gruplarının PON 1

aktivitesi üzerinde doğrudan etkili oldukları bilinen beslenme alışkanlıkları, egzersiz durumu, sigara içme durumu gibi genetik olmayan faktörlerin de incelenmesi önemli derecede yararlı bilgiler elde edilmesine imkan sağlayacaktır.

## 7. KAYNAKLAR

1. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. (1995). Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995 Nov;15(11):1812-1818.
2. Abou-Seif MA, Youssef AA. (2004). Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta.* 346(2):161-170.
3. Aebi H. (1984). Catalase. In vitro. *Methods in enzymology.* 105: 121-126.
4. Agachan B, Yilmaz H, Karaali Z, Isbir T. (2004). Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct.* 22(3):163-168.
5. Agachan B, Yilmaz H, Ergen HA, Karaali ZE, Isbir T. (2005). Paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and its effects to oxidant-antioxidant system in turkish patients with type 2 diabetes mellitus. *Physiol Res.* 2005;54(3):287-293.
6. Ak G, Ozgonul M, Sozmen EY, Aslan SL, Sozmen B. (2002). Renal cortical thickness and PON1 activity both decrease in chronic renal failure. *J Nephrol.* 15(2):144-149.
7. Akkuş İ. (1995). Serbest radikaller ve fizyolojik etkileri. 1. baskı. Mimoza Yayınları, Konya.
8. Alper G. Diyabet. Onat T, Emerk K, Sözmen EY (editors). İnsan Biyokimyası. 2.baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 280-290.
9. Altan N, Dinçer AS, Koca C. (2006). Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi.* 31(2):51-56.
10. American Diabetes Association. (2007). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, volume 30, supplement 1: S42-S47.
11. Antikainen M, Murtomaki S, Syvanne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, Frick MH, Ehnholm C. (1996). The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. *J Clin Invest.* 98(4):883-835.
12. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Erogul J, Hsu C, Dunlop C, La Du B. (1998). Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18(10):1617-1624.

13. Aviram M, Rosenblat M. (2004). Paraoxonases 1, 2, and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol Med.* 2004 Nov 1;37(9):1304-1316.
14. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. (2001). Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem.* 2001 Feb;34(1):65-70.
15. Balcı Ekmekçi Ö, Donma O, Ekmekçi H. (2004). Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 35(2):78-82.
16. Bates JH, Young IS, Galway L, Traub AI, Hadden DR. (1997). Antioxidant status and lipid peroxidation in diabetic pregnancy. *Br J Nutr.* 78(4):523-532.
17. Bennett PH, Knowler WC. Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and glucose homeostasis. (2005). Khan CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ (editors). *Joslin's Diabetes Mellitus.* 14<sup>th</sup> ed. Boston. Lippincott William and Wilkins, 333-339.
18. Bergmeier C, Siekmeier R, Gross W. (2004). Distribution spectrum of paraoxonase activity in HDL fractions. *Clin Chem.* 50(12):2309-2315.
19. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. (1997). The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmacol.* 29(3):315-331.
20. Blatter Garin MC, Abbott C, Messmer S, Mackness M, Durrington P, Pometta D, James RW. (1994). Quantification of human serum paraoxonase by enzyme-linked immunoassay: population differences in protein concentrations. *Biochem J.* 304 (2):549-554.
21. Blatter Garin MC, James RW, Dussoix P. et al. (1997). Paraoxonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased cardiovascular risk in diabetes. *J Clin Invest* 99:62-66.
22. Blatter Garin MC, Moren X, James RW. (2006). Paraoxonase-1 and serum concentrations of HDL-cholesterol and apoA-I. *J Lipid Res.* 47(3):515-520.
23. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE. (2001). Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics.* 11(1):77-84.
24. Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414(6865):813-820.

25. Bukan N, Sancak B, Bilgihan A, Kosova F, Bugdayci G, Altan N. (2004). The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 26(7):519-522.
26. Cao H, Girard-Globa A, Berthezene F, Moulin P. (1999). Paraoxonase protection of LDL against peroxidation is independent of its esterase activity towards paraoxon and is unaffected by the Q-->R genetic polymorphism. *J Lipid Res.* 40(1):133-139.
27. Cameron NE, Cotter MA. (1999). Effects of antioxidants on nerve and vascular dysfunction in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 45:137–146.
28. Carr A, Frei B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J.* 13(9):1007-1024.
29. Cascorbi I, Laule M, Mrozikiewicz PM, Mrozikiewicz A, Andel C, Baumann G, Roots I, Stangl K. (1999). Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages, and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics.* 9(6):755-761.
30. Castellani LW, Navab M, Van Lenten BJ, Hedrick CC, Hama SY, Goto AM, Fogelman AM, Lusis AJ. (1997). Overexpression of apolipoprotein AII in transgenic mice converts high density lipoproteins to proinflammatory particles. *J Clin Invest.* 100(2):464-474.
31. Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL. (1997). Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest.* 27(2):97-108.
32. Cheeseman, K.H. Slater, T.F. (1993). An introduction free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* 49 (3): 481-493.
33. Cherry N, Mackness M, Durrington P, Povey A, Dippnall M, Smith T, Mackness B. (2002). Paraoxonase (PON1) polymorphisms in farmers attributing ill health to sheep dip. *Lancet.* 359(9308):763-764.
34. Craven PA, DeRubertis FR. (1989). Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest* 83:1667–1675.
35. Çiğremiş Y, Köse M, Özügürlü F, Türköz Y, Eğri M. (2003). Tip 2 diabetes mellituslu hastaların eritrosit içi Cu,Zn SOD, CAT ve GSH-Px antioksidan enzim düzeylerinin araştırılması. *G.Ü. Fen Bilimleri Dergisi.* 16(2):239-244.
36. Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. (2003). Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(11):2083-2089.

37. Deakin SP, James RW. (2004). Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci (Lond)*. 107(5):435-447.
38. Değer O, Örem A. Lipidlerin taşınması ve depolanması. Onat T, Emerk K, Sözmen EY (editörler). *İnsan Biyokimyası*. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002: 328-345.
39. Draganov DI, La Du BN. (2004). Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 369:78-88.
40. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. (2000). Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem*. 275(43):33435-33442.
41. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. (2001). Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 21(4):473-480.
42. Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN. (1983). The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet*. 35(2):214-227.
43. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Striegl G, Waeg G. (1991). Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am J Clin Nutr*. ;53(suppl):314S-321S.
44. Fairbank VF, Farais RN. (1986). Biochemical aspects of Hematology. Ed. N.W. Tietz in: "Textbook of Clinical Chemistry", 2<sup>nd</sup> ed. W.B. Saunders Company. P:1506-1507.
45. Ferre N, Tous M, Paul A, Zamora A, Vendrell JJ, Bardaji A, Camps J, Richart C, Joven J. (2002). Paraoxonase Gln-Arg(192) and Leu-Met(55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease. *Clin Biochem*. 35 (3):197-203.
46. Florence TM (1995). The role of free radicals in disease. *Aust N Z J Ophthalmol*. 23 (1): 3-7.
47. Frei B. (1994). Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*. 97(3A):5S-13S.
48. Furlong CE, Cole TB, Jarvic GP, Costa LG. (2002). Pharmacogenetics considerations of the paraoxonase polymorphisms. *Pharmacogenomics*. 3:341-348.
49. Furlong CE, Costa LG, Hassett C, Richter RJ, Sundstrom JA, Adler DA, Disteché CM, Omiecinski CJ, Chapline C, Crabb JW, Humber R. (1993). Human and rabbit paraoxonases: purification, cloning, sequencing, mapping and role of polymorphism in organophosphate detoxification. *Chemi Biol. Interact*. 87:35-48.

50. Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Costa LG, Motulsky AG. (1989). Spectrophotometric assays for the enzymatic hydrolysis of the active metabolites of chlorpyrifos and parathion by plasma paraoxonase/arylesterase. *Anal Biochem.* 180(2):242-247.
51. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos.* 19(1):100-106.
52. Gardemann A, Philipp M, Hess K, Katz N, Tillmanns H, Haberbosch W. (2000). The paraoxonase Leu-Met54 and Gln-Arg191 gene polymorphisms are not associated with the risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis.* 152(2):421-431.
53. Geldmacher-von Mallinckrodt M, Petenyi M, Flugel M, Burgis H, Dietzel B, Metzner H, Nirschl H, Renner O. (1973). On the specificity of human serum paraoxonase. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 354(3):337-340.
54. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. (1996). BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 97(6):1422-1428.
55. Ginsberg HN. (1996). Diabetic dyslipidemia: basic mechanisms underlying the common hypertriglyceridemia and low HDL cholesterol levels. *Diabetes.* 45(Suppl 3):S27-S30.
56. Girotti AW. (1998). Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 39(8):1529-1542.
57. Gokkusu C, Palanduz S, Ademoglu E, Tamer S. (2001). Oxidant and antioxidant systems in NIDDM patients: influence of vitamin E supplementation. *Endocr Res.* 27(3):377-386.
58. Golik A, Cohen N, Ramot Y, Maor J, Moses R, Weissgarten J, Leonov Y, Modai D. (1993). Type II diabetes mellitus, congestive heart failure, and zinc metabolism. *Biol Trace Elem Res.* 39(2-3):171-175.
59. Gopalakrishna R, Jaken S. (2000). Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 28:1349-1361.
60. Goth L, Toth Z, Tarnai I, Berces M, Torok P, Bigler WN. (2005). Blood catalase activity in gestational diabetes is decreased but not associated with pregnancy complications. *Clin Chem.* 51(12):2401-2404.
61. Greene DA, Sima AA, Stevens MJ, Feldman EL, Lattimer SA. (1992). Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes Care* 15:1902-1925.

62. Guerrero-Romero F, Rodriguez-Moran M. (2005). Complementary therapies for diabetes: the case for chromium, magnesium, and antioxidants. *Arch Med Res.* 36(3):250-257.
63. Gupta M, Chari, S. (2006). Proxidant and antioxidant status in patients of type II diabetes mellitus with IHD. *Indian Journal of Clinical Biochemistry.* 21(2):118-122.
64. Gülcü F, Gürsu MF. (2003). Paraoksonaz ve arilesteraz aktivite ölçümlerinin standardizasyonu. *Türk Biyokimya Dergisi.* 28(2):45-49.
65. Haley RW, Billecke S, La Du BN. (1999). Association of low PON1 type Q (type A) arylesterase activity with neurologic symptom complexes in Gulf War veterans. *Toxicol Appl Pharmacol.* 157(3):227-233.
66. Halifeoğlu İ, Karataş F, Çolak R, Canatan H, Telo S. (2005). Tip 2 diyabetik hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası oksidan ve antioksidan durum. *Fırat Tıp Dergisi.* 10(3):117-122.
67. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, Brumshtein B, Khersonsky O, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL, Tawfik DS. (2004). Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol.* 11(5):412-419.
68. Hasselwander O, Savage DA, McMaster D, Loughrey CM, McNamee PT, Middleton D, Nicholls DP, Maxwell AP, Young IS. (1999). Paraoxonase polymorphisms are not associated with cardiovascular risk in renal transplant recipients. *Kidney Int.* 56(1):289-298.
69. He XM, Zhang ZX, Zhang JW, Zhou YT, Tang MN, Wu CB, Hong Z. (2006). Gln192Arg polymorphism in paraoxonase 1 gene is associated with Alzheimer disease in a Chinese Han ethnic population. *Chin Med J (Engl).* 119(14):1204-1209.
70. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. (1995). A polymorphism of the paraoxonase gene associated with variation in plasma lipoproteins in a genetic isolate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(1) :89-95.
71. Hegele RA, Brunt JH, Connelly PW. (1995). Multiple genetic determinants of variation of plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(7):861-871.
72. Herrmann SM, Blanc H, Poirier O, Arveiler D, Luc G, Evans A, Marques-Vidal P, Bard JM, Cambien F. (1996). The Gln/Arg polymorphism of human paraoxonase (PON 192) is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study. *Atherosclerosis.* 126(2):299-303.

73. Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, Holloway B, Karschimkus C, Jenkins AJ, Silink M, Donaghue KC. (2006). Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabetes Complications*. 20(5):322-328.
74. Humbert R, Adler DA, Distèche CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. (1993). The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet*. 3(1):73-76.
75. Hunt JV, Wolff SP. (1991). Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications. *Free Radic Res Commun*. 12-13 (1):115-123.
76. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arai K, Ito H, Kumon Y, Hashimoto K. (1998). Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*. 47(5):598-602.
77. Ikeda Y, Suehiro T, Ohsaki F, Arai K, Kumon Y, Hashimoto K. (2003). Relationships between polymorphisms of the human serum paraoxonase gene and insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 60(2):79-85.
78. Inoue M, Suehiro T, Nakamura T, Ikeda Y, Kumon Y, Hashimoto K. (2000). *Metabolism*. 49(11):1400-1405.
79. Jain SK, Lim G. (2001). Pyridoxine and pyridoxamine inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radic Biol Med*. 30(3):232-237.
80. James RW, Blatter Garin MC, Calabresi L, Miccoli R, von Eckardstein A, Tilly-Kiesi M, Taskinen MR, Assmann G, Franceschini G. (1998). Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis*. 139(1):77-82.
81. James RW, Leviev I, Righetti A. (2000). Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 101(19):2252-2257.
82. Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Furlong CE. (2002). Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22(8):1329-1333.
83. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*. 29;4(1):5.
84. Juretic D, Motejlkova A, Kunovic B, Rekić B, Flegar-Mestric Z, Vujic L, Mesic R, Lukac-Bajalo J, Simeon-Rudolf V. (2006). Paraoxonase/arylesterase in serum of patients with type II diabetes mellitus. *Acta Pharm*. 56(1):59-68.

85. Kalmar T, Seres I, Balogh Z, Kaplar M, Winkler G, Paragh G.(2005). Correlation between the activities of lipoprotein lipase and paraoxonase in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab.* 31(6):574-580.
86. Kao YL, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M. (1998). A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(7):2589-2592.
87. Kavas G.Ö. (1989). Serbest radikaller ve organizma üzerine etkileri. *Türkiye Klinikleri.* 9 (1): 1-8.
88. Kesavulu MM, Giri R, Kameswara Rao B, Apparao C. (2000). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme levels in type 2 diabetics with microvascular complications. *Diabetes Metab.* 26(5):387-392.
89. Khersonsky O, Tawfik DS. (2006). The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem.*281(11):7649-7656.
90. Klotz MG, Loewen PC. (2003). The molecular evolution of catalatic hydroperoxidases: evidence for multiple lateral transfer of genes between prokaryota and from bacteria into eukaryota. *Mol Biol Evol.* 20(7):1098-1112.
91. Komosinska-Vassev K, Olczyk K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K. (2005). Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 68(3):207-216.
92. Kujiraoka T, Oka T, Ishihara M, Egashira T, Fujioka T, Saito E, Saito S, Miller NE, Hattori H. (2000). A sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for human serum paraoxonase concentration. *J Lipid Res.* 41(8):1358-1363.
93. Kumon Y, Suehiro T, Ikeda Y, Hashimoto K.(2003). Human paraoxonase-1 gene expression by HepG2 cells is downregulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but is upregulated by interleukin-6. *Life Sci.*73(22):2807-2815.
94. Kutlu M, Naziroglu M, Simsek H, Yilmaz T, Sahap Kukner A. (2005). Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic-rat. *Int J Vitam Nutr Res.* 75(1):71-80.
95. La Du BN, Adkins S, Kuo CL, Lipsig D. (1993). Studies on human serum paraoxonase/arylesterase. *Chem Biol Interact.* 87(1-3):25-34.
96. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ. (1999). On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact.* 119-120:379-388.
97. Leviev I, Deakin S, James RW. (2001). Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J Lipid Res.* 42(4):528-535.

98. Li HL, Liu DP, Liang CC. (2003). Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med.* 81(12):766-779.
99. Li WF, Furlong CE, Costa LG. (1995). Paraoxonase protects against chlorpyrifos toxicity in mice. *Toxicol Lett.* 76(3):219-226.
100. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. (1997). Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol.* ;122(2):265-268.
101. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, Miller JE, Boulton AJ, Durrington PN. (1998). Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 139(2):341-349.
102. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. (1998). Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett.* 423(1):57-60.
103. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. (1993). Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by high-density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis.* 104(1-2):129-135.
104. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. (1996). Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol.* 7(2):69-76.
105. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. (2002). Paraoxonase and coronary heart disease. *Atheroscler Suppl.* 3(4):49-55.
106. Mackness MI, Peuchant E, Dumon MF, Walker CH, Clerc M. (1989). Absence of "A"-esterase activity in the serum of a patient with Tangier disease. *Clin Biochem.* 22(6):475-478.
107. Mackness MI, Thompson HM, Hardy AR, Walker CH. (1987). Distinction between A-esterases and arylesterases. Implications for esterase classification. *Biochem J.* 245(1):293-296.
108. Marchesani M, Hakkarainen A, Tuomainen TP, Kaikkonen J, Pukkala E, Uimari P, Seppala E, Matikainen M, Kallioniemi OP, Schleutker J, Lehtimaki T, Salonen JT. (2003). New paraoxonase 1 polymorphism I102V and the risk of prostate cancer in Finnish men. *J Natl Cancer Inst.* 95(11):812-818.
109. Matkovics B, Kotormán M, Varga IS, Hai DQ, Salgó L, Novák Z. (1997). Pro-, antioxidant and rheologic studies in the blood of type 2 diabetic patients. *Acta Physiol Hung.* 85(2):107-112.

110. Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I. (2003). Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct.* 21(3):291-296.
111. Memişoğulları R. (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi.* 3:30-39.
112. Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. (1994). Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* 17(3): 235 -248.
113. Mueller RF, Hornung S, Furlong CE, Anderson J, Giblett ER, Motulsky AG. (1983). Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical, and linkage studies. *Am J Hum Genet.* 35(3):393-408.
114. Nalçacı, E. (1991). Kan-Beyin Bariyerinin Yıkılışında Serbest Oksijen Radikallerinin Rolü. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziyojji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Ankara.
115. Nevin DN, Zambon A, Furlong CE, Richter RJ, Humbert R, Hokanson JE, Brunzell JD. (1996). Paraoxonase genotypes, lipoprotein lipase activity, and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16 (10):1243-1249.
116. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. (2005). The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 38(2):153-163.
117. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. (2001). Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 276(48):44444-44449.
118. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. (2002). Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun.* 290(3):921-927.
119. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. (1997). Paraoxonase polymorphism (Gln192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(7):2257-2260.
120. Özişik M. (2005). Bazal/Bolus İnsülin Tedavisine Geçilen Tip 2 Diyabetlilerde İnsan İnsülinleri (Regüler/Nph) İle İnsülin Analoglarının Lispro/Glargin) Etkinliğinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. İç Hastalıkları Kliniği.
121. Paglia de Valentine W. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin Med.* 70:158-159.

- 122.Pasaoglu H, Sancak B, Bukan N. (2004). Lipid peroxidation and resistance to oxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J Exp Med.* 203(3):211-218.
- 123.Patel BN, Mackness MI, Harty DW, Arrol S, Boot-Handford RP, Durrington PN. (1990). Serum esterase activities and hyperlipidaemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochim Biophys Acta.* 1035(1):113-116.
- 124.Pavkovic E, Simeon V, Reiner E, Sucic M, Lipovac V. (1993). Serum paraoxonase and cholinesterase activities in individuals with lipid and glucose metabolism disorders. *Chem Biol Interact.* 87:179-182.
- 125.Pereverzev MO, Vygodina TV, Konstantinov AA, Skulachev VP. (2003). Cytochrome c, an ideal antioxidant. *Biochemical Society Transactions.* 31:1312-1315.
- 126.Pratico D. (2005). Antioxidants and endothelium protection. *Atherosclerosis.* 181(2):215-224.
- 127.Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. (1996). The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics.* 33(3):498-507.
- 128.Quilliot D, Walters E, Bonte JP, Fruchart JC, Duriez P, Ziegler O. (2005). Diabetes mellitus worsens antioxidant status in patients with chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr.* 81(5):1117-1125.
- 129.Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusic AJ, Navab M, Fogelman AM. (2001). Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21(4):542-547.
- 130.Report of WHO Consultation. (1999). Definition. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. WHO, Geneva.
- 131.Rochu D, Chabriere E, Masson P. (2007). Human paraoxonase: a promising approach for pre-treatment and therapy of organophosphorus poisoning. *Toxicology.* 233(1-3):47-59.
- 132.Rontu R. (2003). Polymorphisms of the antioxidative enzyme paraoxonase-1 in the development of atherosclerosis clinical and autopsy studies. University of Tampere Medical School Department of Clinical Chemistry. Academic dissertation. Tampere, Finland.
- 133.Rosenblat M, Draganov D, Watson CE, Bisgaier CL, La Du BN, Aviram M. (2003). Mouse macrophage paraoxonase 2 activity is increased whereas cellular paraoxonase 3 activity is decreased under oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(3):468-474.
- 134.Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, Vaya J, Oren R, Tawfik DS, Aviram M. (2006). The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-

- mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 281(11):7657-7665.
135. Rosenblat M, Hayek T, Hussein K, Aviram M. (2004). Decreased macrophage paraoxonase 2 expression in patients with hypercholesterolemia is the result of their increased cellular cholesterol content: effect of atorvastatin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(1):175-180.
136. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. (2003). Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23(3):461-467.
137. Ruiz J, Blanche H, James RW, Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, Cohen N, Morabia A, Passa P, Froguel P. (1995). Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet.* 346(8979):869-872.
138. Ryter SW, Tyrrell RM. (1998). Singlet molecular oxygen ( $^1O_2$ ): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med.* 1998 24(9):1520-1534.
139. Saha N, Roy AC, Teo SH, Tay JSH, Ratnam SS. (1991). Influence of serum paraoxonase polymorphism in serum lipids and apolipoproteins. *Clin Genet.* 40:277-282.
140. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. (1997). Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(6):1067-1073.
141. Sardesai VM. (1995). Role of antioxidants in health maintenance. *Nutr Clin Pract.* 10 (1): 19-25.
142. Satoh K. (1978). Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta.* 90: 37-43.
143. Seghrouchni I, Drai J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, Garcia I, Orgiazzi J, Revol A. (2002). Oxidative stress parameters in type I, type II and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta.* 321(1-2):89-96.
144. Senti M, Tomas M, Anglada R, Elosua R, Covas MI, Fito M. (2003). Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population-based study. *Eur. J Intern. Med.* 14:178-184.
145. Senti M, Tomas M, Fito M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, Masia R, Marrugat J. (2003). Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endoc Metab.* 88(11):5422-5426.
146. Serrato M, Marian AJ. (1995). A variant of human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. *J Clin Invest.* 96(6):3005-3008.

147. Sindhu RK, Koo JR, Roberts CK, Vaziri ND. (2004). Dysregulation of hepatic superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in diabetes: response to insulin and antioxidant therapies. *Clin Exp Hypertens.* 26(1):43-53.
148. Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La Du BN. (1999). Human serum Paraoxonase/Arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids : apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19(9):2214-2225.
149. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. (1995). Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(16):7187-7191.
150. Srivastava AK. (2002). High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes. *Int J Mol Med* 9:85–89.
151. Sun Y, Oberley LW, Li Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 34 (3): 497-500.
152. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. (1996). Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Lond).* 90(4):255-260.
153. Thornalley PJ. (2002). Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. *Int Rev Neurobiol.* 50:37-57.
154. Tomas M, Latorre G, Senti M, Marrugat J. (2004). The antioxidant function of high density lipoproteins: A new paradigm in atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol* 57(6):557-569.
155. Tripathi BK, Srivastava AK. (2006). Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med Sci Monit.* 12(7):RA130-147.
156. Tuğrul A. (2002). Diyabetik nefropati. *Trakya üniversitesi tıp fakültesi dergisi.* 19(2):113-121.
157. Turk HM, Sevinc A, Camci C, Cigli A, Buyukberber S, Savli H, Bayraktar N. (2002). Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol.* 39(3):117-122.
158. Van Haften RI, Evelo CT, Penders J, Eijnwachter MP, Haenen GR, Bast A. (2001). Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. *Biochim Biophys Acta.* 1548(1):23-28.

159. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev.* (4):612-628.
160. Vitarius JA, O'Shaughnessy JA, Sultatos LG. (1995). The effects of phenobarbital pretreatment on the metabolism and toxicity of paraoxon in the mouse. *Pharmacol Toxicol.* 77(1):16-22.
161. Walker CH, Mackness MI. (1983). Esterases: problems of identification and classification. *Biochem Pharmacol.* 32:3265-3269.
162. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. (1995). Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 96(6):2882-2891.
163. Will JC, Byers T. (1996). Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C? *Nutr Rev.* 54(7):193-202.
164. Williams FM. (1987). Serum enzymes of drug metabolism. *Pharmacol Ther.* 34:99-109.
165. Yagi K. (1984). Assay for Blood Plasma or Serum. *Methods in Enzymol.* 105: 328-331.
166. Yamada Y, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Kameyama T, Yokoi K, Ichihara S, Metoki N, Yoshida H, Satoh K, Nozawa Y. (2006). Assessment of genetic factors for type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Med.* 18(2):299-308.
167. Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, Pinsky D, Stern D. (1994). Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation endproducts with their receptors/ binding proteins. *J Biol Chem* 269:9889-9897.
168. Young IS, Woodside JV. (2001). Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* 54:176-186.

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Adıyaman ili Besni ilçesi Yazıbeydilli köyünde doğdum. İlkokulu doğum yerimde, Ortaokulu Adana, Liseyi Konya’da okudum. 1994 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi’nden mezun oldum. 1995 yılı Ağustos ayından beri Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Elazığ Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü’nde görev yapmaktayım. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı’nın desteği ile katıldığım İngilizce kursu sonunda TOEFL sınavından iyi bir sonuç alarak 1998 yılında Yüksek Lisans Eğitimi için Amerika Birleşik Devletleri’ne gittim. Moleküler viroloji konusunu çalışarak ‘Molecular Biological and Functional Characterization of Bovine Herpesvirus Type-5 (BHV-5) Us9 Gene’ adlı yüksek lisans tezini tamamladım.

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü (TAGEM), TÜBİTAK, ve Avrupa Birliği 6. Çerçeve Programı kapsamında çeşitli projelerde görev aldım. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan 20’den fazla bilimsel yayınım bulunmaktadır.