

T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
HASEKİ EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ  
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA BÖLÜMÜ  
ŞEF : Dr.NEZAKET EREN

# DİABETES MELLİTUS'DA PARAOKSONAZ AKTİVİTESİ VE AOPP DÜZEYLERİ

Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi

**Hümevra ÖZTÜRK**

İSTANBUL  
2008

## ÖNSÖZ

*Uzmanlık eğitimi gördüğüm Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Başhekimi Sayın Op. Dr. Haldun ERTÜRK'e, asistanlık eğitimimde daima yol gösterici olan hocam Şişli Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı Şefi Sayın Uzm. Dr. Nezaket EREN'e, bilgisini, desteğini hiç bir zaman esirgemeyen hocam Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Şef Yardımcısı Sayın Uzm. Dr. Macit KOLDAŞ'a şükranlarımı sunarım.*

*Tez çalışmamda ve uzmanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerinden ötürü laboratuvarımızda görevli tüm uzman doktorlarımıza teşekkürlerimi sunarım.*

*Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum başta Dr. Meltem Güngör olmak üzere tüm değerli asistan arkadaşlarıma ve tüm laboratuvar çalışanı arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.*

*Uzmanlık eğitimim boyunca manevi desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme de minnettarlığımı bildiririm.*

**Hümevra Öztürk**

## İÇİNDEKİLER

Önsöz	I
İçindekiler	II
Kısaltmalar	III
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1 Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Tarihçesi	2
2.2 Epidemiyoloji	2
2.3 Diabetes Mellitus'un tanısı	9
2.4 Diabetes Mellitus'un komplikasyonları	13
2.5 Diabetes Mellitus ve oksidatif stres	18
2.6 Paraoksonaz	20
2.6.1. Tarihçe	20
2.6.2. Paraoksonaz Gen Ailesi	20
2.6.3. PON1 Gen Polimorfizm	21
2.6.4. PON1	22
2.6.4.1. PON1'in Yapısı	22
2.6.4.2. PON1'in Substratları	24
2.6.4.3. PON1'in Fizyolojik Fonksiyonu	25
2.6.4.4. PON1'in Sentezi	26
2.6.4.5. PON1'in Hücrelerden Salınımı	27
2.6.4.6. PON1 ve HDL	28
2.6.4.7. PON1 ve Oksidatif Stres	28
2.6.4.8. PON1 ve Diabet	29
2.7. Protein Oksidasyonu Beliteçlerinin Klinik Önemi	29
2.7.1 Protein İleri Oksidasyon Ürünleri	31

## 4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

4.1. Gereçler	32
4.1.1. Hasta ve Kontrol Grupları	32
4.1.2. Kan Örnekleri	32
4.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
4.1.4. Kullanılan Cihazlar	33
4.2. Yöntemler	33
4.2.1. Serum Paraoksonaz Aktivitesi Ölçümü	35
4.2.1.1. Serum PON1 Aktivitesinin Performans Çalışmaları	36
4.2.2. Serum AOPP Düzeyinin Ölçümü	36
4.3. PON1 Aktivite Yönteminin Performans Kriterleri	39
4.3.1. Presizyon (Tekrarlanabilirlik) Çalışması	39
4.4. AOPP Ölçüm Yönteminin Performans Kriterleri	40
4.4.1. Presizyon (Tekrarlanabilirlik) Çalışması	40
4.4.2. Linearite (Doğrusallık ) Çalışması	40
4.5. İstatistiksel Analiz	41
5. Bulgular	41
5.1. Hasta ve Kontrol Grubunda Ölçülen Parametreler	42
5.2. Korelasyon Analizleri	46
5.3. Tanısal Yetrlik Analizi	47
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	49
7. Özet	52
8. Summary	53
9. Kaynaklar	54

## KISALTMALAR

ACE	: Anjiotensin Converting Enzyme Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
ADA	: American Diabetes Association Amerikan Diabet Birliği
AOPP	: Advanced Oxidation Protein Products; İleri Protein Oksidasyon Ürünleri
DM	: Diabetes Mellitus
HDL	: High Density Lipoprotein Yüksek Yođunluklu Lipoprotein
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HMG Co-A	: Hidroksi Metil Glutaril Co-A
ICA:	: Islet Cell Antibody İslet Hücre Antikoru
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
LDL	: Low Density Lipoprotein Düşük Yođunluklu Protein
NCEP ATPIII	:Ulusal Kolesterol Eğitim Programı-Yetişkin Tedavi Programı III
NDDG	: National Diabetes Data Group Amerikan Ulusal Diabet Veri toplama Grubu
NIDDM	: Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus İnsüline Bağımlı Olmayan Diabet
NO	: Nitrik Oksit
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
PCO	: Protein Karbonil Ürünü
PON1	: Paraoksonaz

ROS	: Reactive Oxigen Species Reaktif Oksijen Ürünleri
SR-B1	: Scavenger Reseptör-1
TG	: Trigliserid
WHO	: World Health Organization; Dünya Sağlık Örgütü
8-OHdG	: 8-hidroksi deoksiguanozin

## **GİRİŞ VE AMAÇ**

Kalsiyum bağımlı, glikoprotein yapısında bir esteraz olan paraoksonazın (PON1), HDL'nin yapısında bulunduğunun anlaşılmasından sonra Koroner Arter Hastalığı (KAH) ile ilişkisine yönelik çalışmalar artmıştır (1,2).

Serum PON1'in, LDL fosfolipidlerinin lipid peroksidasyonunu önleyerek oksidasyona karşı korumada önemli olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (3,4,5) .

Diabetes Mellitus'ta paraoksonaz aktivitesinin azaldığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. DM'lu hastalarda koroner arter hastalığının gelişmesinin paraoksonaz aktivitesindeki azalmaya bağlı olabileceği düşünülmektedir(6,7).

AOPP (Advanced Oxidation Protein Products), oksidatif stresin proteinler üzerine etkisini gösteren bir belirteç olarak değer kazanmaktadır. Çalışmamızın amacı, Diabetes Mellitus'lu kişilerde serum PON1 aktivitesinin ve AOPP düzeylerinin Diabetes Mellitus için bir belirteç olup olmadığını araştırmak, açlık glukozu, HbA1c, kolesterol ve HDL ile korelasyonunu belirlemektir.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1 DİABETES MELLİTUSUN TANIMI ve TARİHÇESİ**

Diabetes eski Yunanca'da "sifon" anlamına gelir ve aşırı idrar yapımını anlatır. Mellitus ise yine Yunanca'da "bal" anlamına gelen "mel" kelimesinden geliştirilmiştir (8).

Diabetes mellitus kanda glukoz seviyesinin artması ve glukozüri ile karakterize kronik bir hastalıktır. Sebebi endojen insülinin mutlak veya göreceli eksikliği veya periferik etkisizliğidir. Bunun sonucu olarak hiperglisemi, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozuklukları, kapiller membran değişiklikleri ve hızlanmış arteriosklerozis oluşur. Bu hastalarda en özgün klinik semptomlar polidipsi, polifaji ve poliüridir. Bazı hastalarda izah edilemeyen kilo kaybı, bazılarında da kronik komplikasyonlara bağlı göz, merkezi sinir sistemi, kardiyovasküler sistem veya ürogenital sistemle ilgili yakınmalar ön planda olabilir (9, 10, 11, 12).

Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) bozulmuş glukoz toleransı ve Diabetes Mellitus tanı kriterlerini 1980 yılında tanımlamıştır. American Diabet Cemiyeti (American Diabetes Association-ADA) 1997'de bu kriterleri yeniden gözden geçirmiş ve yeni diabetes mellitus tanı kriterlerini yayınlamıştır (13).

### **2.2 EPİDEMİYOLOJİ**

Diabetes mellitus, bütün toplumlarda ve ırklarda görülen bir hastalıktır. Dünyanın bazı yörelerinde görülme sıklığı daha azdır. Grönland ve Alaska Eskimolarında DM prevalansı çok düşüktür ve saptanan olguların çoğu NIDDM'dur. Buna karşılık Amerika'da yaşayan Pime Kızılderililerinde prevalans %55'in üstündedir ve dünya üzerindeki en yüksek diabet prevalansı bu ırktadır (14).

## Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması ve Etyopatogenez:

**Tablo 1: DM ve ilgili Glukoz İntoleransı Kategorilerinin Sınıflandırılması:**

### **Klinik Sınıflar:**

#### A)Diabetes Mellitus

Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 2 Diabetes Mellitus

-Non-obez

-Obez

-MODY(Maturity onset diabetes of the young)

Malnutrisyonla ilgili Diabetes Mellitus

Bazı sendromlar ve diğer durumlarla ilgili Diabetes Mellitus

-Pankreas hastalıkları

-Hormonal bozukluklarla ilgili hastalıklar

-İlaçlar ve diğer kimyasal maddelere bağlı durumlar

-İnsülin yapısında veya insülin reseptörünün

yapısındaki bozukluklar

-Bazı genetik sendromlar

-Diğer nedenler

#### B)Bozulmuş Glukoz Toleransı

Non-obez

Obez

Bazı durumlar ve sendromlarla ilgili

#### C)Gestasyonel Diabetes Mellitus

### **İstatistiksel Olarak Risk Altında Olan Popülasyon:**

Bunlar; glukoz toleransı normal olmasına karşın, ileriki senelerde diabet gelişme olasılığı yüksek olan insanlardır.

A)Daha önce glukoz toleransı saptanıp normale dönenler

B)Potansiyel glukoz tolerans anomalisi olanlar

Tablo 1'deki sınıflandırma Dünya Sağlık Örgütü'nün 1985'de yayınladığı sınıflamadır. Bu sınıflandırmada klinik grup başlığı altındaki diabetes mellitus, bozulmuş glukoz toleransı ve gestasyonel diabetin her üçünde de aşikar hiperglisemi olup, tedavi uygulanması gerekmektedir.

İstatistiksel olarak risk altında bulunan popülasyonda ise hiperglisemi yoktur. Bunlar gestasyonel DM'da olduğu gibi, yaşamlarının bir döneminde glukoz intoleransı gelişmiş ve sonra tamamen normale dönmüş bireyler olabilir (Oral Glukoz Tolerans Testi ( OGTT ) normalleşmiştir). Bundan başka Tip 1 DM'a yatkın HLA antijenlerine sahip olup henüz hiperglisemi saptanmamış olmasına rağmen, dolaşımlarda islet hücresi veya insüline karşı otoantikör bulunanlar olabilir veya Tip 2 DM'li bir hastanın monozigot ikizi olabilir. İstatistiksel olarak risk altında bulunan bu gruba giren bireylerin erken tanı açısından periyodik kontrollerden geçirilmeleri gerekir. İstatistiksel olarak risk altında olan popülasyon şöyle özetlenebilir:

Tip 1 için : Tip 1 diabetlinin kardeşi ya da çocuğu olmak  
Tip 1 diabetlinin HLA idantik kardeşi olmak  
Tip 1 diabetlinin tek yumurta ikizi  
Adacık antikorları pozitif

Tip 2 için : Tip 2 diabetlinin tek yumurta ikizi  
Tip 2 diabetlinin birinci derece akrabaları  
4 kg'nın üzerinde bebek doğuranlar

Amerikan Diabet Birliğinin (American Diabetes Association- ADA) 1997 yılının Haziran ayındaki toplantısında yeni bir diabetes mellitus sınıflaması da yapılmıştır.

## ADA DİABET SINIFLANDIRMASI

### 1. Tip 1 Diabetes Mellitus

- a) Klasik tip
- b) İdiopatik tip

### 2. Tip 2 Diabetes Mellitus

### 3. Diğer özel tipler

- Beta hücrelerinin genetik hastalıkları
- İnsülin etkisinin genetik defektleri
- Pankreas hastalıkları
- Endokrinopatiler
- İlaçlar ve kimyasal madde etkileri
- Enfeksiyonlar
- İmmün mekanizmalar
- Diabetin diğer şekilleri
- Diabetin genetik sendromları

### 4. Gestasyonel Diabet

#### Tip 1 Diabetes Mellitus'un Etyopatogenezi

Pankreastan salgılanan endojen insülinin olmamasına bağlı olarak gelişen diabetes mellitus tiplerine bu isim verilir.

#### Tablo 2: Tip 1 Diabetes Mellitus'un Etyolojik Sınıflaması:

- |   |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1) Pankreas beta hücrelerinin idiyopatik otoimmün yıkımı</li><li>2) Poliglandüler otoimmün sendrom Tip 2 (Schmidt sendromu)</li><li>3) Viral enfeksiyonların neden olduğu beta hücresi yıkımı<ul style="list-style-type: none"><li>-Konjenital rubella virüsü</li><li>-Koksaki B (Tip B4 ve B3)</li><li>-Sitomegalovirus</li></ul></li><li>4) Akut pankreatit, kronik tekrarlayıcı pankreatit, pankreas kanseri, konjenital pankreas hipoplazisi ve pankreatektomiye bağlı pankreas doku kaybı.</li></ol> |
|---|

- 5) Pankreas beta hücresinde yıkıma neden olan kimyasal ajanlar.
- 6) Genetik sendromlar: -DİDMOAD sendromu (Diabetes insipidus, DM, optik atrofi ve sağırılık)  
-Fredreich ataksisi.
- 7) Diğer; Kesin olarak tanımlanamayan nedenlerle gelişen insülin salgısı azalması.

En sık rastlanana pankreas beta hücrelerinin idiopatik otoimmün yıkımıdır ve buna Tip 1 DM denir. Hastalık ani başlangıçlıdır. İmmunolojik olarak beta hücrelerinin %90'ı harap olduktan sonra klinik tablo ani olarak oluşur. Polidipsi, poliüri, kilo yakınmaları veya ketoasidoz koması ilk bulgu olabilir.

Hastalığın tanısı ilk kez konulduğunda hasta zayıftır ve kural olarak komplikasyon yoktur (15,16).

Tip 1 poligenetik bir eğilim gösterir. Çeşitli ırklarda Tip 1 diabete yatkınlık sağlayan antijenin tipi değişiktir. Beyaz ırk için HLA B8, HLA B15, HLA DR3 ve HLA DR4, zenci ırk için HLA DR7, Japonlar için HLA DR9 diabete yatkınlık sağlayan antijenlerdir. Genetik yatkınlığı olan çocuklarda genelde 5-15 yaşları arasında tetiği çeken bir olaydan sonra hastalık hızla gelişmektedir. Tetik çeken olay viral enfeksiyonlar, özellikle kabakulak, konjenital rubella ve koksaki B, diyet, toksinler ve streştir. Büyük çoğunlukta ise otoimmün mekanizmayı başlatan faktörün ne olduğu bilinmemektedir. Bu hastalarda klinik yakınmaların başlaması ile beraber dolaşımda adacık hücrelerine karşı otoantikolar (islet cell autoantibodies-ICA ) yüksek oranda (%65-85) saptanır. Otoantikoların çoğu IgG tipindedir. ICA titresi zamanla düşen tip 1 DM'lu hastalarda ICA (-) olduğu için Tip 1 DM ile tip 2 DM'un erken yaşta başlayan formunun ayırıcı tanısında ICA önemli bir laboratuvar bulgusudur (17,18,19).

Tip 1 diabetesin diğer bir tipi "Poliglandüler otoimmün sendromun tip II" veya diğer adı ile "Schmidt sendromudur". Çoğunlukla kadınlarda görülen Schmidt sendromunda tiroid, adrenaller, gonadlar ve midenin parietal hücrelerine karşı da otoantikolar üretilir ve hipotiroidi, sürrenal yetersizlik, hipogonadizm ve pernisiyöz anemi gelişebilir.

Daha nadir görülen Tip 1 diabet nedenleri arasında pankreatit, pankreas kanseri, konjenital pankreas hipoplazisi ve pankreatektomi yer alır. Tip 1 diabette total mortalite hızı Diabetik olmayanlara göre 4-7 kat yüksektir ve en sık mortalite nedeni (%55) son dönem böbrek yetersizliğidir (20).

## **Tip 2 Diabetes Mellitus'un Etyopatogenezi**

Toplumda en sık rastladığımız diabet tipidir. Genellikle 45 yaş üzerinde ilk yakınmalar başlar, kronik seyirli ve sinsi gidişlidir. Hastaların hekime ilk başvurma nedenleri polidipsi, poliüri ve polifaji gibi yakınmalardan ziyade görme bozuklukları, el ve ayaklarda uyuşukluk veya fasiyal sinir paralizisi gibi kronik komplikasyonlar mevcuttur. Hastaların çoğu obezdir. Aile öyküsü hemen hepsinde alınabilmesine karşılık, hastalık henüz tek bir genetik zemine oturtulamamıştır.

Diabetik ketoasidoz koması şiddetli enfeksiyon veya mezenter arter embolisi gibi acil bir durum olmadıkça gelişmez. Bu hastalarda daha sık görülen koma, yeterli sıvı alınmamasına bağlı gelişen hiperglisemik hiperosmolar non-ketotik komadır (21).

İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus'un diğer adı "Tip 2 Diabetes Mellitus" tur. Hastalarda glukoz intoleransı bilgi vermeksizin uzun süredir mevcuttur ve metabolik düzeyde bozukluklar gelişmesine yol açar (21, 22).

Çevre faktörleri ile genetik faktörler şu üç mekanizma ile tip 2 diabete yol açarlar (23).

- a) Periferik dokularda insülin direnci
- b) Pankreastan insülin salgınım kusuru
- c) Karaciğerde glukoz üretiminin artması

Bu hastalarda temel bozukluk insülinin fizyolojik etkilerine karşı periferik dokularda, özellikle de çizgili kaslarda direnç gelişmesidir. İnsülin direncini oluşturabilen veya arttırabilen etkiler arasında yaşlanma, sedanter yaşam, obezite, psişik ve fiziksel stresler, glukokortikoid, seks hormonu yapısındaki ilaçlar, akromegali, cushing hastalığı ve benzeri

endokrinopatiler, gebelik, glukoz toksisitesine yol açan uzun süreli hiperglisemi ve genetik yatkınlık bulunur.

Tip 2 Diabette beta hücrelerinin kan şeker düzeyine yanıtı anormaldir. Ancak yapılan deneyler göstermiştir ki hasta beta hücrelerinin nörojenik uyarılara, oral antidiabetiklere ve sekretine karşı insülin yanıtının bozulmamış olduğunu göstermiştir.

Tip 2 diabette özellikle glukozu karşı erken insülin yanıtında bir bozukluk mevcuttur ve beta hücresi glukozu tanımakta güçlük çeker. Gençlerde ortaya çıkan erişkin tipi diabette (MODY) ve klasik Tip 2 diabetli olguların bir kısmında genetik olarak belirlenen glikokinaz enzim eksikliği bu bozukluğa neden olur.

Karaciğerden glukoz üretiminin artması kısmen insülin eksikliğinden ve bunun sebep olduğu glukagon fazlalığından, kısmen de insülinin etkisizliğinden kaynaklanır. Bu bozukluğun sonucu olarak açlık hiperglisemisi gelişmektedir.

### **Tip 2 Diabetes Mellitus üç evreye ayrılır: (18,24)**

**Preklinik evre:** Beta hücre fonksiyonları normal olduğundan bu evrede, periferdeki insülin direnci normale göre daha fazla insülin salınarak (hiperinsülinemi) aşılmaya çalışılmakta ve böylece bir süre normal glukoz toleransı sürdürülmektedir. Bu dönemde kan glukozu normal düzeydedir. OGTT normaldir.

**Bozulmuş glukoz toleransı dönemi:** Aşırı çalışan beta hücrelerinde bitkinlik ve salgı yetmezliği gelişir. OGTT patolojik olmuştur. Açlık glisemisi normal olduğu halde OGTT’de ikinci saat değeri 140 mg/dl’nin üstüne çıkmaktadır. Bu dönemde de hiperinsülinemi devam etmekle birlikte periferik direnci aşamamaktadır. Bu dönemde kronik arter hastalığı için risk faktörleri olan hipertansiyon, hipertrigliseridemi, HDL –kolesterol düşüklüğü sık görülür ve bu nedenle makrovasküler komplikasyonlar gelişebilmektedir.

Preklinik ve bozulmuş glukoz toleransı evrelerinin ikisine birden “kompanse periferik insülin direnci” dönemi denir. Kompense dönemde insülin direncine sahip olan non-genetik faktörler azaltılabilirse aşikar diabet ortaya çıkışı da geciktirilebilir. Kompense dönemden aşikar diabete geçişin ortalama 10-20 yıl olduğu düşünülmektedir.

**Aşikar diabet:** Bu döneme geçişte üç önemli mekanizma işler. İlki ve en önemlisi beta hücre sayı ve salgı fonksiyonunda azalmadır. Bunu genetik belirlese de, hiperglisemi ve artmış yağ asitlerinin toksik etkisi de beta hücre fonksiyonlarını bozabilmektedir. İkinci mekanizma karaciğer glukoz üretiminin artmasıdır ki bu bozulmuş glukoz toleransı döneminde genelde normaldir. Üçüncü mekanizma ise periferik insülin direncinin giderek artmasıdır.

Aşikar diabet döneminin başlangıcında insülin salgı yedeği yeterli olduğu için diyet ve oral antidiabetik ajanlar yeterli olmaktadır. Bu dönem değişken olmakla birlikte uzun yıllar sürer. Beta hücre yedeği zamanla azaldığında insülin tedavisine ihtiyaç duyulur (25).

### 2.3 DİABETES MELLİTUS'UN TANISI

Diabetes mellitus'un tanı kriterleri, oral glukoz tolerans testi (OGTT) endikasyonları, OGTT hazırlığı ve yapılışı aşağıda tablolar halinde belirtilmiştir .

#### Tablo 3: Diabetes Mellitus'un tanı kriterleri:

- Bir hafta arayla bakılan en az 8 saatlik tam açlık venöz plazma glukoz seviyesinin, iki ayrı ölçümde 126 mg/dl'ye eşit veya yüksek saptanması veya;
- Diabete özgü semptomların varlığına ek olarak günün herhangi bir zamanında ölçülen venöz plazma glukoz değerinin 200 mg/dl'ye eşit veya yüksek olması veya; (diabete özgü semptomlar; poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybıdır.)
- Oral glukoz tolerans testi sırasında 2. saat plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dl'ye eşit veya yüksek olması. Test WHO'nun tanımladığı biçimde 75 gram anhidroz glukozun suda çözünmesiyle yapılmalıdır(26).

**Tablo 4: Oral Glukoz Tolerans Testi(OGTT) Endikasyonları(27):**

1. Tarama testinde açlık kan şekerinin 115 mg/dl ve üzerinde ya da postprandiyal kan şekerinin (120. dakika ) 140 mg/dl ve üstünde bulunması.
2. Gestasyonel diabeti belirlemek veya reddetmek.
3. Şişmanlık ve/veya özellikle ağırlıklı ailesel diabet hikayesi olanlar.
4. Otozomal dominant (MODY) tipi diabet hikayesi olanlar.
5. Açıklanamayan nöropati, retinopati, ateroskleroz, koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalıklar (özellikle 50 yaşın altında olanlarda).
6. Operasyon, stres, travma, infarktüs, serebral vasküler olaylar, kortikosteroid kullanımı, gebelik esnasında anormal glukoz değerleri veya glukozüri görülenlerde, bu olaylar geçtikten sonra test yapılmalıdır.
7. Metabolik sendrom X düşünülen kişilerde.
8. Reaktif hipoglisemi düşünülen kişilerde (bu kişilerde OGTT süresi daha uzun tutulur).

**Tablo 5: OGTT hazırlığı: (27)**

1. Testten en az üç gün evvel hasta günde en az 200 gr karbonhidrat içeren beslenme programına alınmalıdır.
2. Hastanın ağır stres, akut serebral ve kardiyak olaylar, uzun süreli inaktivite (sedanter yaşam) enfeksiyon gibi OGTT'yi etkileyebilecek bir sorunun olmamasına dikkat edilmelidir. Akut hastalıkların geçmesi beklenmelidir.
3. Hipopotasemi, gastrointestinal motilite ve emilim bozuklukları, ağır karaciğer ve böbrek yetersizliği, Addison hastalığı, Cushing Sendromu, hipertiroidi, akromegali, feokromasitoma gibi hastalıkların aktif döneminde OGTT yapılmamalıdır.
4. Oral kontraseptifler, diüretikler, kortikosteroidler, difenilhidantoin, tiroksin, nikotinik asit, psikotrop ajanlar ve beta bloker gibi ilaçların kullanımında testten en az bir hafta önce, yüksek doz östrojen içeren oral kontraseptif kullanımında ise en azından bir siklus önce ilaç kesilmelidir.

**Tablo 6: OGTT yapılması: (27)**

1. Hasta 10-16 saatlik açlık sonrası sakin bir odaya alınır. O. dakikada ilk kan örnekleri alınır.
2. 5 dakika içinde 300 ml suda eritilmiş 75 gr glukoz hastaya içirilir.
3. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre glukoz verildikten yalnızca 2 saat sonra kan örneği alınması yeterli olmakla birlikte; NDDG (Amerikan Ulusal Diabet Veri Toplama Grubu)'nin önerdiği şekilde 2 saat süreyle 30 dakikada bir (30., 60., 90., 120. dk) kan örneği alınmasında fayda vardır. Reaktif hipoglisemi düşünülen vakalarda test süresi 5 saat kadar uzatılmaktadır.
4. Test süresince sigara içmek, fazla dolaşmak ve su dışında yiyecek almak sakıncalı ve yasaktır.

**Tablo 7: WHO Kriterlerine göre OGTT yorumu:(27)**

Kan glukoz düzeyi (venöz plazma mg/dl)	NGT (normal Glukoz toleransı)	IGT (bozulmuş glukoz toleransı)	DM (Diabetik)
Açlık	< 110	< 140	≥ 140
120 dk	< 140	< 140-199	≥ 200

**Tablo 8: National Diabetes Data Group (NDDG) kriterlerine göre OGTT yorumu (28)**

Kan glukoz düzeyi (venöz plazma mg/dl)	NGT (normal glukoz toleransı)	IGT (bozulmuş glukoz toleransı)	DM (Diabetik)
Açlık	≤ 115	< 140	≥ 140
30., 60., 90., dk en az bir değer	< 200	≥ 200	≥ 200
120. dk	< 140	140-200	≥ 200

ADA 2007’de bozulmuş açlık glukozu sınırını 100 mg/dl’ indirmiştir (26). WHO ise sınırı bu kadar düşürmenin risk altındaki popülasyonu çok arttıracığını belirtmektedir. Bozulmuş açlık glukozu olanların sayısı artacak ama bozulmuş glukoz toleransı olanlar azalacaktır (27).

Gestasyonel Diabet tanısı için tüm gebelere gebeliğin 24-28. haftalarında 50 gr glukoz içirilerek tarama testi yapılır. Test öncesi herhangi bir hazırlığa gerek yoktur. 1 saat sonraki kan şeker düzeyi 140 mg/dl veya üstünde ise 100 gr glukozla test yinelenir. 100 gr glukoz ile yapılan testte tablo 9’deki değerlerden ikisinin bir arada bulunması gestasyonel diabet tanısını koydurur.

**Tablo 9: Gebelerde 100 gr glukoz ile OGTT yorumu:**

Kan glukoz düzeyleri (mg/dl)	
Açlık	> 105
60. dk	> 190
120.dk	> 165
180.dk	> 145

## 2.4 DİABETES MELLİTUS'UN KOMPLİKASYONLARI

Diabetes mellitusun komplikasyonları aşağıda akut ve kronik olarak sınıflandırılmıştır.

### A) Akut (metabolik) komplikasyonlar:

- Diabetik ketoasidoz
- Hiperosmolor non-ketotik koma
- Laktik asidoz koması
- Hipoglisemi koması

### B) Kronik (dejeneratif) komplikasyonlar:

#### 1) Makrovasküler komplikasyonlar:

- Kardiyovasküler hastalıklar
- Serebrovasküler hastalıklar
- Periferik damar hastalığı

#### 2) Mikrovasküler komplikasyonlar:

- Diabetik nefropati
- Diabetik retinopati
- Diabetik nöropati

Diabetes mellituslu hastalarda doku ve organlarda biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel bir takım değişiklikler meydana gelir. Akut dönemde oluşan metabolik komplikasyonlar yaşamı tehdit edecek düzeyde hatta fatal olabilir, fakat bugün için asıl sorun daha önce bahsedildiği gibi uzun sürede oluşan, küçük ve büyük damarların hastalığıdır, buna “kronik vasküler sendrom” da denir. Diabetin kronik komplikasyonları tutulan sisteme göre Tablo 10’da sınıflandırılmıştır. Diabetik mikroanjiopatik değişiklikler, diabetik metabolik bozukluklarla hızlanmış ateroskleroz tablosudur demek yanlış değildir. Buna karşılık Diabetik mikroanjiopatik değişimler genelde diabete has ve tespit edildiğinde diabet varlığını akla getiren patolojik damar bozukluklarıdır(32, 33). Diabetik mikroanjiopatinin gelişimi hakkında “Metabolik Hipotez” ve “Genetik Hipotez” isimli iki önemli hipotez vardır (29, 30, 31).

**Tablo 10: Diabetin mikroanjiopatik ve makroanjiopatik kronik komplikasyonları:(32)**

Göz	<ol style="list-style-type: none"><li>1.Diabetik retinopati (vazoproliferatif ve makülopatik)</li><li>2.Vitreus kanaması</li><li>3.Rubeozis iritis</li><li>4.Glokom</li><li>5.Katarakt</li><li>6.Oküler kas felci</li></ol>
Böbrek	<ol style="list-style-type: none"><li>1.İnterkapiller glomeruloskleroz (Kimmelstiel Wilson)</li><li>2.Kronik böbrek yetersizliği</li><li>3.Renal papiller nekroz</li><li>4.Kronik pyelonefritis</li><li>5.Renovasküler hastalıklar ve hipertansiyon</li></ol>
Periferik sinir ve MSS	<ol style="list-style-type: none"><li>1.Somatik Diabetik nöropati</li><li>2.Otonom Diabetik nöropatisi</li><li>3.Diabetik inmeler</li></ol>
Kardiyovasküler sistem	<ol style="list-style-type: none"><li>1.İskemik kalp hastalıkları</li><li>2.Diabetik kardiyomiyopati</li><li>3.Diabetik periferik arter hastalığı</li><li>4.Diabetik arterial organ beslenme bozukluğu</li></ol>
Deri ve bağ dokusu	<ol style="list-style-type: none"><li>1.Necrobiosis lipoidica diabetorum</li><li>2.Xantoma diabetorum</li><li>3.Granuloma annulare</li><li>4.Fronkuloz</li><li>5.Mikotik infeksiyonlar</li></ol>
Gebelik	<ol style="list-style-type: none"><li>1.İri bebek gelişimi insidansında artış</li><li>2.Kongenital defekt (bebekte)</li><li>3.Gebelikte miad gecikmesi</li><li>4.Neonatal hipoglisemi</li><li>5.Neonatal ölüm değerlerinde artış</li></ol>

## MAKROVASKÜLER KOMPLİKASYONLAR

Diabetin makrovasküler komplikasyonları tip 2 DM için henüz aşikar DM'nın ortaya çıkmadığı bozulmuş glukoz toleransı döneminde başlar. Bu dönemde makrovasküler komplikasyonlar gelişmemekle beraber koroner kalp hastalığı için önemli risk faktörleri olan hipertansiyon, hipertrigliseridemi ve HDL-kolesterol düzeyinin düşük olması sık görülmekte ve bu nedenle makrovasküler komplikasyonlar gelişebilmektedir. Makrovasküler komplikasyonları açısından kadın-erkek farkı yoktur .

Makrovasküler komplikasyon oluşumunu etkileyen faktörleri 3 grupta toplayabiliriz.

A) Diabete özgü faktörler:

- \* Metabolik kontrol
- \* Hiperinsülinemi
- \* Kadın-erkek farkı kalkması
- \* Spesifik Diabetik anjiyopati
- \* Diabetik nefropati ve hipertansiyon

B) Yaşam şekli ile ilgili faktörler

- \* Diyet: Obezite, aşırı yağlı gıda, katı yağ tüketiminin yüksek olması, aşırı tuzlu gıda alımı.
- \* Sigara, alkol kullanımı
- \* Sedanter hayat

C) Genetik faktörler

- \* Kalıtsal hastalık riski: Hipertansiyon, hiperlipidemi, hiperürisemi, subklinik hipotiroidi
- \* Irksal ve bireye ait duyarlılık
- \* Olası aterosklerozla beraber diabet gelişimine genetik yatkınlık (33).

## KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR

Diabet kardiyovasküler morbidite ve mortalite açısından önemli ve bağımsız bir risk faktörüdür. Tip 2 diabette mortalite nedeni, başta koroner arter hastalığı olmak üzere (KAH) kardiyovasküler hastalıklardır. Diabetik kadınlarda KAH riski yükselmekte, non-diabetik erkeklere yaklaşmaktadır (34).

İyi kontrol altına alınmamış hiperglisemi ve insülinle yaratılan hipoglisemi arasında büyük dalgalanmalar gösteren diabetliler ateromaya karşı en yatkın grubu oluşturur. Kontrol altına alınmamış diabetikteki kronik hiperglisemi arter çeperinden mukopolisakkarid sentezinin artmasına yol açar ve bu durum LDL'lerin hapsedilmesi için uygun ortamı hazırlar. Böylece insülin yokluğunun aterojen olduğu söylenebilir. Ancak kan dolaşımında artan insülin aslında başka yollardan ateroma oluşumunu harekete geçirir. Lipidlerin arter çeperinden temizlenmesini inhibe eder ve hepatik plazma lipidleri sentezini artırır. Birçok hafif diabetli ya da egzojen insülin tedavisi görenlerde zaman zaman (özellikle açlık durumunda) kan dolaşımında insülin hormonu aşırı derece mevcuttur. Diabetlilerde aynı zamanda trombosit adezyon ve agregasyonu artmış, fibrinoliz aktivitesi azalmış ve kan viskozitesi artmıştır. Bütün bunlar ateromalı hastalarda intravasküler tromboza ortam yaratan faktörlerdir (34).

Koroner yetersizlik diabetik olan ve olmayan kişilerde aynı klinik semptomlarla seyreder. Ancak otonom nöropati gelişmiş diabetiklerde asemptomatik koroner arter hastalığı olacağı ve sessiz infarktüs gelişebileceği bilinmelidir.

Korunma için iyi bir diabet regülasyonu ve diğer risk faktörlerinin (hipertansiyon, dislipidemi, sigara, nefropati) tedavisi yaşamsal önem taşır. Antiagregan ajanlar profilaksi amacıyla kullanılabilir (34).

Koroner arter hastalığı olan diabetiklerin tedavisi diğer hastalarla aynıdır. Diabetlilerin daha iyi regülasyonu gereklidir, hipoglisemi ataklarından kaçınılmalıdır. Dislipidemi tedavisi için HMG Co-A redüktaz inhibitörleri ve fibratlar, hipertansiyon için ise ACE inhibitörleri tercih edilmelidir. Antiiskemik tedavi gereğinde uygulanır. Medikal tedavi yeterli olmazsa by-pass veya anjioplasti yapılabilir(34).

Diabetiklerde dilate kardiyomiyopati de görülebilir. Muhtemelen myokarddaki mikroanjyopatik değişikliklere ve interstisyumda mukopolisakkarid yapıdaki maddelerin birikimine bağlıdır. Klinikte hipertansiyon ve koroner arter hastalığı olsun veya olmasın sol ventrikül fonksiyon bozukluğu ve kalp yetersizliği ile ortaya çıkabilir (34).

## 2.5 DİABET VE OKSİDATİF STRES

Diabette reaktif oksijen türlerinin rolü 1980'li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur . Diabet ve diabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (35).

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla kıyaslandığında en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir. Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu da bilinen beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (35).

Hidrojen peroksidin, yüksek reaktiviteye sahip bir ROS ürünü olan OH. radikaline dönüşmesi sonrası insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir rol oynayabileceği görüşü araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır. Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen transkripsiyonunu azalttığını ve beta hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışmaların bulguları bu görüşü destekler niteliktedir . T ve B lenfositlerin, makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin beta hücrelerine toksik etkilerini de serbest radikaller aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir. Diabet oluşturulan rat deney modellerinde oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-OHdG (8-hidroksi deoksiguanozin) düzeylerinde de artış gözlenmiştir. Serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt sonucu olduğunu destekleyen çalışmaların yanı sıra endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortamda inkube edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir (35).

Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğu görüşü in vivo çalışmalar ile de desteklenmiştir. Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diabet oluşturmak için kullanılan N- nitroso türevi D-glukozamin yapısındaki streptozotosin ,

oksidan maddeler meydana getirerek langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip etmekte ve uygun olmayan NO cevapları vererek diabeti başlattığı düşünülmektedir.

Araştırmacıların bulguları, vasküler komplikasyonları olan diabetik hastalarda, hem LDL'nin oksidasyonunda hem de nonenzimatik glikasyonunda, hiperglisemiye bağlı artışlar olduğunu göstermektedir. Diabetik olgularda, lipidlere ilave olarak protein oksidasyonu da artmaktadır. Özellikle kollajen, elastin ve myelin kılıfındaki ekstrasellüler proteinlerin oksidasyonu sonucu; lens, damar, bazal membran gibi dokularda katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diabetik komplikasyonlar gelişmektedir(35).

## 2.6. PARAOKSONAZ

Paraoksonaz (PON1), hem arilesteraz (E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip, glikoprotein yapısında olan kalsiyum bağımlı bir ester hidrolazdır (1).

### 2.6.1. TARİHÇE

1946'da Abraham Mazur hayvan dokusunda organofosfat bileşiklerini hidroliz edebilen bir enzimin varlığını ilk kez bildirmiştir (37). Bu enzim 1953 yılında Aldridge W.N. tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir (38, 39). 1961'de Uriel tarafından insan serumunda yapılan bir çalışmada ilk kez HDL ile PON ilişkisi gösterilmiştir (40). Mackness ve ark., yaptıkları çalışmalar ile, 1985' te PON'un HDL üzerinde bulunduğunu (41), 1988' de, PON'un HDL üzerinde apoA-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini (42) ve 1991 yılında da LDL üzerindeki lipidperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır (43). İmmunoaffinite kromatografi çalışmaları insan serum paraoksonazının HDL'nin yapısındaki apolipoprotein AI ve klusterin (apolipoprotein J) ile ilişkili olduğunu ve total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir (Mackness ve ark., 1996) (44). Bu bulguların sonucunda araştırmacılar, kardiyovasküler hastalıklar ile PON1 arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelmişlerdir.

### 2.6.2. PARAOKSONAZ GEN AİLESİ

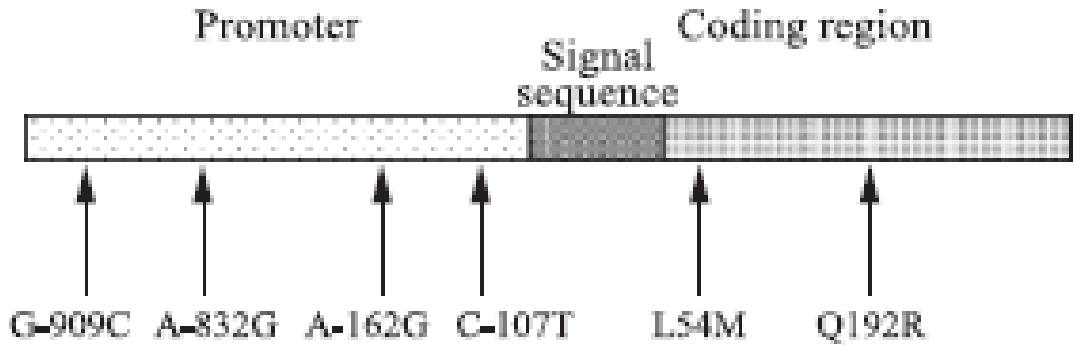
Paraoksonaz için ilgili insan geni HUMPONA'dır. İnsanda 7. kromozomun uzun kolunda bulunan paraoksonaz gen ailesinin PON1, PON2 ve PON3 şeklinde 3 üyesi vardır. PON1, PON2 ve PON3 genlerinin memeliler arasında; %60 sekans benzerliği gösterir. PON ailesi enzimleri substrata spesifik hidrolazlardır. PON1 bu ailenin ilk bulunan ve üstünde en çok çalışma yapılan ferdidir. (45)

PON1'de 106. kodonda lizin bulunurken, PON2 ve PON3'te lizin bulunmamaktadır. PON1 ve PON3 karaciğer ve plazmada bulunmasına karşılık, PON2'nin karaciğer, böbrek, kalp, beyin, testis dokularında özellikle endotel tabakasında bulunduğu ve aortik düz kas hücrelerinde de yer aldığı immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiştir (37).

### 2.6.3. PON1 GEN POLİMORFİZMİ

Günümüzde, PON1 iki yaygın kodon polimorfizmi gösterir (Şekil 1). Bunlar 55. kodonda metionin (M) ile lösinin (L) yer değiştirdiği (M/L55) ve 192. pozisyonda glutamin ile argininin yer değiştirdiği (Q/R192) polimorfizmdir. Her iki polimorfizm çeşitli patofizyolojik durumlarla ilgilidir. Üzerinde en çok çalışılan polimorfizmler bunlardır. Çünkü bu iki alloenzimin çeşitli substratlara karşı affiniteleri ve katalitik aktiviteleri farklılık göstermektedir. Paraokson, PON1<sub>192R</sub> tarafından altı kat daha hızlı hidroliz edilir. PON1<sub>192Q</sub> ise sarin, soman ve diazoksonu daha hızlı hidroliz etmektedir. Fenilasetat ve dihidrokumarinde ise farklılık görülmez. Tek bir aminoasitteki değişimin enzim aktivitesini bu kadar fazla etkilemesi enzimin yapısına bağlanmıştır. 192. pozisyondaki arginin aktif bölgenin önemli bir yerindedir. Bu polimorfizm aynı zamanda LDL'yi oksidasyondan koruma özelliğini de etkiler. PON1<sub>192Q</sub> alloenzimi daha koruyucudur (2, 4).

M/L55 polimorfizmi substratla ilişkiyi değiştirmez. Enzimin düşük serum aktivitesi ve konsantrasyonu ile ilişkilidir. M aleli taşıyanlarda düşük PON1 mRNA seviyeleri bulunmuştur. L aleli taşıyanlar, daha stabildir ve proteoliz daha dayanıklıdır. Bu da yüksek serum aktivitesine sahip olmalarını açıklayabilir (5).



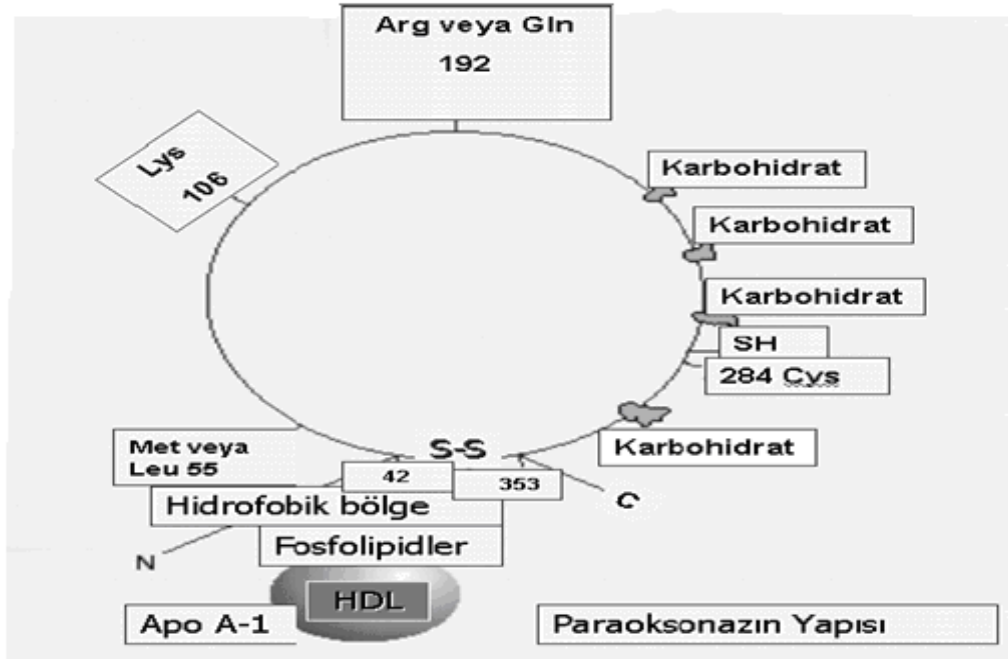
Şekil 1: PON1 geninin polimorfik bölgeleri

## 2.6.4. PON1

### 2.6.4.1. PON1'İN YAPISI

İnsan serumundan saflaştırılan PON1, minimum 43000 dalton ağırlığında, 354 amino asitten oluşan bir glikoproteindir. Ağırlığının %15.8'ini oluşturan karbohidrat üniteleri, 4 farklı konumda proteine bağlı olarak bulunur. (Şekil 1).

PON1'in amino asit bileşimi incelendiğinde, lösin içeriğinin yüksek olmasına karşılık, "kringle" yapısına sahip olacak kadar sistein içermediği görülür. Bununla beraber, 42, 284 ve 353. konumlarda yer alan sistein artıklarının, PON1'in yapısal ve fonksiyonel özelliklerine katkıda bulunduğu söylenebilir. Protein yapısında bulunan tek disülfid bağı, polipeptid zincirinin siklik yapıda olmasına neden olmaktadır (Şekil 2).



Şekil 2. İnsan Serum Paraoksonaz Enziminin Yapısı

KC'de sentezlenen ve dolaşıma verilen PON1'in HDL yapısında yer aldığı bilinmektedir. PON1, hidrofobik N-terminal bölgesi aracılığıyla HDL lipidlerine kolayca bağlanabilmektedir. PON1'i bağlayan HDL alt birimleri, Apolipoprotein A1(Apo A1) ve Apo

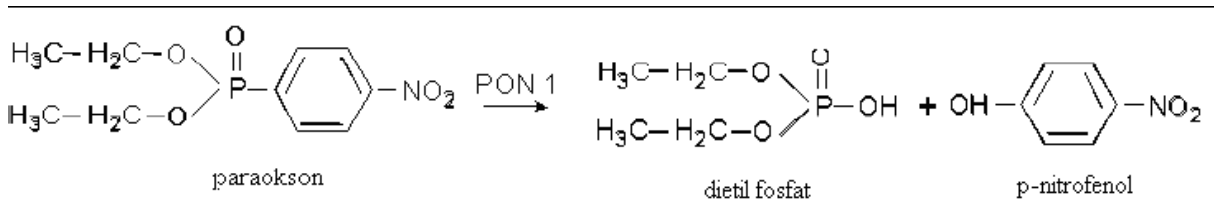
J (klusterin) proteinlerini de içerdiğinden, Apo A1 ve Apo J'nin bağlanmada rol oynayabileceği düşünülmektedir (46).

PON1, 6 yapraklı beta tabakası bir yapı içerir (47). Her bir yaprak 4 beta tabakası içerir ve enzimin merkez kısmında yapı ve katalitik aktivitesinin korunması için gerekli olan iki kalsiyum atomu vardır. Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup, yapıdan uzaklaştırılması irreversibl denatürasyona neden olmaktadır. Diğeri ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur. Bu kalsiyum iyonu bir su molekülü ile fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir (47).

#### 2.6.4.2. PON 1'İN SUBSTRATLARI

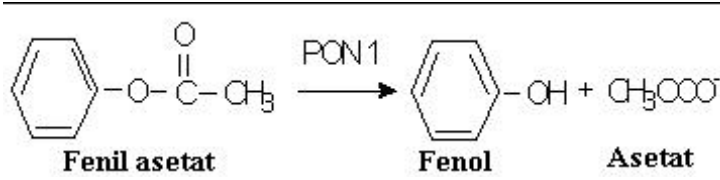
PON1 tarafından hidrolize edilen bileşikler olan organofosfatlar (paraokson ve diazokson), sinir gazı ajanları (somon ve sarin) ve aromatik esterler (fenilasetat) PON1'in non-fizyolojik substratları olduğu bildirilmiştir .

Parokson (O, O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat), paroksonazın hem Aril esteraz aktivitesini hem de Paroksonaz aktivitesini ölçmede en sık kullanılan substrattır (Şekil 3).



Şekil 3. Paraoksonazın Paraoksonu hidrolizi

Fenil asetat ise sadece arilesteraz aktivitesini ölçmede kullanılan bir substrattır. PON1 polimorfik dağılımı nedeniyle aynı substrata karşı farklı aktivite gösterir(46) (Şekil 4).



Şekil 4. Paraoksonazın Fenil Asetatı hidrolizi

PON1 lipoprotein kaynaklı fosfolipid peroksidlerinde ve kolesterol ester peroksidlerinde bulunan O ve P arasındaki ester bağımlı hidroliz ettiği gösterilmiştir. Okside olmuş lipoproteinler ve kolesterol esterlerinin HDL bağımlı PON1 için fizyolojik substrat olduğu düşünülmektedir. İnsan arteriyel duvar hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada PON1'in okside 1-palmitil-2-araşidonoil-sn-glisero-3-fosforilkolin üzerindeki fosfolipid türlerini hidroliz ettiği, böylece HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruyucu etkisinin paraokson hidroliz kapasitesinden bağımsız olduğu görülmüştür (48,49).

#### 2.6.4.3. PON1'İN FİZYOLOJİK FONKSİYONU

Serum paraoksonaz enziminin, aromatik karboksilik asit esterleri ve paraokson, diazookson, sarin, somon gibi organofosfat türevlerini detoksifiye ettiği pek çok çalışma ile göstermiştir. Paraoksonaz enzimi, paraoksondaki O-P ester bağımlı hidrolizinden sorumlu olan esterazdır. Son yıllarda PON1'in ayrıca laktonaz, siklik karbonat esterleri ve farmakolojik ajanları da hidroliz ettiği gösterilmiştir.

HDL, LDL'yi oksidasyondan koruyabilme yeteneğine sahiptir. Çeşitli mekanizmalar bu koruyucu rolün açıklanmasında önem kazanmaktadır. HDL ile ilişkili enzimlerin [PON1, LCAT, Trombosit Aktive Edici Faktör Asetil Hidrolaz (PAF-AH)] oksidatif modifikasyonlara karşı lipoproteinleri koruduğuna inanılmaktadır. Paraoksonaz; LDL'yi, Cu iyonunun ve serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan korumaktadır.

HDL yapısında bulunan PON1 enzimi, Minimal Modifiye LDL (MM-LDL)'deki aktif lipidleri yıkar ve böylece arter duvarında yer alan hücrelerde inflamatuvar cevap oluşumuna

karşı koruyucu etki gösterebilir. Paraoksonaz, okside LDL'deki kolesterol linoleat hidroperoksitleri ve spesifik okside fosfolipidleri de hidroliz eder.

Paraoksonazın, HDL'yi oksidasyondan koruduğunu gösteren çalışmalarda saflaştırılmış PON1'in HDL'ye eklenmesi ile doza bağımlı olarak oksidasyonun lag fazının uzadığı, HDL'de lipid peroksit ve aldehit birikiminin %95'e kadar azaldığı gösterilmiştir. Oksidatif stres altında sadece lipoproteinler değil hücrenin yapısındaki lipidler de lipid peroksidasyonuna uğramaktadır. Paraoksonaz lipid peroksitlerinin aterosjenik etkilerini nötralize eder, hücre membranlarını koruyucu etki gösterir. LDL oksidasyonu esnasında oluşan okside fosfolipidlerden okside kolesterol esterleri, lizofosfatidilkolinler PON1 enzimidaki serbest sülfidril grubu ile (Sistein 284'deki) etkileşime girer ve enzimin inaktive olmasına yol açarlar.

LDL oksidasyonu esnasında PON1'in inaktive olduğuna ilişkin görüşler çalışmalarda desteklenmiştir. Yapılan bir çalışmada, PON1'in arilesteraz aktivitesinin, LDL oksidasyonu esnasında yaklaşık %50 oranında azaldığı gösterilmiştir. LDL'yi oksidasyona karşı koruyan paraoksonaz enzimi okside LDL oluşumu esnasında zamana bağlı olarak inaktive olmaktadır. Bu olayın mekanizması henüz yeterince açıklanamamıştır. Paraoksonazın serbest sülfidril grubu ile lipid peroksidasyonunun bazı ürünleri arasında bir ilişki olabilir. Bu durum; okside LDL'deki okside kolesterol arşidonat veya okside arşidonat içeren fosfolipidler ile PON1'in sistein 284. bölgesinde bulunan serbest sülfidril grubu arasındaki etkileşim ile ilişkili olabilir (50).

Oksidatif sistemdeki  $Cu^{1+}/Cu^{2+}$  iyonlarının oksidasyon esnasında, PON1'in paraoksonaz/arilesteraz aktivitesi için gerekli olan Ca iyonunun yerine geçmesinin PON1'in kısmen inaktivasyonundan sorumlu olabileceği de düşünülmektedir. Ayrıca bir çalışmada,  $H_2O_2$ 'nin PON1'in güçlü inaktivatörü olduğu da gösterilmiştir. Son zamanlarda MM-LDL'nin, Apo J/Paraoksonaz oranının artmasına neden olduğu ve bu olayın okside LDL tarafından PON1 inaktivasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan bir başka çalışmada ise, karaciğerde PON1 mRNA seviyelerinin okside fosfolipidlerle inhibisyon sırasında azaldığı gösterilmiştir. Yine son yıllarda flavonoidlerin; LDL'nin endojen

antioksidanlarının yıkımını engellediği, LDL'nin hücre aracılı oksidasyonunu inhibe ettiği ve HDL ilişkili enzim olan PON1'in aktivitesini koruduğu gösterilmiştir. Paraoksonaz organofosfat hidrolizini gerçekleştirebilmek için Ca gerektirirken; lipid peroksidasyonundan koruyucu antioksidan aktivitesi için Ca gerektirmez (50).

Çalışmalar, PAF-AH ve PON1'in aynı ortamda bulduklarında MM-LDL'deki aktif lipidleri tek başlarına gösterdikleri etkinin toplamı bir etki ile yıktıklarını göstermiştir. LDL'nin  $Cu^{2+}$  iyonu ile uyarılmış oksidasyonunda PAF-AH; Apo-B100 modifikasyonunu ve konjuge dien oluşumunu inhibe eder, ancak TBARS oluşumu üzerine etkisi yoktur. Paraoksonaz ise hem lipid peroksit oluşumu hem de TBARS üretimini inhibe etmektedir. Paraoksonazın yokluğunda PAF-AH ve LCAT, LDL'yi oksidasyondan korumada çok etkili değildirler. Oksidatif stres altında, HDL'de oksidasyona maruz kalmaktadır. HDL-K, lipid peroksitlerin serumdaki en önemli taşıyıcısıdır. HDL-K yapısındaki kolesterol ester hidroperoksitler, LDL'de bulunanlara oranla daha hızlı ancak daha az reaktif hidroksitlere indirgenmektedir.

HDL'nin oksidatif modifikasyonu; ters yönde kolesterol taşıma fonksiyonunda bozulmalara yol açar. Paraoksonaz, HDL'yi oksidasyondan koruyarak ters kolesterol taşıma fonksiyonunun devamını sağlar. Bu durum makrofajlarda kolesterol birikimini engelleyerek köpük hücre oluşumunu ve ateroskleroz gelişimi yavaşlatmaktadır(50).

#### **2.6.4.4. PON1'İN SENTEZİ**

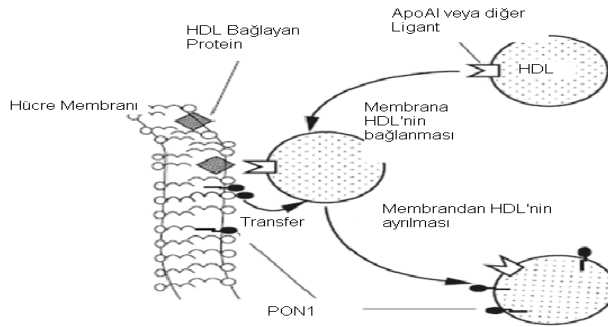
PON1 karaciğer tarafından üretilir ve kana verilir. Kanda HDL ile birlikte bulunur. İnsanda serum PON1 konsantrasyon ve aktivitesi geniş bir aralığa sahiptir. Enzim aktivitesinin ve konsantrasyonunun PON1 geninin polimorfizmiyle birlikte diet, yaşam biçimi ve çeşitli hastalıklardan etkilendiği gösterilmiştir.

#### 2.6.4.5. PON1'İN HÜCRELERDEN SALINIMI

PON1 sekresyonunun mekanizması önemlidir. Çünkü çeşitli faktörler bu mekanizmayı değiştirerek serum düzeyinin belirlenmesini sağlar. Lipoproteinlerin yokluğunda az miktarda PON1 sekrete edilir. Hücrelerden sekrete edilen PON1'i fosfolipid miçeller ve HDL sekresyonu stimüle ederken, LDL ve ApoA1 etki göstermez.

PON1 HDL ile fosfolipidlerden ayrılabilir. Membrana bağlı PON1 fenilasetata etki gösterir. HDL'nin belirmesiyle bu etki ortadan kaybolur. Bu da HDL'nin PON1'i hücre membranından ayırabildiğini gösterir. HDL ile indüklenmiş PON1 sekresyonu konsantrasyona bağlıdır. Aynı zamanda reseptöre de bağlıdır. HDL en uygun alıcı olmasına rağmen fosfolipid kompleks tek başına hücrelerden PON1 salınımını uyarma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir . Bununla birlikte sadece fosfolipid içeren lipid kompleks salınım için yeterli değildir. Bu da PON1 salgılanması için niye LDL'nin yetersiz olduğunu açıklamayı sağlayabilir .

PON1'in hücre membranının dış yüzeyinde bulunduğu ve HDL yaklaşınca lipoproteinler vasıtasıyla HDL'ye geçtiği belirtilmiştir . HDL için bir reseptör olarak daha önceden tanımlanan scavenger reseptör B1 (SR-B1)'in HDL ile PON1 ilişkisini sağladığı hipotezi ortaya atılmıştır. SR-B1 HDL'yi hücre membranına bağlanmasını ve hücre ile lipoproteinler arasında materyal değişimini sağlar. SR-B1, yüksek afinite ile HDL 'ye bağlanır ama bağı gevşektir ve fosfolipid komplekse bağlanma kapasitesi vardır. Sonunda PON1'in karaciğerden bol miktarda salındığı belirtilmiştir (Şekil 5) (45).



Şekil 5: Hücre membranında bulunan PON1'in HDL'ye transferi

#### **2.6.4.6. PON1 VE HDL**

PON1 gen polimorfizmi varyasyonun %25'ini oluşturur. %75 ise diğer faktörler tarafından sağlanır. HDL, PON1 için serum vektörüdür. Serum konsantrasyonunun önemli bir göstergesidir. HDL eksikliği olan durumlarda PON1 konsantrasyonu da düşmektedir. PON1 trigliseridden zengin HDL2 partiküllerinde gösterilmiştir. PON1'in büyük kısmı apoA1 içeren HDL ile birlikte. Aynı zamanda, HDL'nin apo j ve clusterin ile ilişkili PON1 içeren bir alt grubu daha vardır. PON1 'in büyük ebattaki HDL'ye bağlanma eğilimi diabet gibi HDL'nin azaldığı hastalıklardaki değişimini açıklayabilir (45).

#### **2.6.4.7. PON1 VE OKSİDATİF STRES**

PON1'in, LDL'nin hücre kaynaklı oksidasyonuna karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (3). PON1'in bunu nasıl yaptığının mekanizması tam olarak açıklanamamasına rağmen çalışmalarda PON1'in antioksidan kapasitesinde 284. pozisyondaki serbest sisteinin rol oynadığı bildirilmiştir . Aviram ve ark. yaptığı bir çalışmada sistein 284'de mutasyon olan PON1'in LDL'yi oksidasyona karşı koruyucu olmadığını göstermişlerdir (51).

HDL bağımlı PON1'in yalnız LDL oksidasyonunu değil, aynı zamanda HDL oksidasyonunu da engellediği gösterilmiştir. Bu etki PON1'in lipoprotein aracılı peroksitleri hidroliz edebilme özelliğine bağlıdır. PON1 lipoprotein kaynaklı fosfolipid peroksitlerinde ve kolesterol ester peroksitlerinde bulunan O ve P arasındaki ester bağımlı hidroliz edebildiği gösterilmiştir (52).

Paraoksonazın fosfotidilkolinleri hidroliz etme kapasitesi, okside LDL'deki kolesterol linoleat hidroperoksitleri ve hidroksitleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu bildirilmiştir (53).

LDL üzerine PON1'in antioksidan etkisi endotel hücrelerine monosit adezyonunu ve okside fosfolipidlere bağlanan makrofaj kemotaksisini azalttığı bildirilmiştir (54).

Yapılan çalışmalarda Paraoksonaz düzeyi ile oksidatif stres arasında karşılıklı bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür (55).

#### **2.6.4.8 PON1 VE DİABET**

Tip 1 ve Tip 2 diabette PON1 aktivitesinin azaldığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu azalmanın diabetik hastalarda oksidatif stresin artması sonucu antioksidan kapasitenin azalmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Aktivite üzerindeki etki muhtemelen genotipten bağımsızdır. Bununla birlikte PON1<sub>55L</sub>'nin diabetik retinopati ile ilişkili olduğu belirlenmiştir ve PON1<sub>192R</sub> daha çok kardiyovasküler hastalığı olan diabetiklerle ilişkilidir. L55M polimorfizmi ise azalmış glukoz toleransı, pankreas hücre harabiyeti ve artmış insülin rezistansı ile ilişkili olarak bulunmuştur.

Diabetiklerde PON1'in azalma mekanizması tam bilinmemektedir. Fakat artmış glukoz konsantrasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Glikasyon hem PON'u inaktive eder hem de HDL üzerindeki lipid peroksidasyonun artırır. Glike HDL oksidasyona da dirençsiz hale gelir. Yüksek glukoz seviyesi olan sağlıklılarda da PON1 aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir(45).

#### **2.7 PROTEİN OKSİDASYONU BELİRTEÇLERİNİN KLİNİK ÖNEMİ**

Proteinler oksidantlara maruz kaldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir. Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar, lipid ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedir. Bu ürünlerin oluşum hızının artması veya temizleyici mekanizmaların yetersiz kalması, proteinlerde dahil olmak üzere diğer hücresel moleküllerdeki oksidatif modifikasyonların artışına yol açar.

Pek çok sayıda mekanizmanın protein oksidasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar: PCO oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, 3- nitrotirozin (3-NT), ditirozin (diTyr), oluşumu olarak sıralanabilir. Potansiyel olarak bütün amino açil yan zincirleri oksidatif modifikasyona uğrayabilme özelliğindedir. Bu yüzden, çok

sayıda ve farklı çeşitte oksidatif protein modifikasyonu olmasına bağlı olarak, protein oksidasyonunun tek bir evrensel belirteci yoktur. Bazı oksidatif protein modifikasyonları, hem oksidasyona uğrayan amino asit bakiyesi, hem de oluşturulan ürünler bakımından gayet spesifiktir. Bazı oksidatif protein modifikasyonları ise global özellik taşır, çok sayıda amino asit bakiyesinde değişikliğe yol açarak, yine çok sayıda ürün oluşturabilir. Spesifik modifikasyonlara tirozin'nin ditirozine dönüşümü, global modifikasyonlara ise Pro, Arg, Lys, ve Thr amino asitlerinin yan zincirlerinin, 4-hidroksi-2-nonenal ile reaksiyonu sonucunda oluşan PCO'ler örnek olarak gösterilebilir. Protein oksidasyonunun saptanmasında HPLC, ELISA, izotop dilüsyon gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi, Western blot ve spektrofotometri teknikleri kullanılmaktadır. 3-NT, diTyr gibi spesifik belirteçler biyolojik materyallerde oldukça düşük düzeyde bulunduğundan, bu belirteçlerin düzeylerinin saptanması oldukça duyarlı ve pahalı yöntemleri gerektirmektedir. Bu yöntemlerin uygulanması oldukça yüksek maliyetlidir.

Spesifik modifikasyonlar risk açısından değerlendirildiğinde; global modifikasyonlara göre protein molekülünün daha küçük bir kısmında etkili olması nedeniyle, protein fonksiyonları için daha az bir risk taşır.

Lipit peroksidasyon ürünleri ile karşılaştırıldığında, PCO gruplarının oksidatif stres belirteci olarak kullanılmasının bazı avantajları vardır. PCO'in bu avantajları arasında nispeten erken dönemde oluşması ve stabil olması sayılabilir. Yanlış katlanmış proteinler, doğal proteinlere göre geri dönüşümsüz bir protein modifikasyonu olan karbonilasyona daha yatkındır. Karbonilasyona uğramış protein onarılamayacağından, proteozom kompleksinin rol oynadığı proteolitik metabolik yola yönlendirilir. Hücreler oksidasyona uğramış proteinleri saatler ve günler içinde yıktığı halde, lipit peroksidasyon ürünlerini dakikalar içinde yıkmaktadır. Hastalarda erken dönemde oluşan PCO grupları, oksidatif stresin diğer parametreleri olan glutatyon disülfid (GSSG) ve malondialdehit ile karşılaştırıldığında uzun dönem kan dolaşımında kalır. PCO'lerinin yüksek düzeyde bulunması sadece oksidatif stresteki artışı değil, aynı zamanda protein fonksiyon bozukluğunu göstermektedir. PCO'lerinin kimyasal olarak dayanıklılığı, PCO'ni laboratuvar ölçümleri için uygun bir parametre haline getirmektedir. PCO'nin -80oC'de 3 ay süreyle stabil olduğu gösterilmiştir.

Pek çok hastalıkta, oksidatif stresin bir sebep mi yoksa primer hastalık sürecinin bir sonucu mu olduğu açık değildir. Diğer taraftan, protein oksidasyonu, protein fonksiyon bozukluğu ve hastalıklar arasındaki ilişkiler de büyük ölçüde açıklığa kavuşmamıştır. Bununla birlikte enzimlerin ve yapısal proteinlerin oksidatif modifikasyonlarının hastalıkların etyolojisinde önemli rol oynayabileceği kesinlik kazanmıştır. Günümüzde oksidatif stres çalışmalarındaki en büyük çaba, çeşitli insan hastalıklarında spesifik olarak okside olmuş proteinlerin tanımlanması üzerine yoğunlaşmaktadır (56).

### **2.7.1 İLERİ PROTEİN OKSİDASYON ÜRÜNLERİ (AOPP):**

Reaktif oksijen türleri (ROT) vücutta sürekli olarak oluşmaktadır. ROT, inflamatuvar ve dejeneratif hastalıklar gibi insandaki birçok patolojik duruma katkıda bulunur. Oksidatif stresin kritik olan hastaların hastalıklarının gelişiminde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. (57, 58). Serbest radikal zararına neden olan dört ana grup ürün vardır. Bunlar lipid peroksidazlar, isoprostenazlar, DNA hidroksilasyon ürünleri ve protein karbonil bileşikleridir. Oksidatif stresin değerlendirilmesinde çok sayıda uygulanabilecek yöntem olduğu halde, bu yöntemlerin birçoğunun otomasyon eksikliği ve/veya karışık yöntemlerinden dolayı rutin klinik laboratuvarlarında kullanılamamaktadır. Örneğin isoproteenazların ölçümü büyük doğruluğa sahiptir ve vücut sıvılarındaki lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde güvenilirdir. Fakat karışık yönteminden dolayı klinik çalışmalarda kullanımı sınırlanmaktadır (59).

1996'da kronik üremik hastaların plazmasında, Advanced oxidation protein products (AOPP) olarak adlandırılan, yeni bir oksidatif stres belirteci tespit edildi (60) ve çalışma şekli klinik kimya analizlerine programlandı.

AOPP'nin mononükleer fagositleri aktive ederek, nötrofil ve monositler arasında sitokin benzeri medyatör gibi davrandığı da öne sürülmektedir. (60, 61, 62).

Bu bilgilerin ışığında biz de çalışmamızda diabetli hastalarda oksidan-antioksidan durumun değerlendirilmesi için PON1 ile AOPP'nin birlikte kullanılıp, kullanılamayacağını tesbit etmeyi amaçladık. Aynı zamanda bu değerler ile lipid profili ve HbA1c'nin korele olup olmadığını araştırdık

## **4. GEREÇ VE YÖNTEMLER**

### **4.1. GEREÇLER**

#### **4.1.1. HASTA VE KONTROL GRUPLARI**

Çalışma grubumuzu Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvurmuş ve diabet tanısı almış 93 kişi oluşturdu.

Kontrol grubu olarak Diabeti olmayan, Koroner Arter Hastalığı olmayan, Metabolik Sendrom kriterleri bulunmayan, karaciğer,böbrek ve tiroid hastalığı olmayan 30 kişi ile çalışıldı.

#### **4.1.2. KAN ÖRNEKLERİ**

Çalışma grubuna dahil edilen hastalardan 12 saat açlık sonrası alınan kan örnekleri yarım saat içinde 1300 g'de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı.. Hemoliz olan serum örnekleri çalışmaya dahil edilmedi. Kan örnekleri katkısız tüplere alındı. Serum örnekleri analiz edileceği güne kadar (-)20<sup>0</sup>C'de saklandı.

#### **4.1.3 KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER**

Serum Total Kolesterol, HDL, Trigliserid ve glukoz ölçümleri Roche Diagnostics firmasının ticari kitleri ile yapıldı. Hemogloblin A1c ölçümü HPLC yöntemi ile yapıldı.

Fenil Asetat; Aldrich firmasından, Eserine; Sigma'dan, Tris, Chloramine T, Sodyum Hidrojenfosfat, Asetik asit; Merck'ten, Potasyum İodit ve Potasyum dihidrojen fosfat; Baker'dan temin edildi. Aseton ve kalsiyum klorür Kimya Ofisi'nden alındı.

#### 4.1.4. KULLANILAN CİHAZLAR

- Roche Modüler P800 analizör (Roche Diagnostics GmbH Corp.)
- Shimadzu UV 1601 spektrofotometre
- Linear Kromalin Fotometre
- TOSOH G7 HPLC
- Nüve RF 800 R Santrifüj
- Ayarlanabilir Sıcak Su Banyosu

#### 4.2. YÖNTEMLER

##### Total kolesterol test prensibi: Kolesterol CHOD-PAP yöntemi

CHOL esteraz

Kolesterol esteri + H<sub>2</sub>O —————® kolesterol + yağ asidi

CHOL oksidaz

Kolesterol + O<sub>2</sub> —————® Δ<sup>4</sup>- kolestenon + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Peroksidaz

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-aminofenazon + fenol —————® 4 (p-benzokinon monoimino) fenazon + 4H<sub>2</sub>O

- Oluşan renkli kompleks fotometrik olarak okunur.

##### HDL-C test prensibi:

PEG modifiye enzim oksidaz

PEG-kolesterol

HDL-kolesterol ester + H<sub>2</sub>O —————® HDL-kolesterol + RCOOH

esteraz

PEG- kolesterol

HDL-kolesterol + O<sub>2</sub> —————® 4-kolestenon + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

oksidaz

peroksidaz



mor-mavi pigment + 5H<sub>2</sub>O

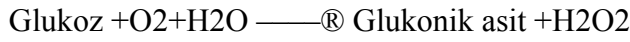
Oluşan renk konsantrasyonu fotometrik olarak ölçülür.

(\*HSDA: N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5 –dimetoksianilin)

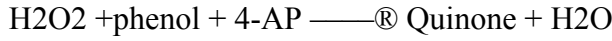
### **Glukoz test prensibi:**

Glukoz oksidaz yöntemi

GOD



POD

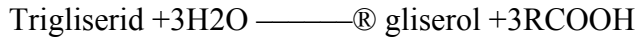


Oluşan kırmızı renkli kinon bileşikleri fotometrik olarak ölçülür.

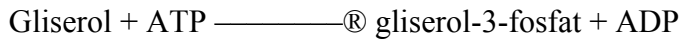
### **TG test prensibi:**

TG GPO-PAP yöntemi

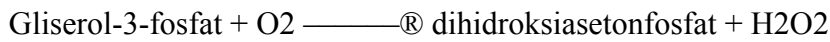
LPL



GK-Mg<sup>2+</sup>



GPO



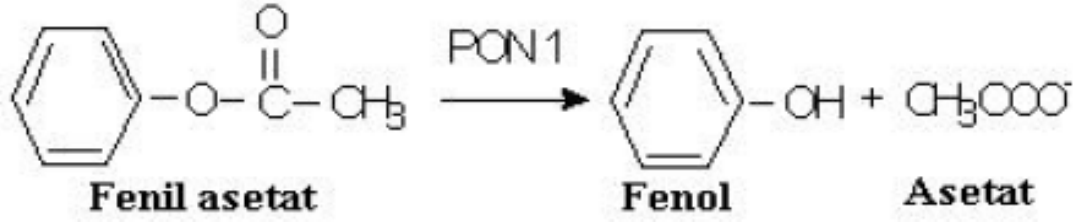
(LPL= Lipoprotein lipaz, GK= Gliserokinaz, GPO= Gliserol fosfat oksidaz)

### **HbA1c ölçüm yöntemi:**

Tosoh G7 cihazında iyon değişim prensibine dayanan HPLC yöntemi ile ölçüldü.

#### 4.2.1. SERUM PON1 AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ

Yöntemin prensibi : Ölçüm için Eckerson (63) tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı. Yöntem fenil asetatın insan serumunda bulunan paraoksonaz ile fenol ve asetata dönüştürülmesine dayanır. Butiril kolin esterazları inhibe etmek için reaksiyon karışımına eserine eklendi. Oluşan fenolün absorbansındaki artış 25°C'de 270 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.



Şekil 6. Substrat olarak Fenil Asetat kullanımı

Yöntem manuel olarak çalışıldı.

##### Reaktifler

- Reaksiyon karışımı; 20 mM Tris (pH: 8) tampon içinde 0,9 mM CaCl<sub>2</sub>; 20 mmol Tris tartıldı. Distile su ile bir litreye tamamlandı pH'ı 8 olarak pHmetre ile tesbit edildi. İçine 0,9 mmol CaCl<sub>2</sub> tartılarak eklendi.
- 100 mM Fenil asetat; %99'luk fenil asetatın 13 µl alınıp üzerine 500 µl aseton eklenip çözüldü. 500 µl'de reaksiyon karışımından eklendi. Her çalışmada taze olarak hazırlandı.
- 62,5 mM Eserine; 62,5 mmol eserine tartılıp bir litreye tamamlandı.

Deneyin Prosedürü :

Serumlar reaksiyon karışımı ile 1/40 oranında dilüe edildi. 920 µl reaksiyon karışımına, 25 µl dilüe serum ve 80 µl eserine (son konsantrasyon 5µM) eklendi. 10 dakika 37<sup>0</sup>C'de inkübe edildi. 10 µl 100 µM'lık fenil asetat eklenerek (son konsantrasyon 1 µM) spektrofotometrede 270 nm'de okundu.

Serum PON1 aktivitesinin hesaplanması: İlk 1 dakika boyunca absorbanstaki değişim dikkate alınmadı. Son 4 dakika boyunca olan absorban değişiminden 1 dakikadaki ortalama absorban değişimi ( $\Delta A$ ) hesaplandı. Molar absorbtivite ( $\epsilon:1310 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) kullanılarak sonuçlar U/mL birimiyle rapor edildi.

Bir ünite PON1 aktivitesi dakikada 1 µmol fenol oluşturan enzim aktivitesi olarak tanımlandı.

#### **4.2.1.1 Serum Pon1 Aktivitesinin Performans Çalışmaları**

##### **Presizyon (Tekrarlanabilirlik) Çalışması**

Serum PON1 aktivitesinin ölçüm yönteminin çalışma içi ve gün içi tekrarlanabilirliğini belirlemek için serum havuzu oluşturuldu. Serum havuzu oluşturmak için HDL değerleri yüksek olan, bilirubin düzeyleri normal olan poliklinik hastalarının serumları kullanıldı. Çalışma içi ve gün içi tekrarlanabilirlik için serumlar porsiyonlara bölündü. Gün içi çalışmasında çalışma zamanına kadar serumlar +4<sup>0</sup>C'de saklandı. Çalışma içi ve gün içi tekrarlanabilirlik için arka arkaya 30 kez çalışıldı. Ortalama, standart sapma ve varyasyon katsayısı değerleri hesaplandı.

#### **4.2.2 SERUM AOPP DÜZEYİNİN ÖLÇÜMÜ**

Yöntemin Prensipleri: AOPP ölçümü Witko-Tarsat ve arkadaşlarının tanımladığı yöntemle yapıldı. Bu yöntemle göre; AOPP oluşumu klorine oksidanların (kloraminler ve hipokloröz asit gibi) oluşumu ile indüklenmektedir. Bu sebeple konsantrasyonu da bunlara korele olarak değişir. AOPP konsantrasyonu ölçümünde bu ilişki nedeni ile Chloramine-T standart olarak kullanıldı (64).

**Reaktifler:**

**Reaktif 1 (Asetik Asit):** 96%, v/v olacak şekilde hazırlandı.

**Reaktif 2 ( KI):** 1.16 mol/L olacak şekilde hesaplandı ve PBS (20 mmol/L, pH:7.4) ile litreye tamamlandı.

**Tampon:**

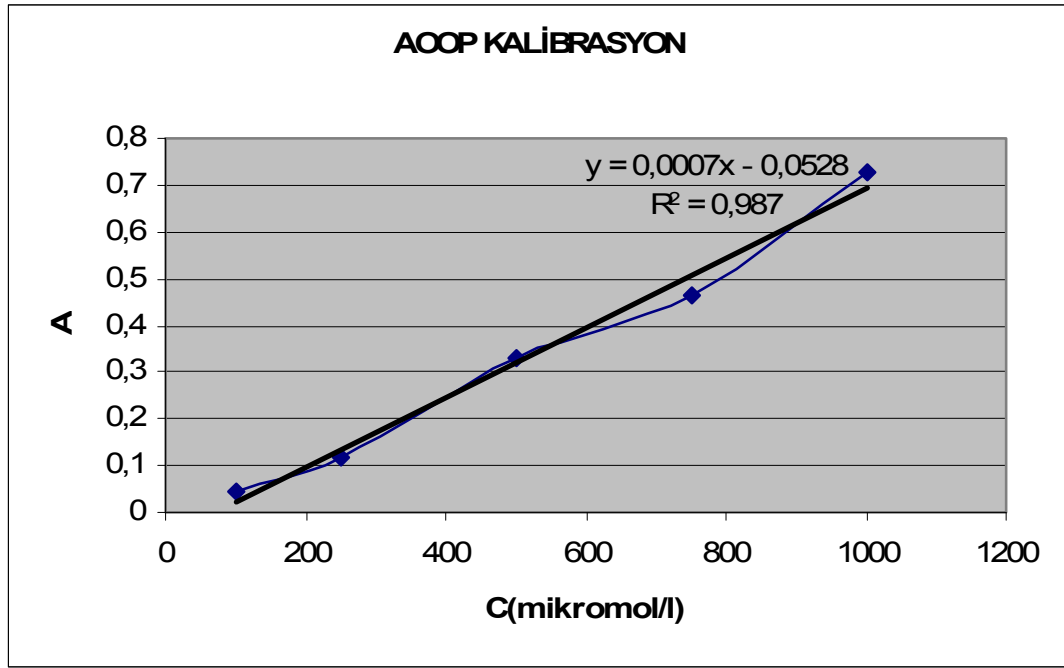
PBS (20 mmol/L, pH:7.4) hazırlanması:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 'den 5.796 gr,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'den 0.52 gr ve NaCl'den 8.71 gr tartıldı ve distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Standart 1: Chloramine T solüsyon	(1000 $\mu\text{mol/L}$ )
Standart 2: Chloramine T solüsyon	(750 $\mu\text{mol/L}$ )
Standart 3: Chloramine T solüsyon	(500 $\mu\text{mol/L}$ )
Standart 4: Chloramine T solüsyon	(250 $\mu\text{mol/L}$ )
Standart 5: Chloramine T solüsyon	(100 $\mu\text{mol/L}$ )

Tablo 11. AOPP standartları

**Standartlar:**

- Chloramine-T stok solüsyonu (10 mmol/L), PBS (20 mmol/L, pH:7.4) ile 100 kez seyreltilerek 1000  $\mu\text{mol/L}$  konsantrasyonda ana standart çözeltisi (standart 1) elde edildi.
- Chloramine-T ana standart çözeltisi (standart 1: 1000  $\mu\text{mol/L}$ ) 5 noktalı kalibrasyon eğrisi oluşturabilmek için; PBS (20 mmol/L, pH 7.4) ile seyreltilerek 750, 500, 250, 100  $\mu\text{mol/L}$  konsantrasyonlarda Chloramine-T standartları hazırlandı.
- Daha sonra Chloramine-T standartları, Linear Kromalin fotometrede çalışılarak, her 5 standartın konsantrasyonuna karşılık gelen absorbans (A) değerleri elde edildi ve bu değerlere göre cihaz tarafından kalibrasyon eğrisi oluşturuldu (Şekil 7).



Şekil 7. AOPP Kalibrasyon eğrisi

- Herbir konsantrasyona karşılık gelen absorbans değeri aşağıda gösterilmiştir

Standartlar	Konsantrasyon (mikromol/L)	Absorbans (A)
Standart 1	1000	0,7277
Standart 2	750	0.4646
Standart 3	500	0.3289
Standart 4	250	0.1158
Standart 5	100	0.0458

Tablo 12. AOPP Konsantrasyon-Absorbans değerleri

Deneyin Prosedürü:

Çalışma öncesinde oda ısısına getirilen örnekler Linear Cromaline Fotometre cihazında çalışıldı. Bunun için;

- 10 µL serum üzerine 160 µL PBS reaktifi eklenip karıştırılarak 25 sn inkübe edildi.
- Sonra 20 µL asetik asit eklenip, 25 sn inkübe edildi.
- Son olarak 10 µL KI çözeltisi eklendi ve tekrar 25 sn inkübe edilip absorbands 340 nm'de okutuldu.
- Linearite sınırının üzerinde çıkan serumlar dilüe edilerek çalışıldı.
- Ölçülen AOPP konsantrasyonları Chloramine-T ünitesi ile µmol/L olarak belirlendi.
- Tüm basamaklar 37°C'de tek küvette gerçekleştirildi ve zaman aralıkları, her basamak için, 25 sn veya daha uzun olacak şekilde ayarlandı.

### 4.3 PON1 AKTİVİTE PERFORMANS KRİTERLERİ

#### 4.3.1 PON1 PRESİZYON ÇALIŞMASI

PON1 aktivitesi ölçüm yöntemi için yapılan çalışma içi ve çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen sonuçlar tablo 13'de gösterilmiştir.

TEKRARLANABİLİRLİK			
	ORT	SD	%CV
1.GÜN	41,712	5,8144	13,93939
2.GÜN	36,656	4,1712	11,37931
3.GÜN	42,976	5,056	11,76471
4.GÜN	39,184	3,792	9,677419

**Tablo 13 :** Tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları

## 4.4 AOPP ÖLÇÜM YÖNTEMİNİN PERFORMANS KRİTERLERİ

### 4.4.1 AOPP PRESİZYON ÇALIŞMASI

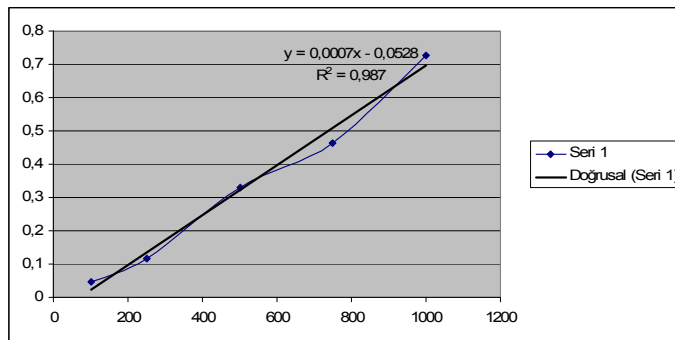
50 sağlıklı insana ait serumdan serum havuzu oluşturuldu ve 4 porsiyona bölünerek (-)20°C’de saklandı. Herbir gün içi çalışmada, bir porsiyon dondurucudan çıkartılarak yaklaşık 45 dakika oda ısısında çözünmesi beklendi.

Daha sonra porsiyon 30’a bölündü. Herbiri ayrı olarak çalışıldı. Buna göre aşağıdaki sonuçlar elde edildi (Tablo 14).

	Xort±SD	CV
Gün içi çalışma (1. gün)	170±3,825	% 2.25
Gün içi çalışma (2. gün)	172±5,41	% 3.15
Gün içi çalışma (4. gün)	167±6,66	% 3.99
Gün içi çalışma (10. gün)	175±9,13	% 5.22

### 4.4.2 AOPP LİNEARİTE ÇALIŞMASI

Chloramine-T stok solüsyonu (10 mmol/L), PBS (20 mmol/L, pH:7.4) ile 10 kez seyreltilerek 1000 µmol/L konsantrasyonda ana standart çözeltisi elde edildi. Daha sonra bu çözelti de PBS (20 mmol/L, pH:7.4) ile seyreltilerek 100, 250, 500, 750, 1000 µmol/L konsantrasyonlarda Chloramine-T standartları hazırlandı ve kalibrasyon eğrisi elde edildi. 100-1000 µmol/L konsantrasyonlar arasında kalibrasyon eğrisi lineer bulundu (Şekil 8).



Şekil 8. AOPP Linerite grafiği

Standartlar	Konsantrasyon (mikromol/L)	Absorbans (A)
Standart 0	1000	0,7277
Standart 1	750	0.4646
Standart 2	500	0.3289
Standart 3	250	0.1158
Standart 4	100	0.0458

#### 4.5. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Hasta grupları ile kontrol grubu arasındaki karşılaştırmalar, gruplar homojen dağılım gösterdiğinde bağımsız Student t testi ile homojen dağılım göstermediğinde Mann Whitney-U testi ile uygulanıldı. Parametreler arasındaki korelasyon Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi.

Tüm istatistiksel analizler “SPSS for Windows versiyon 11.0” paket program ile yapıldı.

## 5. BULGULAR

### 5.1 HASTA İLE KONTROL GRUBUNDA ÖLÇÜLEN PARAMETRELER

Diabetes Mellitus'lu hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubuna ait yaşların ortalamaları ile standart sapma değerleri tablo 16'de gösterilmiştir. Hastaların demografik bilgileri ile biokimyasal değerleri tablo 18'de gösterilmiştir.

	Çalışma Grubu		P
	Diabetli Grup (n=93)	Sağlıklı Kontrol Grubu (n=30)	
	Mean±SD	Mean±SD	
Yaş (yıl)	54,24±15,01	33,03±10,47	0,00

**Tablo 16:** Hasta ve kontrol gruplarının yaşa göre dağılımı

Diabetes Mellitus'lu hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubuna ait PON1 aktiviteleri ve AOPP değerlerine ait ortalama ve standart sapma değerleri tablo 17'te verilmiştir. Diabetes Mellitus'lu hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında PON1 aktiviteleri istatistiksel olarak anlamlı düşük ( $p=0,042$ ) ve AOPP düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ( $p=0.000$ ).

	Diabetli Grup (n=93)	Sağlıklı Kontrol Grubu (n=30)	P
	Mean±SD	Mean±SD	
PON1 (U/ml)	36,48±19,8	45±20	0,042
Min-max	10,9-125,14	18,9-93,9	
AOPP ( $\mu\text{mol/L}$ )	1024±417	315±170	0,000
Min-max	172-1702	60-569	

**Tablo 17 :** Diabetes Mellitus'lu hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının PON1 aktiviteleri ile AOPP düzeyleri

Daha önceki yayınlarda AOPP düzeyleri genelde plazmada bakıldığı için sağlıklı kontrol grubunun ve diyabetiklerin değerleri bizimkine göre düşük bulunmuş. Sağlıklı kontrol grubu ortalama  $79,8\pm 23,72$   $\mu\text{mol/L}$ , diyabetik grupta ortalama  $157,5\pm 75,2$  olarak ölçülmüş

(65). PON1 aktivite değerleri ise substrat olarak fenil asetat kullanıldığında bizimkilere yakın olarak bulunmuş (ortalama 59,33±21,97 U/ml) (66).

NO	ADI	YAŞ	KİLO	DM	HBA1C	GLC	CHOL	HDL	LDL	üre	CREA	PON	AOPP
1	FİKRIYE ÖNER	57	57	var	6,2	103	178	42	108	32	0,8	47,19	431,7
2	PELUZE ÇELEBİ	62	80	var	6,8	134	192	53	89,4	34	0,7	94,38	616,4
3	NÖZLEM ÇELİK	17	85	var	7,4	100	201	57	126	22	0,6	48,45	353,5
4	EMİN HARMAN	80	75	var	8	137	154	50	83,8	96	1,4	32,86	782,9
5	FEHMİ KOÇAK	67	75	var	12	272	292	42	216	46	1,1	48,45	426,7
6	ŐÜKRAN DEMİRTAŐ	21	48	var	6,7	113	93	53	13,2	26	0,6	72,89	295,4
7	ELMAS ÖZTÜRK	42	81	var	8	139	124	46	43,8			60,25	766,6
8	ISLAYS BAŐKÖY	56	56	var	14,9	382	267	67	174	48	0,7	94,8	498,6
9	FİKRIYE ÇITACI	70	80	var	8,9	191	194	49	120	24	0,8	42,98	1702
10	HASİBE KIZILET	56	80	var	6,6	105	200	52	126	26	0,9	87,64	362,7
11	ADİL GÜL	41	78	var	11,5	368	286	46	103	23	1	61,09	491,4
12	FATMA DAMAT	63	73	var	7,1	153	207	53	119	40	0,9	68,26	436,3
13	AYHAN ERTAN	48	102	var	6,3	102	220	53	154	34	0,8	63,62	479,7
14	HATİCE ŞAHİN	69	55	var	6,4	99	174	56	96	43	1	67,41	544,2
15	NAZLI AY	65	70	var	7,7	163	142	68	58	30	0,9	62,36	347,3
16	HATİCE SEZER	63	90	var	10,9	237	290	73	172	37	0,8	125,1	447,2
17	SAADET AKAR	38	65	var	5,7	89	192	47	116	26	0,8	42,98	458,3
18	ZENNURE ATMACA	65	70	var	14	302	287	60	200	39	0,8	50,98	547,9
19	SUKTAN OLGUN	47	84	var	6,8	116	216	69	124	38	0,7	62,78	651,9
20	EMRAH TOKER	17	60	var	9,2	46	146	41	89,6	20	0,8	72,89	805,8
21	MERYEM CAN	16	53	var	10,1	340	133	59	57	11	0,6	18,54	508,8
22	ONNİK ASLANYAN	76	90	var	7,6	134	226	33	164	37	1,3	50,56	790,5
23	D MEHMET ÇAKAR	75	110	var	10,3	162	178	37	118	30	1	24,86	457,7
24	ZEKİYE OYULMAZ	75	50	var	11,2	238	201	51	110	33	0,8	82,58	405,2
25	ÖMER FİDAN	65	88	var	8,7	152	152	43	79,6	43	1	36,66	539,1
26	HASAN BAYRAM	57	72	var	10,7	497	216	30	168	29	1,1	39,18	1267
27	ŐÜKRIYE ÖZTİNÇ	73	71	var	7,7	138	273	39	201	27	0,8	43,4	983,9
28	HÜSNIYE DEİZER	62	68	var	9,1	299	238	52	126	36	0,7	80,05	668,9
29	NAZİRE ÖZSU	63	64	var	11,1	407	153	68	71,4			26,12	704,4
30	SATI YAŐLIÇİMEN	40	92	var	7,9	129	140	47	65,2	34	0,8	28,65	718,1
31	NAZO KAPLAN	57	100	var	6,2	116	176	48	105	25	0,8	45,93	688
32	REFİYE ÖZSOY	45	48	var	5,9	94	174	48	117	20	0,7	29,91	962,1
33	MÜJGAN KÜÇÜK	35	115	var	6,6	87	238	40	148	15	0,7	44,66	916,4
34	MEDİNE ÖZTATLI	48	94	var	6,5	111	224	50	149	20	0,7	54,35	481,2
35	MUHARREM ÇALIŐKAN	66	55	var	6,1	136	132	53	63	30	0,8	24,02	233,5
36	AZİME ERDURMUŐ	39	50	var	5,8	82	155	43	86,2	27	0,7	30,76	364,2
37	MEVZUL AKKEMİK	67	82	var	11,2	255	255	44	161	34	1	33,71	553,1
38	NURAY GÜNGÖR	33	96	var	11,1	214	130	42	45,8	29	0,8	31,6	460,3
39	ŐÜKRÜ GÜMÜŐTEN	65	75	var	9,8	263	199	35	84	52	1	24,44	608,2
40	PAKİZE DOĞAN	55	71	var	8,8	304	215	38	107	36	1,1	33,71	402,6
41	VESİLE AYVALI	60	80	var	9	227	201	46	125	26	0,8	26,54	988,3
42	NAZİF ŞEN	61	95	var	10,8	234	190	45	129	41	1	21,49	965,8
43	AYŞE ŞEN	54	57	var	5,9	234	177	44	117	24	0,9	20,65	874,9
44	NECATİ TOKMAKTAŐ	69	69	var	7,9	213	184	34	132	58	1,1	15,17	726,6

45	HAŞİM ÖZKURT	54	65	var	8,1	185	138	39	79,2	33	1,2	12,22	172,1
46	PERİHAN KUNDUZ	48	78	var	5,3	91	167	49	95,2	26	0,9	29,49	466,7
47	İBADET VATANSEVER	52	105	var	8,9	98	222	32	161			21,49	648,6
48	NURE ŞENSES	55	80	var	10,3	204	246	41	168	23	0,7	23,17	995,2
49	MUSTAFA AKYÜZ	41	74	var	7,8	121	248	31	174			27,39	1333
50	NURIYE ER	61	60	var	13,8	278	214	33	114	54	1,1	60,67	518,7
51	HASAN DÖĞERCI	59	73	var	7,7	148	190	47	110	47	1,3	18,12	977,9
52	MEDİNE KAYA	24	41	var	6,7	99	73	13	26,4	32	0,8	13,9	813,2
53	YILDIZ DEMİR	30	94	var	7,2	113	188	21	138			15,59	917,2
54	NECLA ERÇOK	67	65	var	9,5	231	280	26	178			50,14	614
55	SUNA POLAT	42	88	var	8,8	149	225	49	149	25	0,8	37,5	847,9
56	ÖMER ÖZSARI	62	64	var	6	87	188	30	137	30	1,2	21,91	224,1
57	MEHMET KAYA	45	97	var	7,8	150	138	47	73,4			22,75	302
58	SAADET AKTAN	63	80	var	6,5	93	244	47	174	51	1,4	16,18	821,9
59	NİMET ÇİÇEK	60	60	var	13,4	325	223	41	142	26	0,7	17,7	778,6
60	RÜŞTÜ ŞEN	68	65	var	9,7	228	212	43	148	34	0,9	20,65	336,7
61	SEMİYE TEPE	45	67	var	5,6	101	170	52	93,4	18	0,7	51,4	406
62	ELVEDA ÖZDEMİR	55	71	var	4,8	84	234	65	132	91	6,2	33,29	310,7
63	BEDİA ÖZKAN	76	70	var	6,1	103	258	47	141	35	0,9	32,86	492,7
64	HAKİME ARGUN	40	100	var	7,3	147	268	58	168	18	0,6	10,95	640
65	HAMDİÇALIŞKAN	75	90	var	7,2	118	177	51	99,6	70	1,9	32,02	622,6
66	AYŞE KAYA	39	62	var	6,3	119	180	32	104			45,5	206,7
67	AYTE ÖZDEMİR	63	71	var	5,8	95	177	61	72,4	40	1,2	28,23	622,6
68	GÜLER KÖSE	40	57	var	5,7	111	192	59	101	103	3,6	21,49	691,9
69	ABDULLAH MEŞECİ	71	74	var	9,6	172	330	54	254	50	1,1	15,17	674,6
70	SENİYE ÖZTÜRK	63	53	var	6,7	137	187	40	96,2	40	0,9	64,04	553,3
71	AYDIN SECEN	55	80	var	6,2	106	166	41	112			11,38	847,9
72	NEŞE YAVUZ	18	53	var	5,6	110	138	52	59,2			21,49	752,6
73	HASİBE GÖZ	52	58	var	7,2	131	355	64	226			32,86	765,9
74	ZEYNEP ÇONKARA	83	69	var	5,8	122	239	69	133			24,86	519
75	GÜLSÜM CİNKILIÇ	56	80	var	7,3	118	198	32	133			31,18	667,4
76	MENDERES KOÇAK	45	80	var	7,7	102	196	40	101	49	1	34,55	796
77	EMRİYE KOTİL	67	68	var	6,9	94	179	53	109	62	0,9	20,22	889,7
78	BELGİN IŞIK	21	60	var	5,9	92	199	46	128			17,7	648,4
79	MÜNÜRE SELÇUK	58	50	var	8,8	96	186	43	119			22,75	255,3
80	İBRAHİM SÖNMEZ	53	53	var	8,9	146	167	45	105	34	1	29,07	505
81	SANIYE GÖNÜLLÜ	65	65	var	7,4	186	164	28	93	67	1,4	17,27	453,8
82	EMİNE LİÇİNA	67	85	var	4,8	126	289	24	245	50	1,1	37,92	584,6
83	HACER CİRİL	44	68	var	9,8	152	278	48	194	24	0,7	37,92	803,1
84	GÜLŞEN AKIN	44	64	var	9,3	198	250	43	163	22	0,8	53,09	518,7
85	ATİFET ÖZTÜRK	44	76	var	8,6	183	188	45	113			15,59	406
86	YILMAZ NOYAN	65	67	var	7	219	129	46	69,6	52	1,2	22,33	371,4
87	SATILMIŞ ORUÇ	60	86	var	8,7	143	186	42	113	44	0,8	13,48	691,9
88	NİMET DEDE	55	78	var	8,7	165	154	33	85,2			18,96	795,1
89	FERİDE ŞİRİN	55	73	var	6,6	141	206	42	108	43	1,3	16,43	322,8
90	AYŞEECE	63	62	var	6	124	247	56	162	26	0,8	37,08	461,5
91	MNSURE ÖZER	54	60	var	9,6	121	239	49	159	25	0,7	22,75	518,7
92	ASLAN KILÇ	68	95	var	6,8	232	170	54	84	31	0,9	29,49	608,2
93	NURIYE TEZER	55	70	var	10,2	220	264	52	172			25,7	569,8

94	YASİN KÖKSAL	28	75	yok	5,4	82	180	55	105	26	0,8	41,29	87,68
95	GÖKSEL SEYMEN	30	80	yok	5,3	86	192	42	129	27	0,9	47,5	159,5
96	ÖNDER ÇİÇEK	25	70	yok	6,1	77	200	30	146	26	0,8	29,07	224,1
97	AHMET DONMAZ	33	71	yok	4,5	100	180	45	108	42	0,9	56,88	206,7
98	İSMAİL GÜLEN	43	86	yok	5,9	112	218	32	158	32	1	54,35	172,1
99	MUSTAFA ERKAN	34	74	yok	5,2	92	176	65	91,4	57	0,9	93,96	102,8
100	SEYİT BULUT	42	76	yok	4,8	74	198	41	135	38	0,9	40,87	138,3
101	ÜMİT DEMİREL	21	67	yok	6,1	99	164	42	96,8	45	0,9	40,87	98,77
102	ADEM YAMAN	20	65	yok	4,8	71	178	45	115	28	0,9	29,91	215,4
103	SAVER NANTAŞ	53	85	yok	6,2	82	195	56	115	30	1,1	72,05	94,09
104	ERHAN ŞENTÜRK	26	72	yok	5	89	186	64	95,2	32	0,7	92,69	215,4
105	CEMİL KAYNAR	25	83	yok	5,4	81	142	48	72,4	24	0,9	64,3	432
106	ŞEREF ŞAHİN	39	64	yok	4,6	86	164	53	71,4	31	0,7	71,63	150,4
107	SERHAT HEKİM	21	72	yok	5,3	82	128	42	65	27	0,7	43,4	68,1
108	FERRUH KILIÇ	48	76	yok	6,3	110	230	37	161	38	0,9	29,07	146,1
109	ALA YOLAZKAN	50	60	yok	6,4	116	224	46	154	24	0,6	33,29	149,5
110	EMİNE ÖNAL	32	68	yok	4,7	95	168	54	76	36	0,6	27,39	224,1
111	TİJEB TAŞKINER	46	61	yok	4,9	77	186	66	82	33	0,6	48,45	336,7
112	NECLA GÖZMEN	41	64	yok	5,3	86	154	65	51,8	37	0,8	45,93	68,1
113	MİMET AKÇİÇEK	26	53	yok	6,5	82	168	52	95,6	22	0,6	49,72	60,99
114	ÖZGE OTA	25	58	yok	4,9	79	124	48	43,6	25	0,8	37,5	203,6
115	SEHER ÇETİN	23	47	yok	4,8	81	146	60	58	34	0,7	18,96	226,4
116	PINAR YILDIZ	23	56	yok	5,6	98	143	42	83,4	26	0,6	34,13	312,9
117	DAMLA ASLANTAŞ	26	52	yok	4,8	103	174	48	104	22	0,8	25,28	497
118	ÖZLEM NUR	43	80	yok	5,2	115	142	44	78,8	26	0,7	34,55	232,2
119	FİLZ NARTOP	56	58	yok	5,6	82	164	52	87,2	24	0,6	41,29	205,2
120	SONGÜL SENEMOĞLU	33	57	yok	6,2	106	143	32	88,6	33	0,7	26,97	175,7
121	AYŞE MENTEŞE	35	65	yok	6,4	116	128	44	64	29	0,7	75,8	68,1
122	SEMRA YILDIZ	19	60	yok	4,8	88	112	46	41,6	25	0,7	21,07	83,69
123	SİBEL SENDAR	25	57	yok	6,3	79	144	40	76,8	23	0,7	23,17	273,4

Tablo 18: Diabetik hastalar ve kontrol grubunun demografik ve biyokimyasal değerleri

## 5.2 KORELASYON ANALİZLERİ

Parametrelerin korelasyonunun tesbitinde Pearson korelasyon analizi kullanıldı. Sonuçlar Tablo 18.'de gösterildi. PON 1 ile HDL arasında zayıf ilişki ( $r=0,36$ ), AOPP ile glukoz, HbA1c ve kolesterol zayıf ilişki tesbit edildi. ( $r= 0,324$ ,  $r= 0,376$ ,  $r=0,27$ ). PON1 ile AOPP arasında da negatif yönde zayıf ilişki bulunduğu tesbit edildi ( $r=-0,218$ )

Parametreler	r değeri	p değeri
PON1-AOPP	-0,218	0,05
PON1-HDL	0,36	0,01
AOPP-GLUKOZ	0.324	0,01
AOPP-HbA1c	0,376	0,01
AOPP-KOLEST.	0,27	0,01

**Tablo 19.**  
**KORELASYON ANALİZİ**

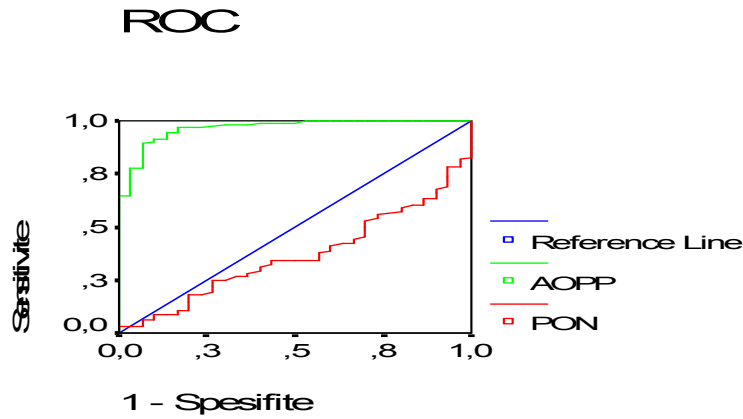
### 5.3. TANISAL YETERLİLİK ANALİZİ

Tez çalışmasındaki hasta gruplarına tanısal yeterlilik analizi uygulayabilmek için iki önemli kriter gerekmektedir.

- Hasta grupları için AOPP ve PON1 belirteçlerinin konsantrasyonlarını arttıracak herhangi bir işlemin uygulanmamış olması,
- Ayrıca hastaların hiçbirinde Diabetes Mellitus dışında oksidatif stresi arttırıcı malign/benign bir hastalığın, klinik ya da laboratuvar bulgularının saptanmamış olması.
- Kontrol grubu ise, patolojik klinik ya da laboratuvar bulgusu olmayan kişilerden oluşma koşulunu sağlamaktaydı.

AOPP ve PON1 değişkenleri hem sağlıklı hem de DM hasta grubunda gözlenebilen değişkenler olmasına rağmen bu değişkenler için hangi değeri bireyleri hasta ya da sağlam diye ayırmada kullanmalıyız? Sorusuna cevap bulabilmek için ROC eğrisinden elde edilen verilere göre hem AOPP hem de PON1 için duyarlılık ve özgüllüğün optimum olduğu eşik değerleri (cut off) belirlendi.

AOPP ve PON1 değerleri için oluşturulan ROC eğrisi gösterildi (Şekil 9).



Şekil 9. AOPP ve PON1 değerleri ile oluşturulan ROC eğrisi

PON1 için eğri altında kalan alan 0.366 olarak hesaplandı (P=0.028). Eğri altında kalan alan 0.500'den küçük olduğundan PON1 değeri için eşik değeri (cut off) saptanmadı.

AOPP için eğri altında kalan alan 0.965 olarak hesaplandı (P=0.000).

AOPP belirteçi birçok durumda yükselbileceğinden DM olan hastaların tanısında kullanılması güçtür.

AOPP belirteci sağlıklı insanlarda oksidatif stres bulunup bulunmadığını değerlendirmek bakımından tarama maksatlı kullanılabilir. Bu sebepten ötürü eşik değeri (cut off) olarak testin duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğu değeri tespit edildi.

Bu maksatla AOPP için çizilen ROC eğrisi sonucunda elde edilen verilere göre özellikle özgüllüğün optimum olduğu muhtemel eşik değeri saptandı. Buna göre duyarlılığı % 96,8, özgüllüğü % 83,3 olan 389  $\mu\text{mol/L}$  eşik değeri (cut off) olarak belirlendi.

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Diabetes Mellitus ve komplikasyonları günümüzde en sık görülen hastalıklardandır ve insidansı giderek artmaktadır.

Diabette reaktif oksijen türlerinin rolü 1980’li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur. Diabet ve diabet komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (35).

Oksidatif stres pek çok hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Antioksidan tedavi de oksidatif stresi azaltmaktadır. Bu yüzden antioksidan tedavi pek çok hastalık için potansiyel tedavi yöntemidir. Oksidatif stresin diabet patogenezi ve komplikasyonlarının oluşumunda oynadığı rol göz önüne alınırsa tedavi için farklı yaklaşımlar geliştirilebilir.

Protein oksidasyon ürünleri de oksidatif stresin önemli göstergelerinden biridir. Hastalığın ilerlemesindeki artış ile protein oksidasyonu arasında kuvvetli bir ilişki olduğu ifade edilmektedir. Pek çok hastalıkta, oksidatif stresin bir sebep mi, yoksa primer hastalık sürecinin bir sonucu mu olduğu açık değildir.

Genel bilgilerde belirtildiği gibi; diabette oksidan/antioksidan oranındaki dengesizliğe bağlı olarak görülen sistemik oksidatif stres PCO düzeylerinde artışa yol açmaktadır. Karbonil stresin artışında; hiperglisemi, hiperlipidemi, oksidatif stres ve/veya reaktif karbonil türevlerinin detoksifikasyonundaki azalmanın etkili olabileceği bildirilmektedir. PCO düzeylerindeki artış hem Tip 1 hem de Tip 2 diabette görülmektedir. Komplikasyonsuz diabetik çocuklar ve adolesanlarda, kontrol grupları karşılaştırıldığında plazma PCO düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum oksidatif protein hasarının diabetin erken dönemlerinde başladığını ve ileriki evrelerde arttığını göstermektedir. (56)

Oksidatif stresin direkt invivo ölçümü oldukça karmaşıktır. Bunun yerine pratik ve ölçümü kolay yöntemler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu da oksidatif modifiye ürünlerin ikincil ürünlerinin tesbitiyle yapılmaya çalışılmaktadır. AOPP oksidatif stres süresince üretilir. Aktive nötrofillerdeki myeloperoksidaz tarafından hipokloröz asit ve kloraminlerin

etkileşimi yoluyla üretimi gerçekleştirir. Ditrozin içeren çapraz bağlı proteinler olarak tanımlanır ve proteinlerin oksidatif modifikasyonun ölçmek için güvenli bir belirteç olarak tanımlanabilir (67).

Daha önce de belirtildiği gibi PON1 enzimi, özellikle aterogenezde major rol oynadığı kabul edilen lipid peroksidlerin oksidasyonunu önlediğinden dolayı antioksidan savunma sistemi içinde yer almaktadır.

PON1 enzimi üzerine yapılan çalışmalar enzimin LDL ve HDL partiküllerinin oksidasyonunu önleyerek ve diğer mekanizmalarla aterosklerotik oluşumu engellediği ya da yavaşlattığını göstermiştir. Bu çalışmalar, ateroskleroz ve diyabet gibi serbest radikallerin patogenezde rol oynadığı hastalıklarda PON1 enziminin önemini ortaya çıkarmıştır (50).

Bizim çalışmamızda serum PON1 enzimi aktivitesinin diyabetli hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı biçimde düşük olduğu tespit edildi ( $p=0,042$ ). Mackness ve arkadaşlarının çalışmasında da bizim çalışmamızı destekler şekilde diyabetik hastalardaki PON1 değeri kontrole göre anlamlı şekilde düşük bulunmuş (66). AOPP değerlerinin ise diyabetlilerde anlamlı biçimde yükseldiği bulundu ( $p=0,000$ ). Piwovar ve arkadaşlarının çalışmasında da AOPP düzeyi diyabetlilerde anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (67). Azalmış PON 1 aktivitesinin; azalmış spesifik aktivite (glikasyon veya dolaşımdaki bir inhibitör nedeniyle) veya serum konsantrasyonun azalması sonucu meydana gelebileceği önceki çalışmalarda belirtilmiştir (68, 69).

PON1 değeri ile glukoz düzeyi ya da HbA1c arasında anlamlı bir korelasyon bulunmamaktadır. PON1 aktivitesinin azalması; enzimin serum konsantrasyonunun azalmasıyla veya daha kuvvetli bir ihtimalle oksidatif stres arttığında dolaşıma salınan oksidasyon ürünlerinden birinin inhibisyonu sonucu gerçekleştiği düşünülebilir.

AOPP düzeyleri ile glukoz, HbA1c ve kolesterol arasında zayıf anlamlı bir ilişki tespit edildi ( $r= 0,324$ ,  $r= 0,376$ ,  $r=0,27$ ). Bu da hiperglisemi ve hiperkolesteroleminin protein oksidasyonunu arttırdığını gösterir. Kalousova ve arkadaşlarının çalışmasında diyabetli hastalardaki AOPP değerleri bizim çalışmamızı destekler biçimde kontrol grubuna göre yüksek bulunurken, kolesterol ile AOPP arasında anlamlı korelasyon tespit edilememiştir (65). Sahng Xi Liu ve arkadaşlarının çalışmasında da AOPP'nin hiperkolesterolemide spontan olarak üretildiği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada tespit edilen ilişki hiperglisemi ve hiperkolesterolemi durumunda AOPP'nin arttığını göstermektedir (70). Her iki durum

oksidatif stresle beraber olduğundan AOPP oksidatif stresin iyi bir belirteci olarak düşünülebilir.

Bu çalışmada ayrıca PON1 aktivitesi ile AOPP düzeyleri arasında negatif yönde zayıf bir ilişki tesbit edilmiştir ( $r=-0.218$ ). İlişkinin zayıf olmasının nedeni muhtemelen bir çok farklı enzim ve proteinin oksidatif streste rol oynamasıdır.

Sonuç olarak; düşük PON1 aktivitesi ile yüksek AOPP düzeylerinin DM'da oksidatif hasarın göstergesi olduğunu ve diabetin komplikasyonları ile beraber olduğunu düşündüren ayrı ayrı çalışmalar yapılmıştır (67,68). Fakat PON1 Ve AOPP'nin birlikte değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmadaki amacımız; DM'da PON1 ve AOPP ilişkisini gözlemektir ve DM'da PON1 ve AOPP arasında anlamlı bir ilişki bulduk.

Bu bilgilerin ışığında, PON1 ve AOPP'nin diabetin erken komplikasyonlarını gösterebileceği düşünülebilir. Bunun için, PON1 ve AOPP'nin birlikte değerlendirildiği, uzun süreli ve vaka sayısı fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. ÖZET

### Diabetes Mellitus'ta PON1 aktivitesi ve AOPP düzeyleri

Paraoksonaz (PON1) apolipoprotein AI içeren HDL alt grupları ile ilişkili kalsiyum bağımlı bir esterazdır. HDL'nin LDL oksidasyonunu önleyebildiği ve okside fosfolipidlerin serum PON1 için fizyolojik bir substrat olduğu son çalışmalarla belirtilmiştir. PON1'in antioksidan etkisi vardır. Dislipidemi, diabetes mellitus ve ileri yaş gibi oksidatif stresin arttığı olaylarda PON1 düzeyi düşük bulunmuştur. Bu çalışmada Diabetes Mellitus'ta PON1 ve AOPP düzeyleri arasındaki ilişkiyi belirlemeyi amaçladık. Çalışma sağlıklı 30 kişi ve DM tanısı almış 93 hastada gerçekleştirilmiştir. Bireylerin PON1 enzim aktivitesi ve AOPP düzeyleri spektrofotometrik yöntemle değerlendirilmiş ve PON1 aktivitesi ile AOPP düzeyleri arasındaki ilişki belirlenerek klinik açıdan önemi olup olmadığı değerlendirilmiştir.

Diabetes Mellitus'lu hastalarda PON1 aktivitesi sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ( $p<0.05$ ). AOPP düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı artmış bulundu ( $p<0.000$ ).

Parametrelerin korelasyonunun tesbitinde Pearson korelasyon analizi kullanıldı. PON1 ile HDL arasında zayıf ilişki ( $r=0,36$ ), AOPP ile glukoz, HbA1c ve kolesterol zayıf ilişki tesbit edildi. ( $r= 0,324$ ,  $r= 0,376$ ,  $r=0,27$ ). PON1 ile AOPP arasında da negatif yönde zayıf ilişki bulunduğu tesbit edildi ( $r=-0,218$ ).

Sonuç olarak Diabetes Mellitus ile PON1 aktivitesi ve AOPP değerleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur. Düşük PON1 aktivitesi DM'de oksidatif hasar artışını göstermektedir. AOPP artışı da hiperglisemi ve hiperlipidemiye bağlı protein oksidasyonundaki artışı göstermektedir.

## 8. SUMMARY

### **PON1 activity and AOPP levels in patients with Diabetes Mellitus**

Paraoxonase (PON1) is a calcium-dependent esterase closely associated with the high-density lipoprotein (HDL) subfraction that contains apolipoprotein AI in human serum. Latest studies shown that HDL can prevent LDL oxidation. PON1 is capable of hydrolysing oxidized lipids and preventing the oxidation of low-density lipoproteins. Low PON1 has been shown in oxidative stress-associated processes such as dyslipidemia, diabetes mellitus, advancing age, and smoking. Therefore, we studied the possible relationship between PON1 activity and AOPP levels in Diabetes Melitus (DM).

Aim of our study is determination of serum activity of PON1 which is antioxidant enzyme in DM and evaluation of its clinical importance. We studied the correlations between PON1 and one of biochemical markers of the oxidation system AOPP. We measured PON1 activity and AOPP levels in spectrophotometer.

PON1 activity is significantly lower ( $p=0,042$ ) and AOPP concentrations is significantly higher ( $p=0,000$ ) in patients with DM.

We found a positive corelation between PON1 and HDL ( $r=0,36$ ). Between AOPP and fasting glucose, HbA1c, cholesterol a positive correlation also was observed ( $r=0,324$ ,  $r=0,376$ ,  $r=0,27$ ). Between AOPP and PON1 a negative correlation was observed.

There were significant differences between the patient group and the control group. Low PON1 activity shows oxidative damage in Diabetes Mellitus. High AOPP levels shows increase in protein oxidation due to hyperglycemia or hyperlipidemia.

## 9. KAYNAKLAR:

1. P.N. Durrington, B. Mackness, M.I. Mackness Paraoxonase and Atherosclerosis Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2001;21:473-480
2. Jay W. Heinecke<sup>1</sup> and Aldons J. Lusis Paraoxonase-Gene Polymorphisms Associated with Coronary Heart Disease: Support for the Oxidative Damage Hypothesis? Am. J. Hum. Genet. 62:20–24, 1998
3. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. FEBS Lett 1991;286:152-4.
4. Schmidt H., Schmidt, R. PON1 polymorphism leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. Stroke 29:2043– 2048; 1998.
5. Serrato M, Marian AJ. A variant of the human paraoxonase/arylesterase (HUMPONA) gene is a risk factor for coronary artery disease. J Clin Invest 1995;96:3005-3008
6. Hermon WH.: Eye disease and nefropaty in NIDDM Diabetes. Diabetes Care 13:24-29,1990.
7. Thomas C. Merlin: Unrecognized Anemia in Patients With Diabetes. Diabetes Care 26: 1164 – 1169,2003.
8. Sodeman WA., TM: Sodeman's Pathologic Physiology mechanisms of disease. Çevirenleri: V. Cesur, N. Kemal, 1. Baskı Hekimler Birliği Vakfı,Türkiye Klinikleri Yayınevi. Ankara,1992 Cild 2.
9. Blom, A. And İreland, J:Diabet Atlası 1982.
10. Watkins PJ., Drury PL., Howell SL.: Diabetes and its a managenant 5th ed. Blackwell Co p:3 1996.
11. Tanyeri F.: Diabetes Mellitusun sınıflandırılması ve Prevelansı. Aktüel Tıp Dergisi, 7: 500 – 503 1996.
12. İnternational diabetes federation Triennial report (1991-1994) and directory 1984-IDF, 4 D Rue Washington 1050 Brussels Belgium.
13. Pickup JC., Williams G.:textbook of diabetes.2n edition, Blackwell science DLD, 1997.volume 1.

14. Warron JH., Rich SS., Krolewski AS.: Epidemiology and genetics of diabetes mellitus in diabetes mellitus Kahn CR Weir GC: Ed phyledelphia Lea Febiger 201-205, 1994.
15. İssel bacher DL., Brownwald E., Wilson JD., Martin JB. et al: Harrison's Principles of Internal Medicine. 13th edition, Mc Graw-Hill inc. Volume 2-1994.
16. Kabalık T., Yılmaz C., Tüzün M.: Endokrinoloji El Kitabı. Ege Üniversitesi. İzmir, 1995.
17. Littorin B., Sundgvist G., Hagopian W., Lernmark A., Ostman J. Islet Cell and Glutamic Acid Decarboxylase Antibodies Present at Diagnosis of Diabetes Predict the Need for Insulin Treatment. Diabetes Care22:409-412, 1999.
18. Fajans SS.: Diabetes Mellitus: Classification and testing procedures, in: DF Groot LJ (ed). Endocrinology WB Saunders Co: P: 1346, 1996.
19. Karam JH., Salber PR., Forsham PH: Pancreatic hormones, and diabetes mellitus in: Greenspen FS (ed). Basic and clicinal endocrinology Lange, p: 616, 1991.
20. Porto D., Hadler JB.: The Endocrine pancreas and diabetes mellitus. İn: Williams RH (ed). Textbook of endocrinology WB Sounders Co 1981, p 716-783.
21. Gündoğdu S., Açıbay Ö.: Tip 2 diabetin evreleri ve takip kriterleri. Aktüel Tıp Dergisi 8: 557-559, 1996.
22. National Diabetes Date Group: Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose inteleronce Diabetes 28: 1039, 1979.
23. Olefsky JM.: Diabetes Mellitus in wyngoardan JB., Smith LH., Bennet JC., Cecil, Textbook of Medicine 19th ed WB. Saunders co. Volume 2p: 1291, 1992
24. Olefsky JM.: Diabetes Mellitus in wyngoardan JB., Smith LH., Bennet JC., Cecil, Textbook of Medicine 19th ed WB. Saunders co. Volume 2p: 1294, 1992.
25. Olefsky JM.: Diabetes Mellitus in wyngoardan JB., Smith LH., Bennet JC., Cecil, Textbook of Medicine 19th ed WB. Saunders co. Volume 2p: 1298, 1992.
26. American Diabetes Association Diagnosis and classification of diabetes mellitus Diabetes Care, Volume 30, Supplement 1, January 2007
27. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia Report of a WHO/IDF Consultation © World Health Organization 2006

28. M Modan, MI Harris and H Haklin Evaluation of WHO and NDDG criteria for impaired glucose tolerance. Results from two national samples Diabetes, Vol 38, Issue 12 1630-1635, Copyright © 1989 by American Diabetes Association
29. The Diabetes and Complication Trial Research Group(1993). The effect of intensive treatment of diabetes. Dermendez G., Nodas J., Sa'pi Z.: Lipoblastoma-Like Lipoatrophyinduced by human insülin: Morphologicalevidence korlocal dedillereution of adipocysts? Diabetologia s: 945,2000.
30. Yenigün M., Diabetik makroanjiopati (diabetik makrovasküler hastalık) Her yönüyle Diabetes Mellitus adlı kitabından Editör: Yenigün M. Nobel Tıp Kitabevi, 2001, İstanbul, s: 315
31. Yenigün M.: Kardiyovasküler Diabet İ.Ü Basımevi ve film merkezi. İstanbul 126-128, 144-148, 1997.
32. Hatemi H.: Diabet komplikasyonları ve risk faktörleri Diabetes Mellitusun (ed. H.Hatemi) Alemdar Ofset Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları 313-343, 1988.
33. American Diabetes Association: Role of cardiovascular risk factor in prevention and treatemant of macrovascular disease in diabetes. Diabetes car. 12: 573-579, 1989.
34. Yenigün : Her yönüyle Diabetes Mellitus, 19 95
35. Altan N., Dinçel A., Koca C., Diabetes Mellitus ve Oksidatif stres Türk Biyokimya Dergisi 2006; 31 (2);51-56
36. Gan N, Smolen A. Purification of human serum PON/ARE. Evidence for one esterase catalyzing both activities. Drug Metab Dispos. 1991;19:100-106
37. Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. J Biol Chem 1946;164:271-89.
38. Aldridge WN. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl pnitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. Biochem J 1953;53:11 7-24.
39. Aldridge WN. Serum esterases. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem J 1953;53:11 0-7

40. Uriel, A. Characterisation des cholinesterases et d'autres esterase carboxylique apres electrophorese en gelose. Am instit Pasteur. 1961;101, 104
41. Mackness M.I., Halam S.D.. The Seperation Of Sheep And Human Serum "A-Esterase Activity Into The Lipoprotein Fraction By Ultracentrifugation. Comp Biochem Physiol B, 1985: 82: 675-677
42. Mackness M.I., Walker C.H. : Multiple Forms Of Sheep Serum A-Esterase Activity Associated With The High-Density Lipoprotein. Biochem J. 1988: 250. 539-545
43. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. FEBS Lett 1991;286:152-4.
44. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised Trial Of Cholesterol Lowering In 4444 Patient With Coronary Heart Disease. Lancet :1994.: 344, 1383-1389
45. Deakin S., James R. W., Genetic and Enviromental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-I Clinical Science (2004) 107, 435-447
46. Başkol G., Köse G. Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi Erciyes Tıp Dergisi 26 (2) 75-80, 2004
47. Harel, M., Aharoni, A., Gaidukov, L. et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. Nat. Struct. Mol. Biol. 2004: 11, 412–419
48. Cao H. Paraoxonase protection of LDL against peroxidation. J Lipid Res. 1999.40;133-139
49. Mackness B. Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorfizms. Febs Letter 1998: 423; 57-60
50. Ekmekçi Ö., Donma O., Ekmekçi H. Paraoksonaz Cerrahpaşa Tıp Dergisi 35(2), 2004.
51. Aviram M., Billecke S., Sorenson R., Bisgaier C., Newton R., Rosenblat M., Erogul J., Hsu C., Dunlop C., 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. Arterioscler Thromb Vasc. Biol. 1998;18:1617-1624
52. Navab M, Hama-Levy S, Van Lenten BJ, et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. J Clin Invest 1997; 99:2005– 2019.

53. Shih DM, Xia Y-R, Wang Y-P, et al. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000; 275:17527–17535
54. Berliner JA, Navab M et al. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995;91:2488–96.
55. Aviram M, Rosenblat M et al. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:892–904.
56. Çakatay U, Kayalı R. The clinical importance of protein oxidation. *Cerrahpaşa J Med* 2004; 35: 140-149.
57. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill patients. *Br Med Bull* 1999; 55: 49-75.
58. Goodyear-Bruch C, Pierce JD. Oxidative stress in critically ill patients. *Am J Crit Care* 2002; 11: 543-51.
59. Del Rio D, Serafini M, Pellegrini N. Selected Methodologies to assess oxidative/antioxidant status in vivo: a critical review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2002; 12: 343-51.
60. Witko-Sarsat V., Friendlander M., Capeillere-Blandin C., et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-1313.
61. Descamps-Latscha B., Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001;59 (Suppl.78): S108-S113..
62. Witko-Sarsat V, Friendlander M, Nguyen-Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-2532.
63. Eckerson, H., Wyte, C. and La Du, B. (1983) The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 35, 1126–1138

64. Witko Tarsat V., Nguyen-Khoa T., Jungers P., Drüeke T. B. Advanced oxidation protein products as a novel molecular basis of oxidative stress in uremia. *Nephrol Dial Transplant* 1999;14 (supp 1) :76-78
65. Kalousova M., Skrha J., Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus, *Physiol. Res.* 51: 597-604, 2002
66. Mackness B., Durrington P.N., Boulton A.J.M., Hine D. Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *Eur Clin Invest* 2002; 32 (4): 259-264
67. Piwowar A., Knapik-Kordecka M., Warwas M. AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus *Diabetes Research and Clinical Practice* 77 (2007) 188–192
68. Valabhji J., McColl A J., Schachter M., Dhanjil S., Hanjil W R., Elkeles R., High-density lipoprotein composition and paraoxonase activity in Type I diabetes *Clinical Science* (2001) 101, 659–670
69. Gürsu M F., Özdin M. Lipoprotein (A) düzeyleri ile PON1 aktivitelerinin komplikasyonlu ve komplikasyonsuz Tip 2 diabetik hastalarda araştırılması *Fırat Tıp dergisi* 2002, Cilt 7, Sayı 2, Sayfa(lar) 720-726
70. Xi Liu S., Hou Fan., Guo Zi., Nagai R., Zhang W., Nagai R. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26: 1156-1162, 2006.