



T. C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HİPOTİROİDİLİ HASTALARDA PARAOKSONAZ1
POLİMORFİZMİ VE BAZI KARDİYOVASKÜLER RİSK
BELİRTEÇLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. AYŞEN CANIKLIOĞLU

KAYSERİ-2012



T. C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**HİPOTİROİDİLİ HASTALARDA PARAOKSONAZI
POLİMORFİZMİ VE BAZI KARDİYOVASKÜLER RİSK
BELİRTEÇLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. AYŞEN CANIKLIOĞLU

Danışman

Doç.Dr.GÜLDEN BAŞKOL

Bu Çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Tarafından

TST-09-993 Kodlu Proje ile Desteklenmiştir.

KAYSERİ-2012

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR	ii
TABLO LİSTESİ.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. HİPOTİROİDİZM.	3
2.2. ATEROSKLEROZ	10
2.3. HOMOSİSTEİN.....	11
2.4. C-REAKTİF PROTEİN.....	13
2.5. NİTRİK OKSİT..	14
2.6. METABOLİK SENDROM.....	15
2.7. PARAOKSONAZ.....	16
2.8. MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
4. BULGULAR.....	42
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR	66
7. KAYNAKLAR	67
8. TEZ ONAY SAYFASI	78

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini bizlerden esirgemeyen başta danışman hocam Doç.Dr.Gülden Başkol'a ve Biyokimya AD.'daki tüm hocalarıma teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının oluşturulması ve tamamlanmasında her zaman yardımcı olan ve yol gösteren danışman hocam Doç.Dr.Gülden Başkol ve Prof. Dr. Fahri Bayram'a, genetik laboratuvarındaki çalışmalarda her türlü imkan ve kolaylığı sağlayan Prof.Dr.Yusuf Özkul'a ve özellikle Hilal Akalın'a ve Serpil Taheri'ye, hasta toplama aşamasındaki yardımlarından dolayı Dr.İlkay Çakır'a, Devlet Hastanesi'nden Dr.Meral Mert ve Dr.Nahide Günay'a, istatistik aşamasında yardımcı olan Ferhan Elmalı'ya, Merkez Laboratuvarı'ndaki testlerin çalışılması aşamasında yardımları olan ve bir buçuk yıl boyunca birlikte çalıştığımız tüm Biyokimya laboratuvarı personeline, kontrol grubumun oluşturulmasında gönüllü olan bütün herkese, komşum Sevgi Aslan'a ve emeği geçen herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Uzmanlık eğitimi boyunca birlikte çalıştığımız değerli arkadaşlarıma teşekkür ediyorum ve hepsine de tez aşamasında kolaylıklar diliyorum.

Ayrıca bu tezin her aşamasında benden desteğini, yardımını ve dualarını hiç esirgemeyen canım anneme, tecrübelerini ve emeğini her zaman benimle paylaşan sevgili eşime sonsuz teşekkür eder, canım çocuklarıma bir ömür boyu sağlıklı hayat dilerim.

KISALTMALAR

AKŞ	: Açlık kan şekeri
Apo A-1	: Apolipoprotein A-1
Apo B-100	: Apolipoprotein B-100
Apo B-48	: Apolipoprotein B-48
bp	: Baz çifti
CBS	: Sistasyonin β sentetaz
CETP	: Kolesterol ester transfer protein
DKB	: Diyastolik kan basıncı
dNTP	: Deoksi-nükleotit trifosfat
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
Hcy	: Homosistein
HDL-K	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol
hsCRP	: Yüksek duyarlılık C-reaktif protein
IDL	: Ara yoğunluklu lipoprotein
iNOS	: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
LCAT	: Lesitin kolesterol açıl transferaz
LDL-K	: Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol
LPL	: Lipoprotein lipaz
NCEP ATP III	: Amerikan ulusal kolesterol eğitim programı üçüncü erişkin tedavi paneli
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
NO	: Nitrik oksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
OD	: Optik dansite
OP	: Organofosfat
PAF-AH	: Platelet aktive edici faktör asetil hidrolaz
PNP	: Paranitrofenol
PON1	: Paraoksonaz1
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP	: Sınırlayıcı enzim parça uzunluk polimorfizmi
SAH	: S-adenozil-L-homosistein
SKB	: Sistolik kan basıncı
sT ₄	: Serbest tiroksin
T ₃	: Triiyodotironin
TG	: Tiroglobulin
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TNP _s	: Tek nükleotit polimorfizmleri
TPO	: Tiroid peroksidaz
TRH	: Tirotropin salgılatıcı hormon
TSH	: Tiroid stimüle edici hormon
VKİ	: Vücut kütle indeksi
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: Hipotiroidizm Nedenleri	4
Tablo 2: Hipotiroidizmle İlişkili Kardiyovasküler Riskler	5
Tablo 3: Aterosklerozun Belirlenmiş Risk Faktörleri	11
Tablo 4: Total Hcy Düzeylerini Etkileyen Faktörler.	13
Tablo 5: NO'nun Biyolojik Etkileri	15
Tablo 6: NCEP ATP III Metabolik Sendrom Tanı Kriterleri.....	16
Tablo 7: PON1'in Substratları.....	20
Tablo 8: HDL'deki Enzimatik Aktiviteye Sahip Olan Proteinler	23
Tablo 9: PON1'in Antiaterojenik Etkilerinin Kanıtları	24
Tablo 10: PON1 Aktivitesi Çalışma Prosedürü	33
Tablo 11: NO Çalışma Prosedürü	35
Tablo 12: Kullanılan Primerler	38
Tablo 13: 50 µL Hacim İçerisinde Gerçekleştirilen PZR Reaksiyonunda Kullanılan Maddeler ve Son Konsantrasyonları	38
Tablo 14: PZR Programı	39
Tablo 15: Hipotiroidili Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik Verileri ve AKŞ, TSH ve Anti-TPO Değerleri	43
Tablo 16: Hipotiroidili Hasta ve Kontrol Gruplarının Lipid, CRP, Hcy, NO Düzeyleri ile PON1 Aktivitelerinin Karşılaştırılması.....	43
Tablo 17: Hasta ve Kontrol Gruplarında PON1 Q/R 192 ve L/M 55 Genotip Dağılımı ve Q/R ve L/M Allel Sıklığı	47

Tablo 18:	Hasta Grubunda PON1 Aktivitesi, Hcy, NO, CRP Düzeyleri, Cinsiyet ve Lipid Profillerinin PON1 Q/R 192 Genotiplerine Göre Dağılımı	48
Tablo 19:	Kontrol Grubunda PON1Aktivitesi, Hcy, NO, CRP Düzeyleri, Cinsiyet ve Lipid Profillerinin PON1 Q/R 192 Genotiplerine Göre Dağılımı..	49
Tablo 20:	Hasta ve Kontrol Grubunda PON1 Aktivitesi İle PON1192 Q/R Polimorfizmleri Arasındaki İlişki	49
Tablo 21:	Hasta Grubunda PON1Aktivitesi, Hcy, NO, CRP Düzeyleri,Cinsiyet ve Lipid Profillerinin PON1 L/M 55 Genotiplerine Göre Dağılımı	50
Tablo 22:	Kontrol Grubunda PON1Aktivitesi, Hcy, NO, CRP Düzeyleri, Cinsiyet ve Lipid Profillerinin PON1 L/M 55 Genotiplerine Göre Dağılımı	51
Tablo 23:	Hasta ve Kontrol Grubunda PON1 Aktivitesi ile PON1 55 LM Polimorfizmleri Arasındaki İlişki	51
Tablo 24:	Hasta Grubunda Tansiyon ve Diyabet'e Göre PON1 Q/R 192 Genotip Dağılımı	52
Tablo 25:	Hasta Grubunda Tansiyon ve Diyabet'e Göre PON1 55 L/M Genotiplerinin Dağılımı	53
Tablo 26:	Hasta Grubunda Diyabeti Olan ve Olmayanlarda CRP, Hcy ve NO Düzeylerinin Karşılaştırılması	53
Tablo 27:	Hipotiroidi Etyolojisine Göre PON1 L/M 55 ve Q/R 192 Genotiplerinin Dağılımı	54
Tablo 28:	Metabolik Sendromu Olan ve Olmayan Hasta Grubu ile Metabolik Sendromu Olmayan Kontrol Grubunda PON1 L/M 55 ve Q/R 192 Genotip Dağılımları	54
Tablo 29:	Hipotiroidi Etyolojisine Göre Hasta Grubu ile Kontrol Grubunda PON1 Aktivitesi, Hcy, NO ve CRP Düzeylerinin Karşılaştırılması.....	55

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: NOS Tarafından NO Sentezi.....	14
Şekil 2: PON Gen Ailesi ve PON1, PON2 ve PON3 Genlerinin İnsan 7. Kromozomu q21 ve q22. Bantları Üzerindeki Yerleri	18
Şekil 3: PON1'in Üç Boyutlu Yapısı	19
Şekil 4: PON1'in Substratları ve Enzimatik Aktiviteleri	21
Şekil 5: PON1 Geninin Yapısı.....	25
Şekil 6: NO Standart Grafiği	35
Şekil 7: Hcy Standart Grafiği	37
Şekil 8: PON1 Q/R 192 Polimorfik Bölgesine Spesifik Primerler Kullanılarak Elde Edilen PZR Ürününün, Etidyum Bromide ile Boyanmış %2'lik Agaroz Jelin Ultraviyole Transilluminatördeki Görüntüsü	44
Şekil 9: PON1 Q/R 192 Polimorfik Bölgesine Spesifik Primerler Kullanılarak Elde Edilen PZR Ürününün AlwI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi Sonrası Etidyum Bromide ile Boyanmış %4'lük Agaroz Jelin Ultraviyole Transilluminatördeki Görüntüsü	45
Şekil 10: PON1 L/M 55 Polimorfik Bölgesine Spesifik Primerler Kullanılarak Elde Edilen PZR Ürününün Etidyum Bromide ile Boyanmış %2'lik Agaroz Jelin Ultraviyole Transilluminatördeki Görüntüsü	45
Şekil 11: PON1 L/M 55 Polimorfik Bölgesine Spesifik Primerler Kullanılarak Elde Edilen PZR Ürününün NlaIII Restriksiyon Enzimi ile Kesimi Sonrası Etidyum Bromide ile Boyanmış %4'lük Agaroz Jelin Ultraviyole Transilluminatördeki Görüntüsü	46

HİPOTİROİDİLİ HASTALARDA PARAOKSONAZ1 POLİMORFİZMİ VE BAZI KARDİYOVASKÜLER RİSK BELİRTEÇLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Hipotiroidizmde ateroskleroz riski artmıştır, fakat aterosklerozun patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Paraoksonaz1 (PON1), antioksidan ve antiaterojenik etkileri olan bir enzimdir. Bu çalışma, hipotiroidili hastalarda ve sağlıklı bireylerde PON1 Q/R 192 ve L/M 55 gen polimorfizmlerinin dağılımlarını tespit etmek ve bu polimorfizmlerin PON1 aktivitesi üzerine etkilerini araştırmak, ayrıca homosistein (Hcy), nitrik oksit (NO), C-reaktif protein (CRP) düzeylerini ve bunların da PON1 polimorfizmleri ile ilişkisini araştırmak amacıyla planlandı.

Gereç ve Yöntem: Primer hipotiroidi tanısı almış 75 hasta ve 45 sağlıklı gönüllü kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. PON1 192 Q/R ve 55 L/M gen polimorfizmleri ile PON1 aktivitesi, Hcy, NO ve CRP düzeyleri ölçüldü. Hasta grubu etyolojiye ve metabolik sendrom varlığına göre alt gruplara ayrılarak da incelendi.

Bulgular: Hasta grubunda, kontrollerle karşılaştırıldığında PON1 aktivitesi düşük, NO, Hcy, CRP düzeyleri yüksek bulundu. PON1 192 Q/R ve 55 L/M genotip dağılımları ve allel sıklıkları bakımından hasta ve kontrol grubu arasında fark görülmedi. Her iki grupta en yüksek paraoksonaz aktivitesi LL ve RR genotiplerinde, orta düzeyde aktivite LM ve QR genotiplerinde, en düşük aktivite QQ ve MM genotiplerinde görülmekle birlikte kontrol grubunda 55 L/M genotipleri ile aktivite arasında fark bulunmadı. Bu polimorfizmlerin Hcy, NO ve CRP düzeyleri üzerine etkisinin olmadığı görüldü. Etiyolojiye ve metabolik sendrom varlığına göre de polimorfizmlerin dağılımı ve allel sıklıkları bakımından fark bulunmadı.

Sonuç: PON1 Q/R 192 ve L/M 55 polimorfizmlerinin paraoksonaz aktivitesinde önemli değişikliklere neden olduğu, fakat hipotiroidili hastalardaki PON1 aktivitesinin bu polimorfizmlerden bağımsız olarak düşük olduğu ve bu hastalardaki artmış ateroskleroz için genetik bir risk oluşturmadığı, ayrıca PON1 aktivitesindeki düşüklüğe Hcy yüksekliğinin sebep olabileceği ve ikisinin birlikte bu hastalardaki ateroskleroza yakınlıkta rolü olabileceği, artmış NO düzeylerinin de bu hastalarda oksidatif hasarı artıran bir etken olduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Hipotiroidi, Homosistein, Nitrik oksit, Paraoksonaz1, Polimorfizm

EVALUATION OF PARAOXONASE1 POLYMORPHISM AND SOME OF CARDIOVASCULAR INDICATORS IN HYPOTHYROID PATIENTS

ABSTRACT

Aim: It is known that although atherosclerosis risk has increased in hypothyroidism, pathogenesis of atherosclerosis in hypothyroidism has not been investigated in detail yet. Paraoxonase1 (PON1) is an enzyme that has known to be antioxidant and antiatherogenic effects. This study was planned to determine distributions of PON1 L/M 55 and Q/R 192 gene polymorphisms in hypothyroid patients and healthy individuals and to investigate the effects of these polymorphisms on PON1 activity and also to measure Homocystein (Hcy), Nitric oxide (NO), C-reactive protein (CRP) levels and their relation with PON1 polymorphisms.

Materials and methods: 75 primary hypothyroid patients and 45 healthy volunteers were added to the study. PON1 192 Q/R ve 55 L/M gene polymorphisms, PON1 activity, levels of Hcy, NO and CRP were measured. The patient group was divided into different subgroups according to their etiology and in addition whether metabolic syndrome is present or not.

Results: In the present study, PON1 activity was decreased, NO, Hcy and CRP levels were significantly increased in patients compared to the control group. There was no significant difference observed in PON1 192 Q/R and 55 L/M genotype distributions and allele frequencies between patients and control group. The highest paraoxonase activities were seen in LL and RR genotypes, moderate activities were seen in LM and QR genotypes and the lowest ones in QQ and MM genotypes. There was no significant difference observed between 55 L/M genotypes and PON1 activities in the control group. It was seen that these polymorphisms has no effect on Hcy, NO and CRP levels. There was no difference observed between polymorphism distribution and allele frequencies in respect to etiology and existence of metabolic syndrome.

Conclusion: PON1 Q/R 192 and L/M 55 polymorphisms cause important changes in paraoxonase activity. However, PON1 activity was lower in hypothyroid patients independently from these polymorphisms and does not create any genetic risk for the increased atherosclerosis in these patients. Decreased PON1 activity may be related to Hcy elevation and those two together may have a role in atherosclerosis tendency in these patients and elevated NO levels may be increased oxidative damage in these patients.

Key Words: Hypothyroidism, Homocysteine, Nitric oxide, Paraoxonase1, Polymorphism,

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipotiroidizm, tiroid hormon eksikliğine bağlı bir çok sistemi etkileyen klinik bir sendromdur. Tiroid hormon eksikliği genel olarak oksijen tüketiminde azalmaya ve organlara spesifik eksikliklere neden olur (1). Hipotiroidizm yaygın bir hastalıktır, çalışma gruplarına ve toplumlara bağlı olarak farklı insidanslar bildirilmiştir (2).

Hipotiroidizm, aterosklerozla sonuçlanan kardiyovasküler durumlar için artmış bir risk taşımaktadır. Hipotiroidiye bağlı aterosklerozun patogenezi karışıktır ve henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bunun için hiperkolesterolemi, hipertansiyon ve bozulmuş endotel fonksiyonu gibi durumlar öne sürülmüştür. Hiperhomosisteinemi ve artmış yüksek duyarlıklı C-reaktif protein (hsCRP) düzeyleri de hipotiroide ateroskleroz için karşımıza çıkan risk faktörleri arasındadır (3).

Tüm dünyada önde gelen mortalite ve morbidite sebeplerinden olan kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde ateroskleroz önemli rol oynamaktadır. Plazmada yüksek oranda kolesterol, özellikle de düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-K) ve trigliseridin yüksek düzeyde bulunmasının yanı sıra, yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL-K) seviyesinin düşük olması, sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet, erkek cinsiyet, egzersiz eksikliği, obezite ve stres, aterosklerotik kardiyovasküler hastalık için önemli risk faktörleridir (4).

Paraoksonaz1 (PON1), HDL-K yapısında bulunan, antioksidan ve antiaterojenik etkileri olan bir enzimdir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda hipotiroidili hastalarda ve deneysel olarak oluşturulmuş rat modellerinde, PON1 aktivitesinin düşük olduğu gösterilmiştir (5-7) .

PON1, koding bölgesinde yaygın iki polimorfizme sahiptir. Ellibeşinci pozisyondaki polimorfizm, lösin (L) yerine metionin (M) (PON1 55 L/M) geçmesi ile oluşmaktadır. 192. pozisyondaki polimorfizm ise glutamin (Q) yerine arjinin (R) geçmesi ile oluşur (PON1 192 Q/R). PON1 gen polimorfizmlerinin, aterosklerozun gelişmesinde risk faktörü olabileceği ileri sürülmüştür (8).

Bu çalışmanın amacı; hipotiroidili hastalarda ve sağlıklı bireylerde PON1 L/M 55 ve Q/R 192 gen polimorfizmlerinin dağılımını tespit etmek ve bu polimorfizmlerin PON1 aktivitesi üzerine etkilerini araştırmaktır. Ek olarak, homosistein (Hcy), nitrik oksit (NO), CRP düzeylerini hipotiroidili hastalarda ve sağlıklı bireylerde değerlendirip, bu parametrelerin PON1 polimorfizmi ile ilişkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HİPOTİROİDİZM

Hipotiroidizm, tiroid hormon eksikliğine bağlı bir çok sistemi etkileyen klinik bir sendromdur. Bebeklerde ve çocuklarda hipotiroidizm büyüme ve gelişmede gecikmeye yol açar; kalıcı motor ve zihinsel geriliğe neden olabilir. Yetişkinlerde ise metabolik işlevlerin yavaşlamasına neden olur ve genellikle tiroid hormon replasman tedavisi tedavi ile düzeltilebilir (1).

2.1.1. Epidemiyoloji

Hipotiroidizmin prevalansı genel popülasyonda özellikle de kadınlarda yüksektir. Colorado çalışmasında 25.682 sağlıklı bireyde %9.5 oranında primer hipotiroidizm (tiroid stimüle edici hormon (TSH) >5.1 mU/l) saptanmıştır. İngiltere’de yapılmış olan Whickham çalışmasında, subklinik hipotiroidizm prevalansı kadınlarda %7.5, erkeklerde %2.8 olarak bulunmuştur. Bu 20 yıllık çalışma, primer hipotiroidizmin prevalansının yaş ve antitiroid antikorların pozitifliği ile arttığını göstermiştir.

Amerika Birleşik Devletleri’nde yapılan üçüncü ulusal sağlık ve beslenme inceleme araştırmasında ise %4.6 bireyde yüksek TSH (>4.5 mU/L) değerleri saptanmıştır. Bu oranın %0.3’ü klinik hipotiroidi, %4.3’ü ise subklinik hipotiroidi olgularından oluşmaktadır (9).

2.1.2. Hipotiroidizm Nedenleri

Hipotiroidizm genellikle primerdir (tiroid bezinin bozukluğu), fakat ikincil (hipotalamik veya hipofiz yetersizliği) veya nadiren tiroid hormon reseptörlerindeki dirençten kaynaklanabilir. Hipotiroidizm nedenleri **Tablo 1**’de gösterilmektedir.

Tablo 1. Hipotiroidizm Nedenleri (1)

Primer Hipotiroidizm	Sekonder Hipotiroidizm
<i>Otoimmün</i> Hashimoto tiroiditi Poliglandüler yetersizlik sendromunun bir kısmı, Tip II	<i>Hipotalamik fonksiyon bozukluğu</i> Neoplazm Tüberküloz Sarkoidoz
<i>İyatrojenik</i> ¹³¹ I tedavisi Tiroidektomi	Langerhans hücresi histiyositozu Hemokromatozis Radyasyon tedavisi
<i>İlacı bağı</i> İyot eksikliği İyot fazlalığı Lityum Amiodarone Antitiroid ilaçlar	<i>Hipofiz fonksiyon bozukluğu</i> Neoplazm Hipofiz ameliyatı Postpartum hipofiz nekrozu İdiyopatik hipopituitarizm Glukokortikoid fazlalığı (Cushing Sendromu)
<i>İdiyopatik</i>	Radyasyon tedavisi
<i>Doğumsal</i> Tiroid agenezi Tiroid disgenezi Hipoplastik tiroid Biyosentetik yetersizlik	

Yetişkinlerde otoimmün tiroidit (Hashimoto tiroiditi), hipotiroidizmin en yaygın nedenidir. Bu yalın ya da poliglandüler yetersizlik sendromu tip II'nin (Schmidt sendromu) bir parçası olabilir. Hipotiroidizmin iyatrojenik nedenleri arasında ¹³¹I terapisi, tiroidektomi ve lityum veya amiodarone ile tedavi bulunmaktadır. İyot yetersizliği veya fazlası da hipotiroidizme neden olabilir (1). İdiyopatik hipotiroidizm, uygun klinik ve laboratuvar değerlendirmelerine rağmen, spesifik bir etiyolojik faktörün ortaya çıkarılmadığı durumdur (10).

2.1.3. Tiroid Hormon Eksikliğinin Sistemik Etkileri

Tiroid hormon eksikliğinin klinik spektrumu, anormal fizik muayene bulguları olmayan asemptomatik bireylerden, tanısı fizik muayene ile kolayca konulabilen klasik miksödemli hastalara kadar oldukça değişkenlik gösterir.

Tiroid hormon eksikliği, genel olarak oksijen tüketiminde azalmaya ve organlara spesifik eksikliklere neden olur. Yaygın semptomları arasında letarji ve azalmış fiziksel yeti bulunmaktadır (10).

2.1.3.1. Deri ve cilt ekleri

Miksödemde epidermis hiperkeratozisli atrofiye hücresel bir tabaka görülür. Dermis mukopolisakkaritler, hiyalüronik asit ve kondroidin sülfatla infiltre olmuştur, artmış sıvı retansiyonu ve gode bırakmayan ödemle sonuçlanır. Asiner bez sekresyonu azalmıştır. Fizik muayenede, yüzey sıcaklığında azalma ve derideki vazokonstriksiyondan kaynaklanan solukluk görülür. Saç ve tırnaklar kırılmalıdır. Saç kaybı yaygındır, fakat tedaviyle genellikle geri dönüşümlüdür (10).

2.1.3.2. Gastrointestinal Sistem

Hipotiroidizmdeki kilo artışı metabolik hızın azalmasından kaynaklanır. Belirgin bir obezite görülmez. Tat alma duyusu azalmıştır. Gastrik atrofi ve azalmış gastrik asit üretimi yaygındır. Konstipasyon yaygındır. Hastaların üçte birinde antiparyetal hücre antikolları bulunur ve %10'unda pernisiyöz anemi bildirilmiştir (10).

2.1.3.3. Kardiyovasküler Sistem

Hipotiroidizm birkaç yönden kardiyovasküler sistemi etkileyebilir. Yaygın olarak görülen semptom ve bulgular arasında bradikardi, hafif diastolik hipertansiyon, azalmış nabız basıncı, soğuk intoleransı ve yorgunluk bulunur. Artmış sistemik vasküler rezistans, azalmış kardiyak kontraktilite, azalmış kardiyak output, hızlanmış ateroskleroz ve koroner arter hastalığı ile ilişkilidir. Bu bulgular hiperkolesterolemi ve diastolik hipertansiyon sonucu da olabilir. Hipotiroidili hastalar başka aterosklerotik kardiyovasküler risk faktörlerine de sahiptir (Tablo 2) (11).

Kan basıncı değişiklikleri, lipid metabolizmasındaki bozukluklar, azalmış kardiyak kontraktilite ve artmış sistemik vasküler rezistans gibi durumlar tiroid hormon replasmanı ile genellikle düzelir. Ayrıca proteinden zengin perikardiyal ya da plevral efüzyon görülebilir (11).

Tablo 2. Hipotiroidizmle ilişkili Kardiyovasküler Riskler

Bozulmuş kardiyak kontraktilite ve diastolik fonksiyon
Artmış sistemik vasküler rezistans Azalmış endotel kaynaklı relaksasyon faktör
Artmış serum LDL-K, azalmış HDL-K
Artmış CRP
Artmış Hcy

2.1.3.4. Solunum Sistemi

Primer solunum sistemi hastalığı yoksa, hipotiroidili hastadalardaki respiratuar fonksiyonun azalması anlamlı değildir (10). Maksimal solunum ve difüzyon kapasitesi azalmıştır. Şiddetli hipotiroidide, miyopati, solunum adelelerinin miksödemli infiltrasyonu ve solunum merkezinin depresyonu alveolar hipoventilasyona ve CO₂ retansiyonuna yol açar (12).

2.1.3.5. Hematopoetik Sistem

Miksödemli hastalarda yaygın olarak, azalmış eritrosit sayısı ile birlikte normokrom, normositik anemi vardır. Folik asit ve B12 vitamini eksikliği nedeniyle makrositoz görülebilir. Hipotiroidili hastaların %10'unda pernisiyöz anemi görülür. Genelde hipotiroidili hastalarda anormal kanama bildirilmemiştir. Fakat pıhtılaşma faktörleri VIII ve IX'daki bozukluk, artmış kapiller frajilite ya da anormal platelet fonksiyonu sebebiyle kanamaya yatkınlık olabilir (10).

2.1.3.6. Kas İskelet Sistemi

Miyalji, kas güçsüzlüğü, kas sertliği, kramplar ve çabuk yorulma hipotiroidili hastalarda çok belirgindir. Tiroid hormonu iskeletin normal gelişmesi ve olgunlaşması için gereklidir. Erişkinde artralji, eklem sertliği, eklem efüzyonu ve karpal tünel sendromu olabilir (13).

2.1.3.7. Sinir Sistemi

Santral sinir sisteminin gelişimi için enerji metabolizmasını etkileyen tiroid hormonları gereklidir. Fetal hayatta veya neonatal dönemde eksikliği, beyin gelişiminin duraklamasına yol açar. Kortikal nöronlarda hipoplazi, miyelinizasyonda gecikme ve damarlanmada azalma ile karakterli değişiklikler gelişir. Erişkin yaşta başlayan hipotiroidide santral sinir sistemindeki belirtiler daha siliktir ve tiroid hormonu ile tedaviye cevap verir. Entellektüel fonksiyonlarda genel yavaşlama karakteristiktir. Düşünme hızı da yavaşlamıştır. Genellikle hafıza defekti vardır. Yaşlılarda demans gelişir. Senil demans ile karışır. Hipotiroidide serebral kan akımında % 23, serebral glukoz metabolizmasında %12'lik azalma mevcuttur (14).

2.1.3.8. Renal Fonksiyon

Kardiyak outputun azalması renal kan akımını azalmasına neden olur, ancak klinik etkileri nadirdir. Şiddetli hipotiroidizmde azalmış serbest su klirensi olabilir ve uygunsuz antidiüretik hormon salınımı sendromuna benzer hiponatremiye sebep olur. Ancak antidiüretik hormon düzenlenmesinde herhangi bir anormallik bildirilmemiştir (10).

2.1.3.9. Üreme Sistemi

Doğurganlık çağındaki kadınlarda fazla menstrual kanama yaygındır. Fertilite azalmıştır ve erken abortus insidansında bir artış vardır. Her iki cinsiyette de libido azalmıştır. Hipotiroidizm, seks hormonlarının metabolizmasını ve seks hormon bağlayan proteinlerin konsantrasyonlarını etkiler. Serum prolaktin düzeyleri hipotiroidili kadınlarda yükselebilir fakat tedaviyle düzelir (13).

2.1.3.10. Metabolizma

Tiroid hormon eksikliği metabolizmayı yavaşlatır ve istirahatte enerji harcama ve oksijen tüketiminde azalma ortaya çıkar. Termogenezdeki azalma, hastalarda görülen soğuk intoleransının nedenidir. Protein sentez ve yıkımı azalmıştır. Ancak hipotiroidili hastalar pozitif nitrojen dengesi içindedirler. Kapillerlerin protein geçirgenliği artmıştır. Efüzyonlarda protein artar. Glukoz bağırsaklardan yavaş emilir. Glukozun dolaşımdan uzaklaştırma hızı da yavaştır. Bu da ekzojen insülin ihtiyacında azalmaya neden olur (13). Lipidlerin sentez ve yıkım hızı yavaşlamıştır. Lipid klirensi azalmıştır. Bunun sonucu serum serbest yağ asitleri, total ve LDL-K artar. Hipotiroidili vakalarda %56 hiperkolesterolemi, %34 hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemi, %4.5 hipertrigliseridemi, sadece %8.5 vakada normal lipid profiline rastlanmıştır (15).

2.1.4. Klinik Bulgular

Hipotiroidi bulgu ve belirtileri, tiroid hormon eksikliğinin gelişme hızına ve şiddetine ve ortaya çıktığı yaşa göre değişir. Genellikle tiroid hormon eksikliği yavaş geliştiğinden hipotiroidi sinsi ve yavaş bir başlangıç gösterir. İlk değişiklikler pek belirgin değildir. Yorgunluk, soğuk intoleransı, kabızlık gibi nonspesifiktir ve iyi tolere edilir. Bu semptomların farkına varılmadığı zaman, hipotiroidi ilerler ve değişik organ ve sistemlerde eksiklik veya etkisizlik derecesine göre, değişik bulgu ve belirtilerle seyreder.

Klinik hipotiroidide sık görülen bulgular soğuk intoleransı, kilo alımı, konstipasyon, ciltte kuruma, bradikardi ve mental işlevlerde yavaşlama şeklinde sıralanabilir. Bu tipik bulguların yanı sıra hastalar hipotermi, konjestif kalp yetmezliği, plevral efüzyon, ileus, intestinal psödoobstrüksiyon, koagülopati, depresyon, psikoz, ataksi, nöbet, koma gibi bulgular ile de karşımıza çıkabilmektedir (16).

2.1.5. Laboratuvar Bulguları

Tipik semptom ve bulguları olan hastalarda hipotiroidi tanısı genellikle serbest tiroksin (sT₄) ölçümüyle teyit edilir. Hipotiroidizmde serum sT₄ düzeyleri düşüktür.

Serum total T_4 düzeyleri, sT_4 düzeyleri ile genellikle koreledir. Ancak plazma tiroid hormon bağlayıcı proteinlerin düzeyindeki değişiklikler, hipotiroidi yokken serum total T_4 değerlerinde azalmaya, hipotiroidi varlığında ise normal total T_4 değerlerine neden olur (10).

Tiroid hormonlarının biyolojik olarak en aktif formu triiyodotironin (T_3) olmasına rağmen, düşük serum T_3 konsantrasyonu hipotiroidi tanısında yeterli değildir. Serum T_3 düzeyi de serumdaki iyodotironin bağlayan proteinlerin değişikliklerinden etkilenebilir (10).

Primer hipotiroidizmde azalmış iyodotironin üretimi serumda TSH'nın artmasına neden olur. TSH >4 mIU/L ve T_3 , T_4 normal yada normalin alt sınırında ise subklinik, TSH >10 mIU/L ve T_4 ve/veya T_3 düşük ise klinik hipotiroidi tanısı konur (17).

Hipotalamik ya da hipofiz kaynaklı hipotiroidisi olan hastalarda, serum TSH düzeyi azalmış ya da normal sınırlardadır. Sekonder hipotiroidizmli bazı hastalarda, biyolojik olarak inaktif TSH'nın varlığı yüzünden normal serum TSH düzeyleri saptanır (10).

Tirotropin salgılatıcı hormon (TRH)'un, hipotiroidi tanısı için ya da hipotiroidi sebebini belirlemek için kullanılması tavsiye edilmez. Hipotalamik ya da hipofizer hastalıklarda TRH'ya TSH cevabı azalmıştır ya da normaldir. Ancak TRH'ya TSH cevabı, hipofiz ya da hipotalamustaki lezyonların belirlenmesinde yeterince spesifik değildir. Primer hipotiroidili hastalarda ise bu cevap her zaman artmıştır (10).

Tiroid peroksidaz (TPO) ve tiroglobuline (TG) karşı oluşmuş antikorlar otoimmün tiroid hastalıklarının tanısında kullanılmaktadır (18).

2.1.6. Tedavi

Hipotiroidizm sentetik L-tiroksin ile tedavi edilmelidir. T_3 daha biyoaktif tiroid hormonu olduğu halde, periferik dokular fizyolojik düzeyleri aynı değerde tutabilmek için T_4 'leri T_3 'e çevirirler. Böylece, L-tiroksin verilmesi T_3 ve T_4 'ün biyolojik olarak mevcut olmasına yol açar. T_3 , kandan çabuk emilmesi ve kaybolması ve düzensiz kan düzeylerine neden olduğu için kullanımından kaçınılmalıdır. L-tiroksin, 8 günlük yarı ömre sahiptir, bu nedenle günde bir kez verilmelidir. Yetişkinlerde, ortalama yerine koyma dozu günde 100-150 μg 'dır. Sağlıklı yetişkinlerde, günde 100 μg başlama dozu için uygundur. L-tiroksin tedavisine cevap, serum TSH düzeyleri ile klinik olarak gözlenmelidir (1).

2.1.7. Lipoproteinlerin Metabolizması

Kolesterol, trigliseridler ve fosfolipidler gibi önemli plazma lipidleri, suda çözünebilir lipoproteinler tarafından taşınır. Bunlar dış katmanında protein ve fosfolipidleri ve santral çekirdek kısmında nötral lipidleri içeren, kompleks partiküllerdir. Bu yapıya sahip çeşitli apolipoproteinler bulunmaktadır. Apolipoproteinler trigliseridlerin, endojen ve eksojen kolesterolün taşınmasında aracı rol oynarlar. Eksojen ve endojen lipoproteinler apolipoprotein B-48 (apo B-48) ve apolipoprotein B-100 (apo B-100) bulundurmalarına göre tanımlanabilir.

Trigliseritten zengin lipoproteinler, barsaktan şilomikronlarla ya da çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL)'lerle plazmaya girer. VLDL karaciğerde glukoz ya da serbest yağ asitlerinden sentezlenen endojen trigliseridlerden zengindir.

Yiyeceklerle alınan ve safraya sekrete edilen lipidler bağırsakta emilir, şilomikronlara çevrilir ve dolaşımdaki en büyük lipoproteinleri oluştururlar. Temel olarak trigliseridlerden oluşur ve ana protein bileşenleri apo B-48 ve apolipoprotein E'dir (9).

Şilomikronlar lenfatik sistem yoluyla dolaşıma katılırlar ve trigliseridler lipoprotein lipaz (LPL) tarafından hidrolize edilir, bu enzim adipoz ve kas dokusunun kapiller endotelinin lümenal yüzeyinde bulunur. Bu enzimin etkisi, HDL yüzeyinde bulunan bir LPL kofaktörü olan apolipoprotein C-II'nin transferine bağlıdır. Bu lipoprotein merkezinin hacmini azaltır ve fosfolipidler, anesterifiye kolesterol ve apolipoproteinler gibi fazla yüzey bileşenlerinin salıverilmesiyle ve onların özellikle HDL gibi diğer lipoproteine transferi ile sonuçlanır. Lipoliz sonrası kalan şilomikron partikülleri remnantlar olarak adlandırılırlar ve karaciğer tarafından reseptör aracılı endositozla hızlıca alınırlar (19).

VLDL, hepatositler tarafından sentezlenir ve kan dolaşımına salınır. VLDL partikülleri trigliseritten zengindir, temel olarak apo B-100 ve apolipoprotein E içerir. Plazma yarı ömrü kısadır, karaciğerde LDL'ye dönüştürülür. Kolesterol temel olarak kolesterol esterleri şeklinde taşınır. VLDL'deki trigliseridler de LPL tarafından hidroliz edilirler. Şilomikronlar ve VLDL, LPL tarafından yıkılınca ara yoğunluklu lipoprotein (IDL) ortaya çıkar ve fosfolipidler ve kolesterol HDL'ye transfer olur. Böylelikle dokulardan karaciğere kolesterol transportu gerçekleşir. IDL, hepatik endositoz ve hepatik lipaz ve kolesterol ester transfer protein (CETP)'in etkisiyle plazmadan temizlenir (9).

Karaciğer ve ince bağırsak tarafından disk biçiminde salınan öncül HDL partikülleri, başlıca fosfolipid ve apolipoprotein A-1 (apo A-1) içermektedir. Fosfolipidler, kolesterol ve bazı apolipoproteinler gibi trigliseritten zengin partiküllerin yüzey komponentlerinin hücre dışı eklenmesi ile öncül HDL partikülleri küresel parçacıklara dönüşür. Kolesterol, lesitin kolesterol açıl transferaz etkisi ile kofaktörü A-1'in varlığında esterleştirilmektedir. Esterifikasyon HDL ve hücre membranı arasında kolesterol konsantrasyon gradiyenti oluşturur. Bu durum hücrelerden HDL'ye kolesterol çıkışı için gereklidir (19).

Bu enzimatik süreç, özellikle HDL₂ (HDL, kolesterol ester içeriğine göre HDL₂ ya da HDL₃ olarak sınıflandırılır) olmak üzere HDL miktarının artmasına yol açar. Lipoproteinler arasındaki lipid transferi CETP tarafından düzenlenir, trigliseridlerin ve kolesterol esterlerinin değişimini aktive eder. CETP kolesterol esterlerini HDL₂'den VLDL, IDL ve remnantlara taşır, trigliseridleri ise HDL₂'ye taşır. HDL₂ hepatik lipaz tarafından hidroliz edilir ve HDL₃'e dönüşür. Hepatik lipaz lipoprotein transportunda önemli bir enzimdir, koaktivatör olarak apolipoprotein C-II gerektirmez, IDL'nin LDL'ye, HDL₂'nin de HDL₃'e dönüşümünü sağlayan ana lipolitik enzimdir. HDL₂ güçlü bir antiaterojeniktir ve düzeyleri hepatik lipaz tarafından düzenlenir.

Lipoprotein(a) kolesterol esterlerinden zengin, fizyolojik fonksiyonu tam olarak anlaşılamamasına rağmen aterojenik olduğu bilinmektedir ve endotelial lezyonlarda kolesterol birikimini artırır (9).

2.2. ATEROSKLEROZ

Lipidler, fibroblastlar, makrofajlar, düz kas hücreleri ve hücre dışı maddeleri değişik oranlarda içeren intimal plaklara bağlı olarak meydana gelen, ilerleyici arteriyel darlık ve tıkanmalara, arterlerin esneklik ve antitrombotik özelliklerinin bozulmasına yol açan hastalığa ateroskleroz denir. Ateroskleroz, nedenleri tespit edilip tedavi edilebildiği takdirde durdurulabilen veya geriletilebilen multifaktöryel, morbid ve mortal, sadece koroner damarları değil tüm arteriyel yapıları tutabilen ve etkileyen sistemik bir hastalıktır (20).

Aterosklerotik süreci hangi olay veya olaylar dizisinin başlattığı bilinmemektedir. Bu süreci açıklamaya yönelik geliştirilen hipotezler içinde en yaygın kabulü hasara tepki hipotezi görmektedir. Ross tarafından ortaya atılan bu varsayımda olayları endotel disfonksiyonu başlatmaktadır (21).

Kardiyovasküler hastalık ve ateroskleroz gelişimi için iyi bilinen risk faktörleri 2002 yılında Amerikan Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Üçüncü Erişkin Tedavi Paneli (NCEP ATP III) tarafından yayınlanmıştır (22). Yapılan çeşitli çalışmalarda bu klasik faktörlerin yanısıra diğer başka risk faktörleri de tanımlanmıştır (23, 24). Tablo 3'te bu faktörler belirtilmiştir. Bu risk faktörlerine, yeni tespit edilmiş bazı faktörler de eklenmiştir. Yeni risk faktörleri; Apolipoprotein B, Apolipoprotein A-1, trigliserid, trigliseritten zengin lipoprotein kalıntıları, bozulmuş açlık glukozu olarak belirlenmiştir (25).

Tablo 3. Aterosklerozun belirlenmiş risk faktörleri

Klasik risk faktörleri	Diğer risk faktörleri
▪ Yaş: Erkek > 45 Kadın > 55 ▪ Hipertansiyon (kan basıncı >140/90 ya da antihipertansif tedavi alan) ▪ Sigara içimi ▪ Ailede erken yaşta koroner kalp hastalığı: 1. dereceden erkek akraba<55 yaş 1. dereceden kadın akraba<65 yaş ▪ Dislipidemi ▪ Diyabet (koroner arter hastalığı eşdeğeri)	▪ Serum Lipoprotein(a) > 33 mg/dL ▪ Serum Hcy > 10 nmol/L ▪ Küçük yoğun LDL partikülleri ▪ Hiperinsülinemi ve insülin direnci ▪ Abdominal obezite ▪ Yüksek serum hsCRP konsantrasyonu ▪ Yüksek lökosit ve/veya yüksek hematokrit ▪ ACE için DD genotipi ▪ Antioksidan vitaminlerin eksikliği ▪ Klamidya enfeksiyonu ▪ Yüksek plazma fibrinojen, Faktör VII-VIII, plazminojen aktivatör inhibitör tip 1 konsantrasyonları

2.3. HOMOSİSTEİN

Hcy, metiyonin metabolizması sırasında oluşan ve sülfür içeren bir aminoasittir ve tiyol bileşiklerinin metabolik yollarında merkezi görev üstlenmiştir.

Metiyonin esansiyel bir aminoasit olup, ya diyetle alınır, ya endojen proteinlerin bozulması sonucu ya da Hcy'nin remetilasyonu ile oluşur. Metiyonin, yeni sentezlenen proteinlerin yapısına katıldığı gibi, adenosin trifosfat yardımı ile enzimatik olarak bir sülfonyum bileşiği olan S-adenozil metiyonin'e de dönüşebilir. S-adenozil metiyonin'in metil grubu DNA metiltransferaz aracılığıyla koparılarak, S-adenozil Hcy'ye dönüşür. Bunun adenosil kısmının hidrolitik olarak parçalanmasıyla da Hcy oluşur (26).

Vücuttaki Hcy, transsülfürasyon veya yeniden metilasyon (remetilasyon) yollarından birini kullanarak metabolize olur. Transsülfürasyon yolunda; vitamin B6 bağımlı bir enzim olan sistatyonin β sentetaz (CBS) enzimi görev yapar. Hcy, CBS katalizörlüğünde sistatyonine, o da sisteine hidrolize olur. Bu sistein de daha sonra sülfata hidrolize olarak idrarla atılır. Remetilasyon yolunda; Hcy'den, metiyoninin yeniden sentezi (remetilasyon) iki farklı yolla gerçekleşir. Kısa yolda; betain Hcy metil transferaz, bir metil vericisi olan betainin metil grubunu, Hcy'e aktararak metiyonin oluştururken kendisi dimetilglisine dönüşür. Uzun yolda ise 5-metiltetrahidrofolat, bir metil grubu vericisidir. 5-10 metilentetrahidrofolat, metilentetrahidrofolat redüktaz aracılığıyla 5-metiltetrahidrofolata dönüşür. 5-metiltetrahidrofolatın bir metil grubu, kobalamin (vitamin B12) bağımlı enzim olan metiyonin sentetaz aracılığı ile Hcy'ye aktararak metiyonin oluşturulurken diğer taraftan da tetrahidrofolat meydana gelir. Bu tetrahidrofolat tekrar 5-10 metilentetrahidrofolata dönüşür (26).

Plazmada, total Hcy'nin %70'i proteinlere bağlanarak, %25'i disülfid bağı ile birbirlerine bağlanarak (disülfid Hcy) ve %5'i de Hcy tiyolakton halinde bulunur. Kang ve ark. aç olarak alınan kandaki plazma total Hcy seviyelerini, normal (5-15 mmol/L), orta (15-30 mmol/L), ara (30-100 mmol/L) ve ağır (100 mmol/L ve üzeri) olarak 4 gruba ayırmışlardır. Yaşa bağlı olarak Hcy plazma seviyesi hafif artma eğilimi gösterir (26). Plazma total Hcy düzeyi birçok faktörden etkilenmektedir (Tablo 4) (27).

Hiperhomosisteinemi, vücutta birçok zararlı etkilere yol açmaktadır. Hcy'nin serbest radikaller gibi davranıp endotel hasarı oluşturması ve bu olayın sonucunda da trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu, trombüs formasyonu gibi koagülasyonu artırıcı etkiler meydana getirmesi, biyolojik membranlarda oksidasyon yapması, LDL oksidasyonu yaparak ateroskleroza artırıcı etkiler ortaya çıkarması sayılabilmektedir (28).

Hcy'nin kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve her 5 mmol/L'lik artışın kardiyovasküler hastalık riskini erkeklerde 1.35, kadınlarda ise 1.42 kat artırdığı bildirilmiştir (29). Buna karşılık 6 prospektif çalışmada, Hcy düzeyi ile ölümcül olan ve olmayan koroner arter hastalığı arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır. Bir meta-analiz çalışmasında, araştırmaların çoğunun heterojen olduğu ve homosisteinin düşünüldüğü gibi kalp üzerine zararlı etkisinin olmadığı fakat sağlıklı yaşantının bir göstergesi olabileceği vurgulanmıştır (30).

Tablo 4. Total Hcy Düzeylerini Etkileyen Faktörler

Fizyolojik	Hastalıklar
Yaş	Vitamin B12 ve B6 eksikliği
Cinsiyet	Hipotiroidi
Böbrek fonksiyonları	Diyabet
Menopoz	Böbrek yetmezliği
Yaşam Tarzı	Genetik
Sigara kullanımı	Homozigot CBS defekti
Diyet	Heterozigot CBS defekti
Alkol alımı	Homosistinüri
Egzersiz	Metiyonin sentaz defekti
İlaçlar	
Vitamin B12 ve B6 antagonistleri	
Antiepileptikler	
Kontraseptif ve hormon tedavisi	

2.4. C-REAKTİF PROTEİN

CRP, 120 kDa ağırlığında, non-kovalent bağlı, beş özdeş alt birimden meydana gelen, pentraksin ailesinden, bir prototip akut faz proteinidir. Bu yapısal düzen, serum amiloid A gibi diğer akut faz proteinleri ile benzerlik göstermektedir.

Akut faz yanıtında hızlıca yükselmesi, 24-48 saat içinde binlerce kat artabilmesi, hızlıca eski seviyelerine inmesi, diüurnal varyasyon göstermemesi, yaş ve cinsiyet farkı göstermemesi çarpıcı biyolojik özelliklerindendir (31) .

Akut hastalığı olan bireylerin serumlarında Streptococcus pneumoniae'nin hücre duvarının C-polisakkarid antijenine bağlandığı için bu ad verilmiştir. Primer olarak karaciğerde sentezlenir.

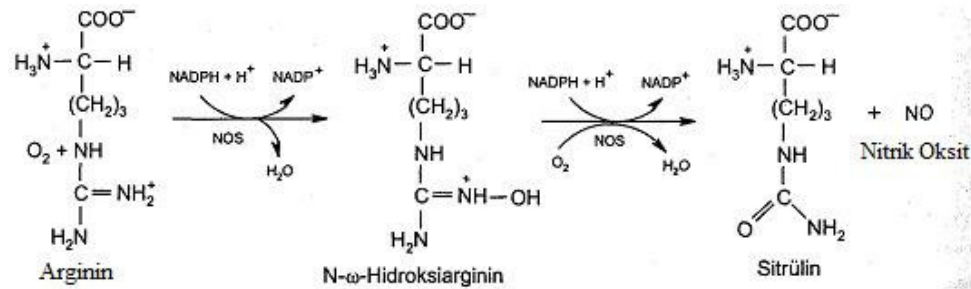
Kalsiyum iyonu varlığında CRP bir çok bakteri, fungus ve protozoal parazitlerin polisakkarit alt gruplarına bağlanmakla birlikte fosforil kolin, fosfatidil kolin, lesitin, polianyonik nükleik asitlere de bağlanabilir. Kalsiyum iyonu yokluğunda histonlar gibi polikasyonları bağlar. Kompleks oluşunca, CRP klasik kompleman yolunu başlatan kompleman 1q'nun aktivasyonuna yol açar. CRP opsonizasyonu, fagositoz ve hücrel lizisi başlatır. Oluşan bütün olaylar inflamatuvar reaksiyon cevabıdır. CRP ayrıca potansiyel olarak toksik hasarlanmış dokulardan salınan otojen maddeleri de bağlar ve detoksifiye eder. CRP opsonizasyondan sonra katabolize olur.

CRP seviyeleri miyokard enfarktüsü, stres, travma, infeksiyon, inflamasyon, cerrahi ve neoplazide dramatik olarak artar. Kronik inflamatuvar hastalıkların aktivasyon dönemleri, obezite ve metabolik sendromda da CRP seviyeleri artmaktadır (19).

Yapılan çalışmalarda artmış hsCRP seviyelerinin ateroskleroz ve koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (32). Buna rağmen koroner arter hastalığı riskini araştırmak için rutin ölçümü halen önerilmemektedir. hsCRP düzeyleri ölçülen ve yüksek bulunan kişilerde LDL-K düşürücü tedavide daha agresif olunması gerektiği tavsiye edilmektedir (31).

2.5. NİTRİK OKSİT

NO, endotel kaynaklı önemli bir vazodilatatördür ve NO sentaz (NOS) tarafından L-Arjinin'den sentezlenir (Şekil 1). NO üzerinde yük taşınamaması ve eşlenmemiş elektron bulundurması nedeniyle hücrelerden kolaylıkla geçer. Taşıdığı eşlenmemiş elektron nedeniyle radikal bir moleküldür. NO'nun düşük konsantrasyonlarda önemli fizyolojik rolleri vardır, ancak aşırı ve kontrolsüz NO üretimi hücreler için zararlıdır. NO çok kısa yarı ömre sahiptir, 2-30 saniye içinde daha stabil bir yapı olan nitrata oksitlenir (33).



Şekil 1. NOS Tarafından NO Sentezi

Üç tip NOS izoformu mevcuttur ve aktivitesi için NADPH, FAD, FMN, hem ve tetrahydrobiopteridine gereksinim duyar.

- 1) nNOS: Sinir ve bazı dokularda (akciğer, pankreas, mide ve uterus) bulunan ve kalsiyuma bağımlı olan nöronal tip.
- 2) eNOS: Endotel hücrelerinde bulunan ve kalsiyuma bağımlı olan endotelial tip.
- 3) iNOS: İmmunolojik uyarılarla indüklenen ve kardiyomiyositler, hepatositler, nöronlar, mikrogial hücreler, nötrofiller, vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde bulunan, kalsiyumdan bağımsız indüklenebilir tip (33).

NO çok yönlü biyolojik haberci bir molekül olup farklı biyolojik etkilere sahiptir ve Tablo 5’te bu etkileri gösterilmiştir.

Tablo 5. NO’nun Biyolojik Etkileri (34)

Düzenleyici etkileri
Platelet agregasyonunun inhibisyonu Renal ve intestinal görevleri Düz kasların gevşemesi Hücre adezyonunun kontrolü Damar geçirgenliğine etkileri İmmün sistemdeki fonksiyonlar
Koruyucu etkileri
Antioksidan fonksiyonu Anti inflamatuvar etkileri TNF* toksisitesine karşı etkileri
Zararlı etkileri
Antioksidanları tüketmesi Enzim inhibisyonları DNA hasarları Lipid peroksidasyonu Diğer toksik etkenlere duyarlılığı artırması

*Tümör Nekrozis Faktör

Hem antioksidan savunmaya katkıda bulunur hem de aşırı miktarda üretildiğinde radikal etki göstermektedir. NO’nun sentezlendiği yer ve ortamdaki derişimi hangi tür tepkimelere gireceğini ve ne gibi biyolojik etkilere sahip olacağını belirleyen ana faktörlerdir (34).

2.6. METABOLİK SENDROM

Metabolik sendrom, insülin direnciyle başlayan abdominal obezite, glukoz intoleransı veya diyabet, dislipidemi, hipertansiyon ve koroner arter hastalığı gibi sistemik bozuklukların birbirine eklendiği ölümcül bir endokrinopatidir.

Metabolik sendromun tüm bileşenlerinin etyopatogenezi açıklayabilecek tek bir genetik, enfeksiyöz ya da çevresel faktör henüz tanımlanamamıştır. Metabolik sendrom, insülin direnci zemininde gelişen heterojen bir hastalıktır. Poligenik yatkınlık söz konusu olsa da, modern kent hayatının getirdiği sedanter yaşam ve yüksek kalorili beslenme sendromun seyrini alevlendirmektedir (35). Kardiyovasküler komplikasyonları ile morbidite ve mortalitesi yüksektir. Metabolik

sendrom tanısında kullanılan kriterler, NCEP ATP III kılavuzunda belirtilmiştir (Tablo 6). Tanı için bu beş kriterden üçünün bulunması yeterlidir (36).

Tablo 6. NCEP ATP III Metabolik Sendrom Tanı Kriterleri

1.Abdominal obezite (bel çevresi) Erkek için >102 cm Kadın için >88 cm
2.Serum trigliserid $\geq$ 150 mg/dL
3.HDL-K Erkek için < 40 mg/dL Kadın için < 50 mg/dL
4.Kan basıncı $\geq$ 130 / 85 mmHg
5.Açlık plazma glukoza $\geq$ 110 mg/dL

Ayrıca Uluslararası Diyabet Kurumu da metabolik sendrom tanı kriterleri yayınlamıştır (35). Buna göre; Abdominal obezite (Bel çevresi: Avrupalı erkeklerde $\geq$ 94 cm, kadınlarda $\geq$ 80 cm) ve aşağıdakilerden en az ikisinin bulunması gereklidir.

- Trigliserid $\geq$ 150 mg/dL
- HDL-K: erkekte < 40 mg/dL, kadında < 50 mg/dL
- Kan basıncı $\geq$ 130/85 mmHg
- Açlık kan glukoza $\geq$ 100 mg/dL veya Tip 2 diyabet

Metabolik sendrom erken oluşan ateroskleroz için risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Metabolik sendromlu hastalarda koroner arter hastalığı riski 3 kat artmıştır. Kardiyovasküler mortalite metabolik sendromlu hastalarda %12 iken, metabolik sendromu olmayanlarda bu oran %2.2 dir.

Metabolik sendrom tedavi hedefleri; insülin direncine neden olan risk faktörlerinin yaşam şekli değişiklikleri ile kontrol altına alınması ve gerekli koşullarda klinik hedeflere ulaşmak amacıyla ilaç tedavisinin başlanmasıdır. Yaşam tarzı değişikliği dışında, metabolik sendromu tedavi edebilecek tek bir ajan söz konusu değildir. En uygun tedavi yöntemi, kilo kaybının temini ve düzenli egzersiz için yaşam şekli değişikliğinin sağlanması, sağlıklı beslenme ve sigaranın kesilmesidir (35).

2.7. PARAOKSONAZ

PON, Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimidir. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile

koroner kalp hastalığı riskinden korunulabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır (37).

Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişki araştırılmış, ayrıca genetik çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (38).

2.7.1. Adlandırılması

Biyokimya ve Moleküler Biyolojinin Uluslararası Nomenklatur Komitesi'nin enzim isimlendirmesinde PON iki numaraya (E.C. 3.1.1.2 ve E.C. 3.1.8.1.) sahiptir. 1990'lı yıllardan sonra, PON'un arilesterazdan farklı olarak yalnız fenolik esterleri değil, fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği anlaşılmış ve E.C. 3.1.8.1 ile tanımlanmıştır (39).

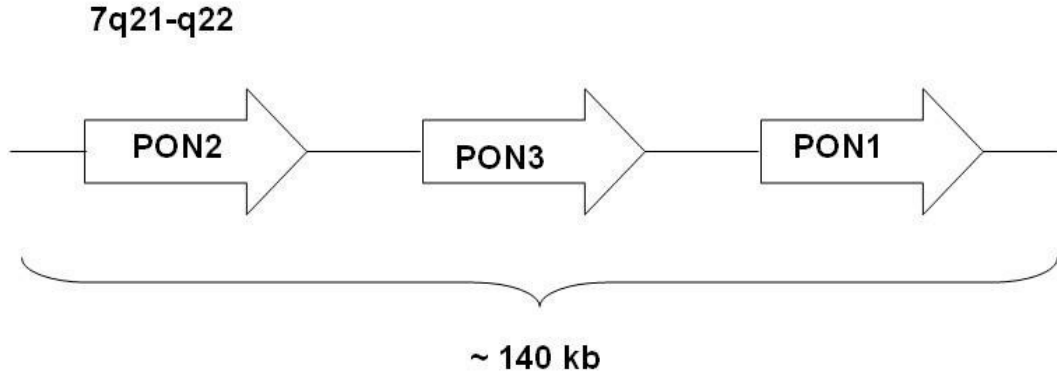
Esterazlar organofosfat (OP) bileşikleri ile olan ilişkilerine bakılarak iki gruba ayrılırlar. A-esterazlar OP bileşiklerini hidrolize ederler, B-esterazlar ise OP'ler tarafından inhibe edilirler. A-esterazlar, arildialkilfosfataz (PON) ve diizopropilflorofosfatazı içerirler. B-esterazlar ise karboksilesteraz ve kolinesterazdan oluşur (40, 41).

İnsektisitleri de (OP'ler, karbamat) içine alan birçok sentetik bileşik A-ester yapısındadır. Böceklerde A-esteraz bulunmadığı için bu kimyasallar, bu canlılara karşı pestisid olarak kullanılırlar. Memelilerde de bu OP'lerin detoksifikasyonunun en önemli yolu, serum ve karaciğer A-esterazlar tarafından düşük toksisiteli metabolitlerine hidrolizidir (42). PON ismi bir insektisid olan paratyonun metaboliti olan paraoksonu hidrolize etme kapasitesinden gelmektedir (8).

2.7.2. Paraoksonaz Gen Ailesi

İnsan genomu şu ana kadar belirlenmiş ve PON1, PON2, PON3 olarak adlandırılan 3 adet PON geni içermektedir (Şekil 2). Her üç gen 7. kromozomun q21.3 ve q22.1 bantları üzerinde yerleşmiş olup aminoasit düzeyinde en az % 60 oranında benzerlik gösterirler. Üç PON geni de yaklaşık aynı uzunlukta 9 ekzondan oluşur (43).

Paraoksonazların antioksidatif özellikleri vardır. PON1 içlerinde en çok araştırılanıdır, ancak son zamanlarda ilgi PON2 ve PON3'ün fonksiyonlarının daha iyi anlaşılması için bu yöne doğru kaymıştır (8).



Şekil 2. PON Gen Ailesi ve PON1, PON2 ve PON3 Genlerinin İnsan 7. Kromozomu q21. ve q22. Bantları Üzerindeki Yerleri (44)

PON1 ve PON3 HDL-K üzerinde bulunur, PON2 ise pek çok dokuda bulunmaktadır. PON1 ayrıca insan karaciğer mikrozomlarında bulunur. Primo-Parmo ve ark, PON1 mRNA'sının karaciğerden başka, böbrek, kalp, beyin, ince bağırsak ve akciğer gibi pek çok dokuda bulunduğunu göstermişlerdir (44).

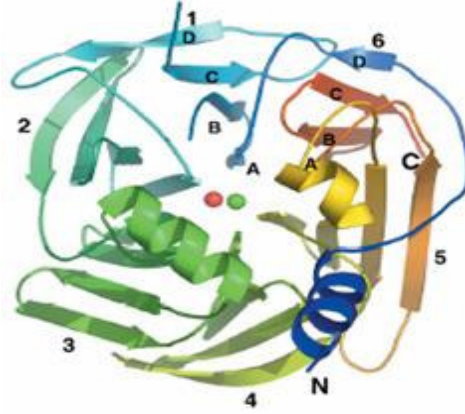
PON1 çeşitli sentetik substratlara karşı etkili bir esterazdır, PON2 ve PON3 ise yüksek laktonaz aktivitesi gösterir. PON2 ve PON3 paraoksonaz aktivitesi göstermez. PON için fosfolipaz A2 etkisi, homosistein tiyolaktonun hidrolizi ve inaktivasyonu, aterosklerotik vasküler hastalıklar için risk faktörü gibi çeşitli fizyolojik roller bildirilmiştir (37).

2.7.3. Paraoksonaz1

2.7.3.1. Biyokimyasal Yapısı

Serum PON1, OP'lerin hidrolizini katalizlediği bilinen kalsiyum bağımlı bir esterazdır. Karaciğer, böbrek, bağırsak gibi dokulara geniş çapta yayılmıştır. Temel olarak karaciğerde sentezlenir ve serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur. PON1, 43-45 kDa molekül ağırlığına sahip, 354 amino asitten oluşan bir glikoproteindir (8). İzoelektrik noktası 5.1'dir. Aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez. Protein ağırlığının %15.8'ini oluşturan karbohidrat üniteleri proteine 4 farklı noktadan bağlı olarak bulunurlar. İnsan PON1 proteini üç adet sistein içerir ve bu üç sistein molekülünden ikisi arasında disülfid bağı bulunur (37). Protein yapısında bulunan 42. ve 352. sistein amino asitlerinin oluşturduğu tek disülfid bağı, polipeptid zincirinin halka yapıda olmasına neden olmaktadır. İki yüz seksen dördüncü konumdaki serbest sistein amino asidinin aktif merkez için rol aldığı düşünülmektedir (45).

PON1, 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet β -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir (46). Üç boyutlu yapıda; β -kırmalı tabakaların merkezinde $7.4\text{\AA}$ aralıklı iki adet Ca^{+2} iyonu bulunmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3. PON1'in Üç Boyutlu Yapısı. Altı adet β -kırmalı yapı, N ve C terminal bölgeleri ve β -kırmalı yapıların merkezinde yer alan 2 adet kalsiyum iyonu (Ca1, yeşil; Ca2, kırmızı) görülmektedir (49).

Bunlardan bir tanesi yapısal özellikli olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır. Diğeri ise katalitik etkinlikte rol oynar. Bu kalsiyum iyonu $2.2-2.5\text{\AA}$ uzaklıkta 5 adet aminoasit rezidüsü (Asn224, Asn270, Asn168, Asp269 ve Glu53) ile etkileşim halindedir. Aynı kalsiyum iyonu bir su molekülü ile fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir (37). PON1 enziminin kristal yapısının incelenmesinde ve nokta mutasyonlar ile yapılan çalışmalar, iki Ca^{+2} molekülü ile birlikte bir çok amino asidin katalitik aktif merkezde rol alabileceğini göstermektedir. Yapılan nokta mutasyon analizlerinde enzimin katalitik etkisi için en önemli amino asitlerin His115 ve His134 olduğu bildirilmiştir (47). PON1 aktif bölgede diğer β -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks (H_1 , H_2 ve H_3) yapıları vardır. Bunlar aynı zamanda sonlanma noktalarıdır. Bu yapı aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir (48).

2.7.3.2. Paraoksonaz1'in Sentezlenmesi ve Salgılanması

PON1 karaciğerde sentezlenir ve seruma salgılanır. PON1'in salgılanmasının mekanizması önemlidir, çünkü hücre içinden salgılanmasını düzenleyen faktörler enzimin serum düzeylerini etkiler. PON1'in seruma salgılanabilmesi için uygun bir alıcı gereklidir ki bu da HDL'dir. PON1, HDL'den fosfolipidler tarafından yarışmalı olarak uzaklaştırılır, bu sayede HDL ve hücre membranları ile hasarlı lipid alanları

gibi fosfolipitten zengin alanlar arasında hareket edebilir. HDL hücre membranlarından PON1'i uzaklaştırır. HDL bağımlı PON1 salgılanması konsantrasyon bağımlıdır ve doyurulabilir (50).

2.7.3.3. Enzimin Katalitik Mekanizması

Enzimin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti, kalsiyum iyonu ve su molekülü, esteraz aktivitesinde önemli rollere sahiptir.

Katalitik etkinlik gösteren Ca^{+2} iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıktadır. Aktif bölgedeki His-His çifti, su molekülünün bir protonunu alarak bu molekülün nükleofilik gücünü artırır. Oluşan hidroksil iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırır. Bu esnada meydana gelen kompleks tetrahedral bir düzlem sonucu Ca^{+2} iyonu ile kararlı kılınır. Oluşan yapıdaki Ca^{+2} iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar.

PON1'in mekanizmasını açıklamak amacıyla, esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat ve fosfotriesteraz aktivitesi için paraoksan substratları kullanılmıştır. Bu substratların optimum pH aralıkları saptanmış ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucu bulunmuştur (49).

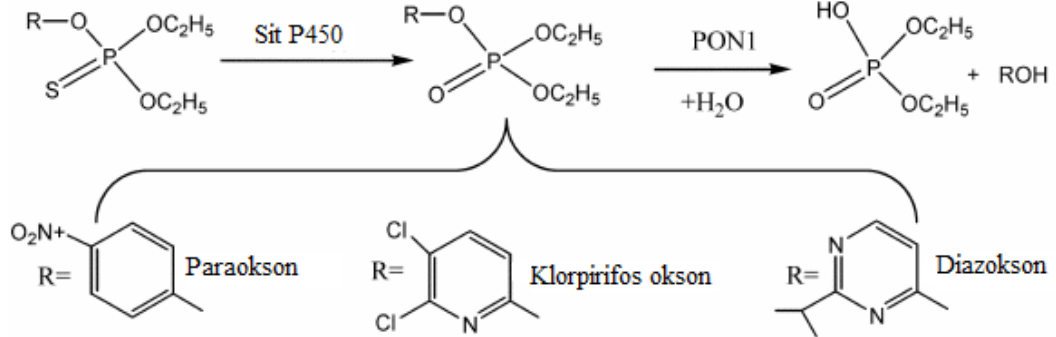
2.7.3.4. Paraoksonaz1'in Enzimatik Aktiviteleri

PON1 paration, diazinon ve klorprifos gibi insektisitlerin okson metabolitlerini, sarin, soman gibi sinir ajanlarını, fenil asetat gibi esterleri, laktonları, siklik karbonatları ve fosfolipit hidroperoksitleri içeren çok çeşitli substratları (Tablo 7) hidrolize eder (Şekil 4) (51).

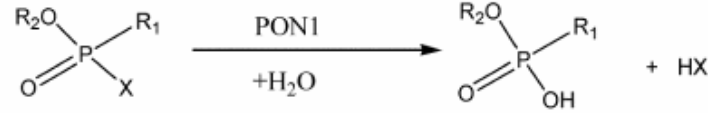
Tablo 7. PON1'in Substratları

Organofosfatların okson metabolitleri	Aril (aromatik) esterler
Paraokson Metil paraokson Pirimifos-metil okson Klorprifos okson Diazokson Klortion okson Fenitroksan	Fenil asetat Tiyofenilasetat 2-naftilasetat Aromatik laktonlar Alifatik laktonlar Dihidroksümarin γ -bütirolakton Homosistein tiyolakton Fosfolipid hidroperoksitler
Sinir ajanları (gazları)	Siklik karbonatlar
Soman Sarin Armin	Prulifloksasin

a. Yaygın kullanılan insektisitlerin okson metabolitlerinin hidrolizi



b. Sinir gazlarının hidrolizi

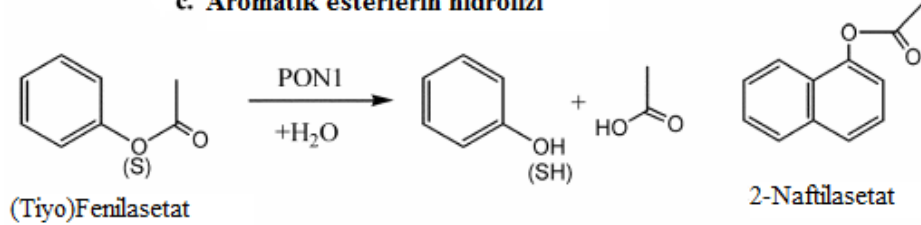


$\text{R}_1 = \text{N(CH}_3)_2$ $\text{R}_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ $\text{X} = \text{CN}$ Etil N-dimetilfosforamidosiyamid (Tabun)

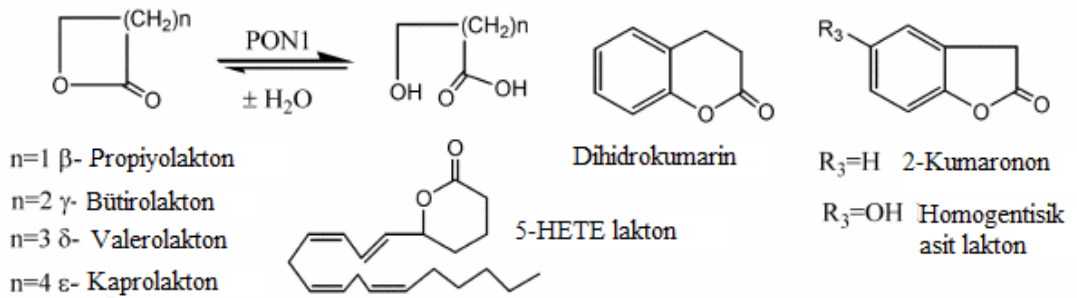
$\text{R}_1 = \text{CH}_3$ $\text{R}_2 = \text{CH(CH}_3)_2$ $\text{X} = \text{F}$ İzopropil metilfosfonofloridat (Sarin)

$\text{R}_1 = \text{CH}_3$ $\text{R}_2 = \text{CH(CH}_3)\text{C(CH}_3)_3$ $\text{X} = \text{F}$ Pinakoil metilfosfonofloridat (Soman)

c. Aromatik esterlerin hidrolizi



d. Lakton hidrolizi ve hidroksi asitlerin laktonizasyonu



Şekil 4. PON1'in Substratları ve Enzimatik Aktiviteleri

Pek çok OP insektisitler sitokrom P450 sistemi tarafından biyotransformasyona uğrarlar. PON1'in aromatik ester substratları arasında fenilasetat, tiyofenilasetat ve 2-naftilasetat bulunur (51).

Aromatik ve alifatik laktonlar, siklik karbonatlar da PON1 tarafından hidrolize edilir, örneğin; homogentisik asit lakton, dihidrokumarin, γ -bütirolakton ve homosistein tiyolakton. PON1 ayrıca γ - ve δ -hidroksikarboksilik asitlerin tersine reaksiyonunu, laktonizasyon, katalizler. Laktonlar bitkilerin genel yapı taşlarıdır ve pek çok gıda ürünlerinde doğal baharat ajanlarıdır (51). Jakubowski PON1'in bir L-Hcy tiyolakton hidrolaz olduğunu tespit etmiştir. Fakat fenilasetat ve paraoksonla karşılaştırıldığında ($K_m \sim 0.5$ mM) L-homosistein tiyolakton için çok düşük afiniteye ($K_m \sim 23$ mM) sahiptir (52).

PON1 ayrıca doymamış siklik bir karbonat olan aktif kinolon antibiyotik NM394 için ön ilaç olan prulifloksasini hidrolize eder (53).

PON1'in laktonaz aktivitesi lokal etkili glukokortikoid ilaçların geliştirilmesinde kullanılmıştır. Glukokortikoidler sistemik dolaşıma ulaştıncı hızlıca hidrolize olur ve inaktivasyona uğrarlar ve böylece serum PON1 onların istenmeyen sistemik etkilerini önler (54). PON1 ayrıca fosfolipit hidroperoksitleri de hidrolize eder ve bu şekilde LDL ve HDL'yi oksidatif değişikliklere karşı korur (37).

2.7.3.5. Organofosfat Toksisitesinde Paraoksonaz1'in Rolü

OP'ler tarımdaki faydalarının yanı sıra, insanların hayatını önemli ölçüde tehdit eden toksik kimyasallardır. PON1, savunma sistemi oluşturarak OP'lerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Soman, sarin ve tabun gibi OP sinir gazlarını hidroliz ederek, bunları daha az zararlı bileşiklere dönüştürmektedir (55).

İnsan serum PON1'i ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisit toksik okson metabolitlerini de hidrolizleyebilmektedir (51).

2.7.3.6. Lipid Metabolizması ve Aterosklerozda Paraoksonaz1'in rolü

1980'lerde ilk kez Mackness ve arkadaşları PON1'in OP'ler ve fosfolipitlerin yapılarındaki benzerliklerden dolayı, fosfolipitlerin metabolizmasında rolü olduğunu önermişlerdir. İnsanlardaki HDL ilişkili PON1, LDL'yi oksidasyondan koruyabilme yeteneğine sahiptir. Çeşitli mekanizmalar bu koruyucu rolün açıklanmasında önem kazanmaktadır. HDL ile ilişkili enzimlerin (Tablo 8) oksidatif modifikasyonlara karşı lipoproteinleri koruduğu düşünülmektedir. PON; LDL'yi, Cu iyonunun ve serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan korumaktadır (56).

Tablo 8. HDL’deki Enzimatik Aktiviteye Sahip Olan Proteinler (57)

PON1
LCAT
PAF-AH*
Apo A-1
Proteinaz (elastaz benzeri)
Fosfolipaz D
Albumin

*Platelet aktive edici faktör asetil hidrolaz

Saflaştırılmış insan PON1’inin, LDL’nin lipid peroksidasyonunun önlenmesinde oldukça etkili olduğu bulunmuştur. Oksidasyona karşı LDL’nin korunmasında PON1’in, lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) ya da apo A-I’den oldukça fazla etkili olduğu bulunmuştur (57).

HDL ilişkili PON1, oksidatif hasardan HDL’nin korunmasında da etkindir. Okside HDL’deki lipid peroksitler ve kolesterol linoleat hidroperoksitlerin PON1 aracılı hidrolizi iki mekanizmayla olmaktadır. 5' pozisyonunda hidroksil grubu olan okside lipidler veya ilişkili türevleri lizofosfatidil kolin ve ayrı ayrı valerolakton ürünleri oluşturmak için PON1 tarafından laktonize edilir. Daha sonra ortamın pH’sı ve su içeriğine bağlı olarak PON1 tarafından 5-hidroksikarboksilik asit oluşturmak üzere hidrolize edilir ya da değişmeden kalır. PON1 tarafından oluşturulan lizofosfatidil kolin HDL’nin makrofajlara bağlanmasını ve HDL aracılı makrofaj kolesterol dışa akışını artırır (58). PON1’in ayrıca hidrojen peroksiti büyük ölçüde hidroliz edebildiği bulunmuştur, major reaktif oksijen ürünleri oksidatif stres altında aterogenez boyunca üretilmektedir. Böylece PON1 LDL’nin oksidasyondan korunmasına ek olarak ters kolesterol taşınmasında HDL’nin antiaterojenik fonksiyonlarını korur (59).

PON1’in antiaterojenik etkisi Tablo 9’da özetlenmiştir. Makrofaj köpük hücre oluşumu, erken aterogenez göstergesidir ve hücrel kolesterol birikimi kolesterol giriş ve çıkışı arasındaki dengeye bağlıdır. PON1, kolesterol biyosentezinin inhibisyonu ve çöpçü reseptör yoluyla okside LDL’nin kaldırılması ile makrofaj kolesterol birikiminde bir azalmaya katkıda bulunur PON1 HDL’nin makrofajlara bağlanmasını artırır ve böylece makrofaj fosfolipidlerindeki hidrolitik etkisiyle HDL aracılı makrofaj kolesterol çıkışını uyarır, lizofosfatidil kolin meydana gelir ve HDL’nin hücrelere bağlanması artar (51).

Tablo 9. PON1'in Antiaterojenik Etkilerinin Kanıtları (51)

1.Oksidasyona karşı LDL'yi korur Lipid peroksidleri azaltır
2.HDL'yi oksidasyona karşı korur ve fonksiyonlarını korur Makrofajlardan hücrel kolesterol çıkışını artırır
3.Okside LDL'nin etkilerini düzeltir İnflamatuvar ve sitotoksik okside fosfolipidleri azaltır Makrofajların LDL alımını azaltır Okside LDL tarafından uyarılan monosit transmigrasyonunu azaltır
4.Aterosklerotik lezyonlarda lipid peroksidleri azaltır

2.7.3.7. Paraoksonaz1'in Lipid Substratları

PON1'in kesin substrat spesifitesi henüz belirlenememiştir. PON1 kısa zincirli esterlere karşı yüksek aktivite, uzun zincirli esterlere karşı ise daha düşük aktivite gösterir, uzun zincirli esterler lipazların tipik substratlarıdır (49). Linoleat veya araşidonat içeren fosfolipidlerin hidroperoksidleri PON1'in substratı gibi davranmaktadır. PON1'in yağ asit hidroperoksidi kısa zincirli yağ asit aldehid ya da keton türevlerine hidrolizi fosfolipid omurgaya tutunmayı durdurur, lizofosfolipid üretmek için PAF-AH'ın bir substratı haline gelir ki bu güçlü bir proaterojeniktir (60). Kolesterol esterlerin araşidonat ve linoleat hidroperoksit türevleri ayrıca PON1 için substrattırlar (59). Aviram ve arkadaşları, insan koroner ve karotid arter aterosklerotik lezyon homojenatlarında kolesterol linoleat hidroperoksitler ve kolesterol linoleat hidroksitlerin PON1 tarafından kolesterol ve linoleik asit hidroperoksitler ve linoleik asit hidroksitleri üretmek için hidroliz edildiğini göstermişlerdir. Saflaştırılmış PON1 ayrıca linoleik asit hidroperoksitleri, linoleik asit hidroksitlere indirger. Bu bulgular PON1'in hem esteraz hem de peroksidaz tipi aktiviteye sahip olduğunu gösterir (60).

2.7.3.8. Bakteriyel Endotoksinlere Karşı Koruma

İnsan serumunda HDL'de bulunan bir proteinin, bakteriyel lipopolisakkaritleri inaktive ederek toksik semptomları önlediği saptanmıştır. Lipopolisakkarit inaktivasyonu, immunolojik olmaktan çok enzimatik bir reaksiyondur. Bu reaksiyondan sorumlu enzimin PON1 olduğu saptanmıştır. PON1 bakteriyel lipopolisakkariti, lipit A molekülündeki 4' fosfat üzerine fosfataz etkisi ile hidroliz eder. HDL'nin bir subfraksiyonu olan Tripanolitik faktör, Trypanosoma brucei brucei'e sitotoksiktir ve apo AI, PON, haptoglobulin ile ilişkili bir proteindir.

Lizozomal pH'da aktive olan PON1'in peroksidaz aktivitesi olduğu düşünülmektedir. HDL kompleksinin endotoksin toksisitesine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Gram (-) bakteriyel enfeksiyon sırasında, endotoksemi gelişimine karşı korumayı bir ölçüde sağlar. PON1, makrofaj hücre yüzeyindeki CD14 spesifik bağlayıcı proteinle, bakteri yüzeyinden köken alan lipoprotein polisakkaritin etkileşimini önler. Aksi takdirde TNF- α , interlökin-1, interlökin-6 gibi sitokin başlıklarının salınımını başlatır, bu sitokinler değişik semptomlara neden olur (61).

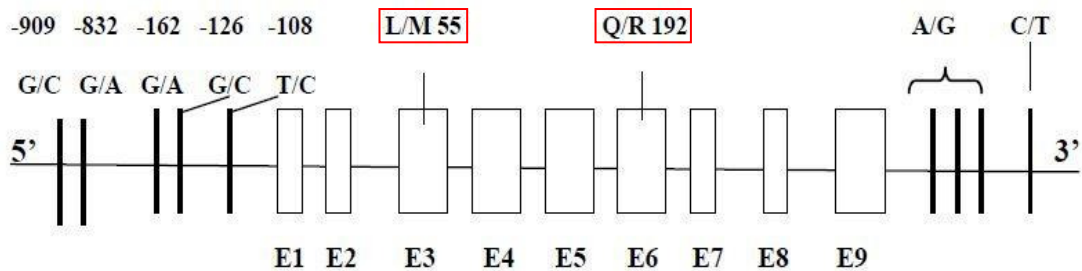
2.7.3.9. Paraoksonaz1 Aktivitesindeki Değişkenliğin Kaynakları

Serum PON1 aktivitesi bir popülasyonda 40 kat değişkenlik gösterebilir. Bu varyasyonun bir kısmı genetik polimorfizmler ile açıklanmış olsa da; yaş, fizyolojik ve patolojik durumlar, diyet, yaşam tarzı (sigara, alkol gibi), çevresel kimyasallar ve ilaçlar gibi PON1 aktivitesini herhangi bir şekilde etkilediği gösterilen faktörler de gözönünde bulundurulmalıdır (62).

2.7.3.10. Paraoksonaz1 Polimorfizmleri

Genetik polimorfizmler popülasyonun % 1'inden fazlasında bulunan, genomik DNA sekanslarındaki doğal varyasyonlardır ve tek bir nükleotitte bulunan DNA varyasyonları tek nükleotit polimorfizmleri (TNPs) olarak adlandırılır (63).

İnsan PON1 geninde tanımlanmış yaklaşık 200 civarında TNPs vardır (64). Bu polimorfizmler enzim konsantrasyonunu ve protein ekspresyonunu etkiler. Şekil 5'te 5'- düzenleyici bölgesi, kodlayan bölge ve 3' translasyona girmeyen uçtaki PON1 polimorfizmleri şematik olarak gösterilmiştir (65).



Şekil 5. PON1 geninin yapısı. Dokuz adet ekzon (E1-E9) kutucuklar ile gösterilmiştir. 5' düzenleyici uçtaki 5 polimorfizm, kodlayan bölgedeki 2 polimorfizm ve 3' translasyona girmeyen uçtaki 4 polimorfizm görülmektedir, bu çalışmada araştırılan polimorfizmler ise kırmızı kutu içine alınmıştır

Bu polimorfizmler restriksiyon endonükleazlar ile kolayca tespit edilebilmektedirler ve sınırlayıcı enzim parça uzunluk polimorfizm (RFLP)'leri olarak adlandırılmaktadır (66). Bu polimorfizmler sonucunda ortaya çıkan PON1' in allelik formları izozim veya allozim olarak adlandırılırlar.

2.7.3.11. Kodlayan Bölgedeki Polimorfizmler

PON1 kodlayan bölgesi 5 adet TNPs içermektedir. Genin kodlayan bölgesinde 2 majör ve yaygın TNPs görülür. Lösin/Metiyonin değişimi 55. konumda (L/M 55) ve Glutamin/Arjinin değişimi 192. konumda (Q/R 192) görülmektedir (66).

2.7.3.11.1. Q/R 192 Polimorfizmi

Paraokson, klorprifos okson, diazokson, soman ve sarin gibi substratlarla yapılan PON1 aktivite çalışmaları, 192 Q/R polimorfizminin, bu substratların hidroliz oranlarındaki farklılıklardan sorumlu olduğunu göstermiştir (65).

192 Q ve 192 R allozimleri, bu substratlara karşı farklı afinite ve katalitik aktiviteye sahiptir. PON1 Q izoformunun paraoksonu daha yavaş, diazokson, sarin, soman ve γ -bütirolaktonu PON1 R'den daha hızlı hidrolize ettiği bulunmuştur. PON1 R ise paraoksonu hızlı, diazoksonu daha yavaş hidrolize eder. Fenilasetat ve dihidrokumarin hidroliz oranları polimorfizmle ilişkili değildir ve her iki izoform bu substratı eşit oranlarda hidroliz eder (50).

PON1 Q izoformunu içeren HDL, LDL'yi bakırla indüklenen oksidasyona karşı korumada daha etkilidir. Bunun nedeni Q izoformunun fosfolipit hidroperoksitleri metabolize etme aktivitesinin daha yüksek olmasıdır (37).

Yapılan çalışmalarda yaklaşık olarak düşük aktiviteli QQ allozim taşıma oranının % 40, yüksek aktiviteli RR allozim taşıma oranının %10 ve bu allozimlerin arasında bir aktivite gösteren QR heterozigot allozimi taşıma oranının ise % 50 civarında olduğu görülmüştür (66).

2.7.3.11.2. L/M 55 Polimorfizmi

Kodlayan bölgede 55. konumda görülen L/M 55 polimorfizmi PON1 enzim aktivitesini Q/R 192 polimorfizminden bağımsız olarak etkilemektedir. Substrat olarak paraokson kullanıldığı zaman, L55 taşıyan allozimin M55 taşıyan allozimden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. L/M polimorfizmi aynı zamanda karaciğerdeki enzim ekspresyonunu etkilemekte ve bunun sonucunda enzimin serumdaki yoğunluğunu belirlemektedir (67). L55 alleli M55 alleleline göre daha çok eksprese olmakta ve dolayısıyla L55 alleli taşıyan bireylerin serumlarında PON1 yoğunluğu daha yüksek olmaktadır. Ayrıca L55 izoformu daha stabil ve proteolizise

karşı daha dirençlidir (68). PON1 enzim aktivitesinin değişimi bireyler arasındaki farklılıklardan kaynaklanır. Aynı genotipe sahip bireylerin PON1 enzim aktivitelerinde 13 kata kadar varan farklılıklar görülebilmektedir. Enzimin yoğunluğunu değiştirmesi nedeni ile L/M 55 polimorfizmi sadece substrata spesifik enzim aktivitesinde değişikliğe neden olmaz, aynı zamanda fenilasetat gibi polimorfizmden etkilenmeyen bir substrata karşı da enzim aktivitesinin değişmesine neden olur (69). PON1'in allel sıklıkları etnik gruplar arasında oldukça farklıdır. Örneğin, Kuzey Avrupa kökenli bireylerle karşılaştırıldığında İspanyol popülasyonunda R 192 alleli daha fazla görülmektedir (8).

2.7.3.12. Çeşitli Hastalıklarda Paraoksonaz1

Pek çok çalışmada tip 1 ve tip 2 diyabette PON1 aktivitesinin azaldığı bulunmuştur. Diyabetteki düşük serum PON1 aktivitesinin genotipten bağımsız olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. Bazı çalışmalarda, L 55 allelin retinopati ile ilişkili olduğu, R 192 allelin diyabetlilerdeki koroner kalp hastalığı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Diyabetteki azalmış PON1 aktivitesinin mekanizması açık değildir, ancak glukoz konsantrasyonundaki artışla ilişkili olabileceği bildirilmektedir. Ayrıca metabolik sendromu olan hastalarda da PON1 aktivitesinin azaldığı gözlenmiştir (50).

Oksidatif stres, demans gelişimi için bir risk faktörüdür. PON1 aktivitesinin vasküler demanslı ve Alzheimer hastalarında azaldığı bildirilmiştir. Ancak bunun artmış oksidasyonun bir sebebi ya da sonucu olup olmadığı bilinmemektedir.

Kronik renal yetmezlik, artmış oksidatif stresle ilişkilidir ve PON1 aktivitesi bu hastalarda daha düşük olarak bulunmuştur. Bir çalışmada böbrek transplantasyonundan sonra PON1 aktivitesi normal düzeylerine geri dönmüştür.

Karaciğer sirozu, kronik hepatit, HDL eksiklikleri ve anksiyete gibi bazı hastalıklarda da PON1 aktivitesinde değişiklikler görülmektedir (50).

2.8. MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ

2.8.1. Agaroz Jel Elektrophorezi

Elektrophorez tekniği, bir elektriksel alan içinde moleküllerin sahip oldukları net elektrik yüklerine göre farklı hareket etmeleri prensibine dayanır. Nükleik asit parçalarının tanımlaması, saflaştırılması ve ayrıştırılması için kullanılan en yaygın yöntemdir. DNA molekülleri genellikle agaroz ya da poliakrilamid jel içinde elektrophorez edilir. Elektrophorez aşamasında hazırlanan jellerin konsantrasyonları ayırma gücünü etkilemektedir. Jellerin içerisinde, DNA moleküllerinin girip hareket

ettiği mikroskobik porlar vardır. Jelin konsantrasyonu arttıkça porların çapı küçülürken, tam tersine konsantrasyon azaldıkça porların çapı artmaktadır. Ayırabildikleri DNA parçalarının uzunlukları 200 baz çifti (bp) ile 50 kilo baz gibi oldukça geniş aralıkta olabilmektedir. Agaroz konsantrasyonu %0.5-3.0 arasında değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Böylece küçük DNA parçaları için yüksek, büyük DNA parçaları için ise düşük agaroz konsantrasyonu kullanılarak DNA'nın jelde en uygun şekilde yürümesi sağlanır (70-72).

2.8.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kısaca *in vitro* koşullarda DNA'nın çoğaltılması işlemidir. Bu teknikte DNA çoğaltımının başlamasına olanak sağlayacak olan 3'OH grubunu sağlamak için iki oligonükleotit (primer) kullanılır. Primerler çoğaltmak istediğimiz gen bölgesinin başlangıç ve sondaki dizilerine komplementerdir. Reaksiyon kalıp DNA, DNA polimeraz I, primerler, deoksi-nükleotit trifosfat (dNTP)'lar ve enzimin optimum koşullarını sağlamak için eklenen kimyasalların oluşturduğu bir ortamda gerçekleştirilir. PZR üç temel adımdan oluşur. İlki, çift zincirli DNA'nın ısıtılarak (94°C) denatüre edilmesi (denatürasyon); ikinci aşama, sıcaklığın düşürülmesi ile (40–60°C) primerlerin tek zincir DNA üzerinde kendilerine komplementer olan bölgelere bağlanması (annealing); son olarak, hibritleşmeden sonra ısı dayanıklı bir DNA polimeraz (*taq* polimeraz) ile (72°C'de) yeni zincirin sentezlenmesi (extension) aşamalarıdır. Bu işlemler 20 ya da daha çok kez tekrarlanarak istenilen DNA bölgesi çoğaltılmış olur (~2ⁿ kopya). Bu artırılmış DNA bölgesi; daha sonra çeşitli amaçlara yönelik başka metotlar uygulanarak adli tıpta suçluları saptama, hastalıklara neden olan gen mutasyonlarının saptanması, patojen saptama, gen ekspresyonu çalışmaları, populasyon genetiği ve filogenetik analizlerde kullanılmaktadırlar (72).

2.8.3. Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Polimorfizmi

RFLP, restriksiyon endonükleazlar kullanılarak DNA'nın kesimine dayanır. Restriksiyon endonükleazlar 1968 yılında keşfedilmiş bakteri enzimleridir. Restriksiyon endonükleazlar DNA üzerindeki bazı özel dizileri tanır ve DNA'yı bu dizilerden keserler. Farklı bakteri suşlarından, farklı sayıda bazdan oluşan ve farklı tanıma dizisine sahip, farklı enzimler elde edilebilir. DNA üzerindeki restriksiyon tanıma dizilerinde oluşan herhangi bir nükleotid değişimi (TNPs, insersiyon/delesyon, translokasyon vb mutasyon çeşitleri) restriksiyon enziminin o bölgeyi tanıyamaması akabinde, kesimin gerçekleşmemesine yol açar. Bu bilgiye

dayanarak; aynı restriksiyon enzim kullanılarak farklı kaynaklı (farklı tür ya da birey vs.) DNA molekülleri sindirildiğinde, farklı uzunlukta DNA parçaları oluşabilir. RFLP sindirim ürünlerinin analizi genellikle agaroz ya da poliakrilamid jel elektroforezi ile yapılır. Sindirim ürünlerini jel elektroforezinde yürüttüğümüzde ise, bir sindirim profili (görüntüsü) oluşur. Jel profilinde oluşan farklılıklar bize, tanıma bölgelerindeki nükleotid polimorfizmlerinin varlığını belirtir. Bu yöntem bize dolaylı olarak nükleotid değişimi varlığını gösterir.

Jeldeki sindirim ürünlerini görüntülemek için birkaç teknik kullanılabilir. Eğer bir kuyucuğa düşen DNA miktarı 50ng'dan büyükse, etidyum bromür ile boyama her bir bandın açıkça görüntülenmesini sağlar. Gümüş boyama da benzer şekildedir, fakat daha küçük miktarda DNA'nın (<100pg) görüntülenmesi için çok daha hassas ve kullanışlıdır.

RFLP metodu kullanılarak, PZR ile çoğaltılmış belirli bir gen bölgesi, tanımlanmış özel mutasyonlara karşı uyumlu eşsiz bir restriksiyon enzimi ile taranabilir. Analiz edilen gen bölgesi, jel profilindeki bantların sayılarına, büyüklüklerine bakılarak genotiplenebilir ve lokusa ait genotip/allel sıklıkları saptanabilir (73, 74).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen (Proje no: TST-09-993) ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan (05.05.2009 tarih, 2005 toplantı sayılı, karar no: 09/207) bu çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya, Tıbbi Genetik, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Anabilim Dalları'nda yapıldı.

3.1. GEREÇ

Biyokimyasal Ölçümlerde Kullanılan Kimyasallar ve Gereçler:

Biyokimyasal ölçümlerde analitik saflıkta sigma marka kimyasal maddeler kullanıldı.

Çalışma esnasında saf su cihazları (MINIpure, EASYpure® RF. Barnstead), pHmetre (WTW pH330i/SET, Germany), hassas terazi (AND GR-200), santrifüj (nüve NF 400 R), buzdolabı (Arçelik), -40⁰C derin dondurucu(REVCO ULT 1740-5-V40) manyetik karıştırıcı (Labor-Brand Model L-81), ELISA okuyucu ve yıkayıcı (Tecan Sunrise), ELISA okuyucu (Bio-Tek, microquant), çeşitli ölçülerde otomatik pipetler (Socorex, Nichipet), balon jojeler, ependorf, polipropilen ve cam tüpler, beher, baget ve cam pipetler kullanıldı.

Kullanılan cam malzemeler ve polipropilen tüpler, %20 nitrik asit içinde 24 saat bekletildikten sonra, sırasıyla Tip 2 ve Tip 1 saf su ile 3 kez yıkanarak demineralize edildi (75). Ölçümlerde kullanılan çözeltiler Tip 1 saf su ile hazırlandı.

Genetik Analizlerde Kullanılan Kimyasallar:

Çalışmanın her aşamasında moleküler grade kalitesinde kimyasallar ve Tip 1 kalitesinde saf su kullanıldı.

- Agaroza (SeaKem, 50005)
- Borik asit (Carlo Erba, 302177)
- Bromfenol mavisi (Sigma, B-5525)
- EDTA (Qualikems, E035112)
- Etidium Bromid (Sigma, E7637)
- Xylene cyanoleff (Sigma, X-4126)
- Orange G, Sodium Salt (Amresco, E783-50 G)
- Glyserin (Sigma, G-7757)
- HCl (Sigma)
- Tris-base (Sigma)
- NlaIII Restriksiyon Enzim (Fermentas, ER1831)
- AlwI Restriksiyon Enzim (Fermentas, ER1322)
- dNTP karışımı (Fermentas)
- Moleküler Boyut Marker'ı (Fermentas)
- PZR tampon seti (Fermentas)
- Taq DNA Polimeraz (Fermentas)
- MagNa Pure LC DNA isolation Kit I (Roche, REF 03 003 990 001)
- Primerler (Metabion)

Genetik Analizlerde Kullanılan Cihazlar:

- Thermal cyclers (Corbett)
- Mikro 22 Hettich Mikrosantrifüj
- Thermo Electron Corporation EC 340 Maxicell, Primo Electrophoretic gel system
- Mikrodalga fırın, Arçelik MD 581
- Vilber Lourmat UV/Visible Spectrofotometre
- UVP EC3 Chemi HR 410 Imaging System (Cambridge, UK)
- MagNa-pure LC otomatik DNA RNA izolasyon sistemi (Roche)

3.2. ÇALIŞMA GRUBU

Hasta Grubu: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Polikliniği'ne başvuran ve primer hipotiroidi tanısı almış olan, yaş ortalaması 42.35 ± 11.21 yıl ve 63'ü kadın, 12'si erkek toplam 75 hasta bu tezin çalışma grubunu oluşturmaktadır. Hasta grubu tedavi almamış subklinik ve klinik hipotiroidili hastalardan oluşturuldu. TSH düzeyi yüksek (>4 mU/L) ve sT_3 , sT_4 'ü normal veya normalin alt sınırında olan hastalar subklinik, TSH yüksek (>10 mU/L) ve T_4 ve/veya T_3 değeri düşük olanlar

da klinik hipotiroidi olarak değerlendirildi. Anti-TPO ya da anti-TG düzeyleri pozitif olan hastalar Hashimoto tiroiditine bağlı hipotiroidi olarak değerlendirildi. Hashimoto tiroiditi olmayan grup ise postoperatif, radyoaktif iyot tedavisine bağlı ve idiopatik hipotiroidili hastalardan oluşmakta idi. Ayrıca hastalar NCEP ATPIII kriterlerine göre metabolik sendrom olanlar ve olmayanlar olarak iki gruba ayrıldı.

Kontrol Grubu

Herhangi bir sistemik hastalığı olmayan, herhangi bir nedenle ilaç kullanmayan, 18 yaş üstü sağlıklı, hipotiroidili hastaların yaş (40.62 ± 5.24) ve cinsiyet (40 kadın, 5 erkek) dağılımına benzer şekilde seçilen 45 gönüllü kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi.

Hastalar bu çalışma hakkında bilgilendirilmiş ve gönüllü olur formları alınmıştır.

Çalışma sırasında hastalardan ve kontrol grubunu oluşturan gönüllülerden sabah açlık kanları alındı. Yapılacak analizlere uygun şekilde, kan örnekleri EDTA'lı ve düz tüplerde toplandı.

Hasta ve kontrol gruplarından alınan venöz kan örnekleri, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi. Kontrol grubunda ayrılan serum örneklerinden bir kısmı ile rutin analizler yapıldı. Diğer serum ve plazma örnekleri alikotlara ayrılarak -40°C 'de saklandı. Hastalardan ve kontrol gruplarından EDTA'lı tüpe alınan periferik kanlardan genetik laboratuvarında, MagNa-pure LC cihazında MagNa Pure LC DNA isolation Kit I kullanılarak DNA izolasyonu otomatik olarak yapıldı. Elde edilen DNA örnekleri $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.3. YÖNTEM

Çalışma gruplarına ait örneklerde yapılan analizler

- Rutin analizler
- Biyokimyasal ölçümler
- Genetik çalışma

olmak üzere üç başlık altında toplandı.

3.3.1. Rutin Analizler

Çalışma gruplarından elde edilen serum örneklerinde glukoz, total kolesterol, trigliserid, HDL-K, LDL-K, sT_3 , sT_4 , TSH, anti-TPO, anti-TG ve CRP ölçümü yapıldı.

CRP, Dade Behring BN2 marka otoanalizörde nefelometrik yöntemle çalışıldı.

Glukoz, total kolesterol, trigliserid, HDL-K, LDL-K düzeyleri Olympus AU 640 otoanalizöründe uygun ticari kitler kullanılarak ölçüldü.

sT₃, sT₄, TSH, anti-TPO ve anti-TG ölçümleri Roche COBAS E601-A otoanalizöründe çalışıldı.

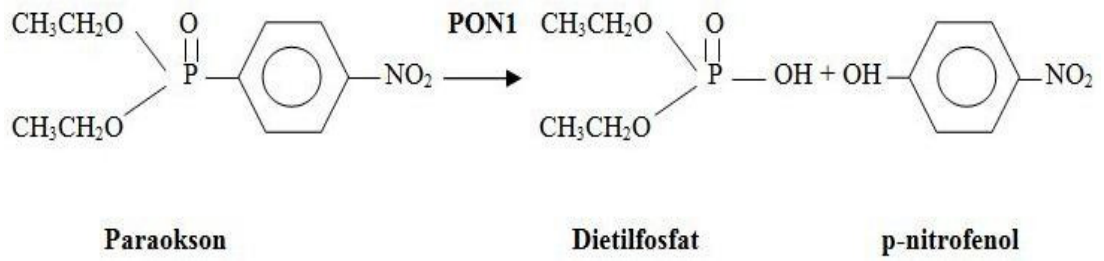
3.3.2. Biyokimyasal Ölçümler

Çalışma gününe kadar dondurularak saklanan serum örneklerinde PON1 aktivitesi, NO ve Hcy düzeyleri ölçüldü.

3.3.2.1. PON1 Aktivitesinin Ölçümü

Prensip

Paraoksonun, PON1 tarafından hidrolizi ile oluşan sarı renkli paranitrofenolün (PNP) neden olduğu absorbans artışının, 412 nm’de izlenmesi esasına dayanır (76).



Reaktifler

- Glisin tamponu: 50 mM, pH 10.5
- Paraokson: 1.0 mM olacak şekilde, metanolde hazırlandı.
- CaCl₂ (kalsiyum klorür): 1.0 mM olacak şekilde 50 ml (50 mM) glisin tamponunda hazırlandı.

Prosedür

Deney ortamında 50 mM glisin tamponu, 1.0 mM CaCl₂ ve 1.0 mM paraokson içerecek şekilde reaksiyon karışımı hazırlandı. PON1aktivitesi çalışma prosedürü Tablo 10’da verildi.

Tablo 10. PON1 Aktivitesi Çalışma Prosedürü

	Kör	Numune
Reaksiyon karışımı	200 µl	200 µl
Serum	-	7 µl
Tip 1 su	7 µl	-

Pipetleme işlemlerinden hemen sonra, 25°C’de ve 412 nm dalga boyunda, kör ve numunelerdeki optik dansite (OD) artışı, 5 dakika süreyle izlendi.

Hesaplama

Numune ve kör tüpleri için, $\Delta OD/dk$ değerleri hesaplandı. Numune $\Delta OD/dk$ değerlerinden kör değeri çıkarılarak, net $\Delta OD/dk$ değerleri bulundu.

Bir ünite PON1, standart deney şartlarında, dakikada 1 mikromol PNP oluşumunu katalizleyen enzim aktivitesi (U/L: mikromol PNP/dk/L) olarak tanımlandı.

PNP’nin molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon=16.9 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kullanılarak PON aktivitesi hesaplandı. Serum örneklerinde bazal PON1 aktivitesi U/L olarak verildi. PON1 aktivitesi için değişkenlik katsayısı değeri %2.5 olarak bulundu.

3.3.2.2. Nitrik Oksit Düzeyi Ölçümü

NO ölçümü, Cayman marka (Katalog No.780001) Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay kiti ile yapıldı.

Prensip

NO’nın yarı ömrü çok kısadır, saniyeler içinde ortamdaki oksijen ile reaksiyona girerek, nitrat ve nitrit iyonlarına dönüşür. Nitrit iyonlarının %95’i nitrata oksitlenir. NO ölçümü, son ürünler olan nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının iki basamakta ölçülmesi esasına dayanır. İlk basamakta, NADPH ve FAD varlığında, nitrat redüktaz kullanılarak, nitrat, nitrit formuna dönüştürülür. İkinci basamakta oluşan toplam nitrit, Griess reaksiyonuyla ölçülür. Griess reaksiyonu, nitritin primer bir aromatik amin (Sülfanilamid-Griess Reagent 1) ile diazotizasyonu ve N-(1-naftil) etilendiamin (NNED-Griess Reagent 2) ile mor renkli azo bileşikler oluşturması esasına dayanır. 540 nm’de oluşan rengin absorbansı ölçülür.

Reaktifler

- Çalışma tamponu: 1 mL çalışma tamponu 50 mL Tip 1 su ile dilüe edilerek hazırlandı.
- Nitrat Redüktaz: Liyofilize haldeki enzim, çalışma öncesi tampon ile dilüe edilerek hazırlandı. Çalışma süresince buz üzerinde tutuldu.
- Enzim Kofaktörleri: Liyofilize haldeki kofaktörler, çalışma öncesi tampon ile dilüe edilerek hazırlandı. Çalışma süresince buz üzerinde tutuldu.
- Nitrat Standardı: Liyofilize haldeki standart, çalışma tamponu ile uygun oranlarda dilüe edilerek; 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 μM konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı.
- Griess Reaktifi 1: Sülfanilamid

- Griess Reaktifi 2: NNED

Örnek Hazırlığı

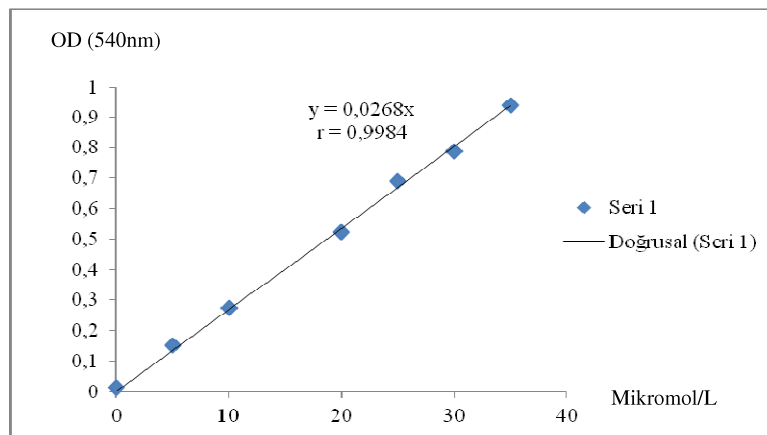
Serum örneklerine, çalışma öncesi, sartorius minisart marka (0,2 µm) filtrelerle ultrafiltrasyon işlemi uygulandı.

Çalışma Prosedürü

Çalışma prosedürü Tablo 11’da verilmiştir.

Tablo 11. NO Çalışma Prosedürü

	Kör	Numune	Standart
Çalışma tamponu	200 µL	40 µL	80 µL (belirtilen hacimlerde standart + çalışma tamponu)
Numune	-	40 µL	-
Enzim kofaktörü	-	10 µL	10 µL
Nitrat redüktaz	-	10 µL	10 µL
Oda ısısında 3 saat inkübasyona bırakıldı.			
Griess Reaktifi 1	-	50 µL	50 µL
Griess Reaktifi 2	-	50 µL	50 µL
Renk oluşumu için oda ısısında 10 dakika bekletilen numune ve standartların absorbansı, 540 nm’de köre karşı okundu.			



Şekil 6. NO Standart Grafiği

Şekil 6’da gösterilen NO standart grafiği yardımıyla, numunelerin vermiş olduğu absorbanslara göre konsantrasyonları hesaplandı. Kör değeri standart ve numunelerin absorbanslarından çıkarıldı. NO seviyeleri, µmol/L olarak verildi.

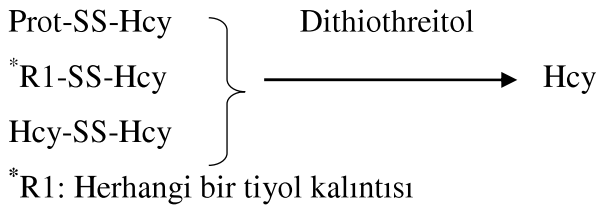
3.3.2.3. Homosistein Düzeyi Ölçümü

Axis-Shield marka Axis Homocysteine Enzim İmmun Assay (EIA) (REF FHCY100) kiti kullanılarak Hcy düzeyleri ölçüldü.

Prensip

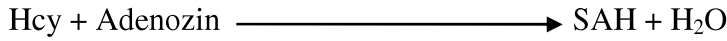
Protein bağlı Hcy, serbest Hcy’ye dönüştürülür ve ölçüm öncesi bir ayrıştırma prosedüründe S-adenozil-L-homosistein (SAH)’e enzimatik olarak çevrilir.

Örnekteki Hcy’nin protein bağlı ve karışık disülfid formları dithiothreitol kullanılarak serbest Hcy’ye dönüştürülür.



Örnekteki Hcy, SAH hidrolazın kullanımı ve adenozin ilavesi ile SAH’a çevrilir.

SAH-hidrolaz



Daha sonra, katı-faz enzim immünölçüm, örnekte bulunan SAH ve monoklonal anti-SAH antikorundaki bağlama bölgeleri ile plate’in duvarlarına bağlanmış immobilize SAH arasındaki yarışmaya dayandırılmıştır. Sonra bağlanmamış anti-SAH antikorları uzaklaştırılır, Horse radish peroxidase ile işaretlenmiş sekonder tavşan anti-mouse antikor eklenir. Peroksidaz aktivitesi substrat ilavesinden sonra spektrofotometrik olarak ölçülür ve absorbans örnekteki Hcy konsantrasyonu ile ters ilişkilidir.

Prosedür

Örnek ön işlem prosedürü

1. Örnek ön işlem solüsyonu, belirtildiği şekilde hazırlandı. 10 numune için belirtilen hacimler şu şekildedir; 4.5 mL Reagent A, 0.25 mL Reagent B, 0.25 mL Reagent C karıştırılır. Bu çalışmada, belirtilen miktarların 20 katı hesaplanarak hazırlandı.
2. Kalibratörler ve örnekler plastik ya da cam tüplerde şu şekilde dilüe edildi; 25 µL kalibratör/örnek + 500 µL örnek ön işlem solüsyonu karıştırılıp 37°C’de, 30 dakika parafilmle kapatılarak inkübe edildi.

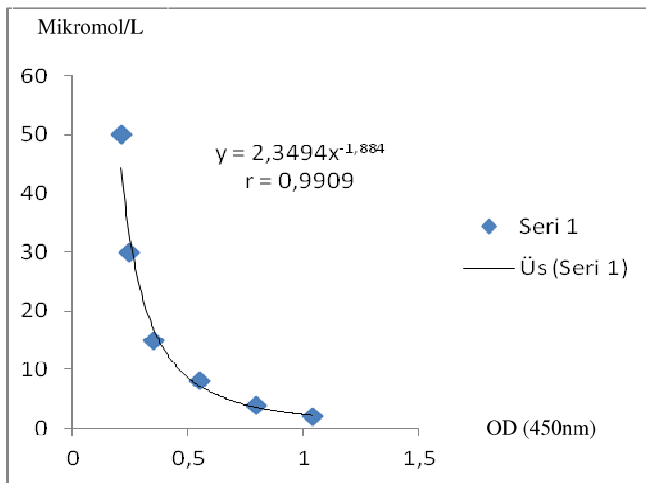
3. İnkübasyonu takiben 500 µL Reagent D ilave edildi. Karıştırılıp 18-25⁰C’de 15 dakika bekletildi.
4. Ardından 500 µL Reagent E ilave edildi. Karıştırılıp 18-25⁰C’de 5 dakika bekletildi.

Mikrotitre plate prosedürü

1. 25 µL dilüe edilmiş kalibratörler ve örnekler SAH kaplı kuyucuklara pipetlendi.
2. 200 µL Reagent F bütün kuyucuklara eklendi. 30 dakika 18-25⁰C’de inkübe edildi. Bütün inkübasyon aşamalarında plate’in kapağı kapatıldı.
3. Otomatik elisa yıkayıcıda 4 kez yıkama işlemi yapıldı.
4. 100 µL Reagent G bütün kuyucuklara eklendi. 20 dakika 18-25⁰C’de inkübe edildi.
5. Yıkama işlemi tekrar yapıldı.
6. 100 µL Reagent H bütün kuyucuklara eklendi. 10 dakika 18-25⁰C’de inkübe edildi.
7. 100 µL Reagent S bütün kuyucuklara eklendi.
8. Karıştırılıp 15 dakika içinde 450 nm’de absorbansı okundu.

Hesaplama

Şekil 10’da verilen kalibrasyon eğrisi çizilerek, bilinmeyen örneklerin konsantrasyonları hesaplandı. Hcy düzeyleri µmol/L olarak verildi.



Şekil 7. Hcy Standart Grafiği

3.3.3. Genetik çalışma

Hipotiroidili hastalarda ve kontrol grubunda izole edilen DNA'lardan, PON1 geninde 55 L/M ve 192 Q/R polimorfizmleri araştırıldı.

3.3.3.1. PZR Amplifikasyonu

Amplifikasyonda Kullanılacak Primerlerin Seçimi:

Kullanılacak primerler, yapılan literatür taraması sonucuna göre belirlendi (Tablo 12) (66). Belirlenen primerler sentezletirildi ve liyofilize halde gelen primerler 10 pmol/μL konsantrasyonda olacak şekilde distile su ile çözüldü.

Uygulanan PZR Protokolü:

PZR reaksiyonunda yer alan bütün bileşenler (PZR tamponu, dNTP, Primerler, Taq DNA Polimeraz) ve PZR siklus sıcaklık profilleri tek tek kontrol edilerek standardizasyonları yapıldı. Sonuçta PZR reaksiyonunda kullanılan karışım aşağıdaki miktar ve konsantrasyonlarda hazırlandı (Tablo 13).

Tablo 12. Kullanılan Primerler (66)

PON1 192 Q/R: (Fragman büyüklüğü: 99 bp)
Forward Primer; 5'-TAT TGT TGC TGT GGG ACC TGA G-3'
Revers Primer ; 5'-CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC-3'

PON1 55 L/M: (Fragman büyüklüğü: 170 bp)
Forward Primer; 5'-GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G-3'
Revers Primer ; 5'-TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC-3'

Tablo 13. 50 μL Hacim İçerisinde Gerçekleştirilen PZR Reaksiyonunda Kullanılan Maddeler ve Son Konsantrasyonları

Kullanılan Madde	Stok konsantrasyon	192 Q/R için eklenen miktar	55 L/M için eklenen miktar	Son konsantrasyon
Steril apirojen su		50 μL'e tamamlayacak kadar	50 μL'e tamamlayacak kadar	
PZR tamponu	10x	5 μL	5 μL	1x
MgCl ₂	25 mM	4 μL	4 μL	2.0 mM
dNTP karışımı	10 mM	1 μL	1 μL	200 μM
Primer 5'	10 pmol/ μL	5 μL	5 μL	50 pmol
Primer 3'	10 pmol/ μL	5 μL	5 μL	50 pmol
Taq DNA Polimeraz	10 U/μL	0.2 μL	0.2 μL	2 U
Kalıp DNA		5 μL	5 μL	

Thermal Cycler’da Tablo 14’te gösterilen PZR sıcaklık profili kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi.

Tablo 14. PZR Programı

95 ⁰ C	5 dakika	
95 ⁰ C	40 saniye	35 Çevrim
61 ⁰ C	1 dakika	
72 ⁰ C	1 dakika	
72 ⁰ C	10 dakika	

3.3.3.2. PZR Ürünlerinin Elektroforezde Değerlendirilmesi

Elektroforezde Kullanılan Solüsyonlar:

- Etidyum Bromid Stok Solüsyonu: (Moleküler analiz için 20 mg/mL konsantrasyonda) 200 mg etidyum bromid tartılarak 10 mL distile suda çözüldü.
- 10 x TBE (Agaroz Jel Elektforezi için, stok solüsyon): 108 gr Tris (0.04 M), 55 g Borik Asit, 40 mL 0.5 M EDTA (pH:8), hepsi karıştırılarak bir miktar suda çözdürüldü, sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı.
- 1 x TBE: 10 x TBE stok solüsyondan 1/10 oranında distile su ile dilüe edilerek hazırlandı.
- 0.5 M EDTA: 186.1 gr disodyum EDTA (2 sulu) tartılıp bir miktar suda çözdürüldü, pH’ı NaOH ile 8.0 olacak şekilde ayarlandı ve sonra distile su ile 1 litreye tamamlandı.
- Loading buffer (yükleme tamponu): 80 mg xylene cyanoleff, 40 mg bromfenol mavisi, 80 mg orange G, 20 mL gliserin, 20 mL TE (tris EDTA karışımı-pH:8.0)

Agaroz Jelin Hazırlanması ve DNA’nın Yüklenmesi

Elde edilen PZR ürünleri %2’lik agaroz jelde yürütüldü. Moleküler Biyoloji’de kullanılan agarozdan 3 gr tartılarak 150 mL 1xTBE tamponunda karıştırıldı. Bu karışım mikrodalga fırında eritildi. Daha sonra soğutuldu. Üzerine 5 µg/mL konsantrasyonlu Etidyum Bromid solüsyonundan 5 µL ilave edilip karıştırıldı. Önceden hazırlanmış elektroforez tankına taraklar yerleştirildi ve bu agaroz solüsyonu tanka döküldü, sertleşinceye kadar bekletildi. Üzerine 1xTBE tamponu eklendikten sonra taraklar çıkarıldı. 10 µL DNA ve 5 µL DNA yükleme tamponu

karıştırılarak jele yüklendi. Elektroforez 100 mV, 80 mA koşullarında 30-40 dakika arasında uygulandı.

Jeldeki DNA ultraviyolede, baz çift sayısı bilinen standart olarak kullanılan DNA boyut markeri ile karşılaştırılarak görüntülendi. PZR ürünü kontrol edildikten sonra restriksiyon enzimi ile muamele edildi.

3.3.3.3. Restriksiyon Enzimi Kesimi ile Polimorfizmlerin Saptanması

PZR ürünü saptanmış örneklerde restriksiyon enzimi kesimi yapıldı. 192 Q/R polimorfizmi için AlwI restriksiyon enzimi kullanıldı (66). Bu kesim 10 µL PZR örneğine uygulandı. 1 µL enzim kullanıldı. 37⁰C’de bir gece inkübe edilerek kesim yapıldı. %4’lük agaroz jelde;

QQ → 99 bp.

QR → 99 bp. + 66 bp. + 33 bp.

RR → 66 bp. + 33 bp.

görüntülendi.

55 L/M polimorfizmi için NlaIII restriksiyon enzimi kullanıldı (66). Bu kesim 17 µL PZR örneğine uygulandı. 1 µL enzim kullanıldı. 37⁰C’de bir gece inkübe edilerek kesim yapıldı. %4’lük agaroz jelde;

MM → 126 bp. + 44 bp.

ML → 170 bp. + 126 bp. + 44 bp.

LL → 170 bp.

görüntülendi.

Restriksiyon enzimi kesim yöntemi uygulanan PZR ürünlerinden 10 µL alınıp, 5 µL yükleme tamponu ekleyerek jele yükleme yapıldı. Elektroforeze tabi tutulduktan sonra ultraviyole transillüminatör’de belirlenen bp’ler değerlendirildi.

3.3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Veriler IBM SPSS Statistics 20 istatistik paket programında değerlendirildi. Tanımlayıcı istatistikler olarak normal dağılım gösteren sayısal değişkenler için aritmetik ortalama ± standart sapma; normal dağılım göstermeyen değişkenler için median (%25-%75.’ci persentil) olarak belirtildi. Her gruptaki katılımcı sayısı, tablolarda “n” olarak gösterildi. Kategorik değişkenler arasındaki karşılaştırmalar Ki-kare testinin exact yöntemi ile yapıldı. Normal dağılım gösteren sayısal değişkenler için gruplar arası karşılaştırmalar bağımsız iki örnek t testi ve tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Varyans analizi sonucu fark bulunması durumunda çoklu karşılaştırma testi olarak parametrik Tukey testi kullanıldı. . Normal dağılım

göstermeyen sayısal değişkenler için gruplar arası karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ve Kruskal Wallis Analizi ile yapıldı. Kruskal Wallis Analizi sonucu fark bulunması durumunda çoklu karşılaştırma testi olarak parametrik olmayan Tukey testi kullanıldı. Genel doğrusal modellere göre düzeltmeler yapıldı.

Sayısal değişkenler arasındaki ilişkiler Spearman Korelasyon Analizi ile incelendi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Hipotiroidili Hasta ve Kontrol Gruplarını Oluşturan Bireylerin Genel Özellikleri

Hasta ve kontrol gruplarına ait demografik veriler ve laboratuvar değerleri Tablo 15'te gösterildi.

Primer hipotiroidisi olan 75 hastada cinsiyet dağılımı, 63 kadın (%84) ve 12 erkek (%16) olarak bulundu. Hasta grubunun yaş ortalaması 42.3 ± 11.2 yıl olarak hesaplandı.

Kontrol grubundaki 45 sağlıklı kişinin 40'ı kadın (%88.9), 5'i erkek (%11.1) olarak bulundu. Kontrol grubunun yaş ortalaması 40.6 ± 5.2 yıl olarak bulundu.

Yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımları açısından hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak fark olmadığı belirlendi ($p > 0.05$).

Bel çevresi, vücut kütle indeksi (VKİ), sistolik kan basıncı (SKB), diyastolik kan basıncı (DKB), açlık kan şekeri (AKŞ), TSH ve Anti-TPO değerleri hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$).

Ayrıca hasta grubunda sigara içme alışkanlığı olan 9 kişi (%12), diyabeti olan 7 kişi (%9.3), hipertansiyonu olan 11 kişi (%14.7) tespit edildi. Kontrol grubunda ise bunların hiçbiri yoktu.

Hasta grubunda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında total kolesterol, trigliserid ve LDL-K düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulundu ($p < 0.05$). HDL-K düzeylerinde ise her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0.05$) (Tablo 16).

Tablo 15. Hipotiroidili Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik Verileri ve AKŞ, TSH ve Anti-TPO Değerleri

Parametre	Hasta (n=75)	Kontrol (n= 45)	p değeri
Yaş (yıl)	42.3±11.2	40.6±5.2	0.257
Cinsiyet			
Kadın	63 (%84)	40 (%88.9)	0.592
Erkek	12 (%16)	5 (%11.1)	
VKİ (kg/m ²)	29.3 (25.9-33.7)	24.9 (21.8-27.7)	<0.001
Bel çevresi (cm)	96.6±13.1	87.4±10.3	<0.001
Sigara içme alışkanlığı (≥5adet/gün)	9 (%12)	0 (%0)	0.026
Diyabet	7 (%9.3)	0 (%0)	0.044
Hipertansiyon	11 (%14.7)	0 (%0)	0.007
SKB (mmHg)	120 (110-130)	110 (100-120)	0.003
DKB (mmHg)	70 (60-80)	70 (60-70)	0.002
AKŞ (mg/dL)	94 (87-100)	82 (78.5-88.5)	<0.001
TSH (μU/mL)	28.8 (12.1-67.2)	1.6 (1.1-2.1)	<0.001
Anti-TPO (IU/mL)	415.5 (45.3-1300)	9.47 (5.9-17.3)	<0.001

Tablo 16. Hipotiroidili Hasta ve Kontrol Gruplarının Lipid profilleri, CRP, Hcy, NO Düzeyleri ve PON1 Aktivitelerinin Karşılaştırılması

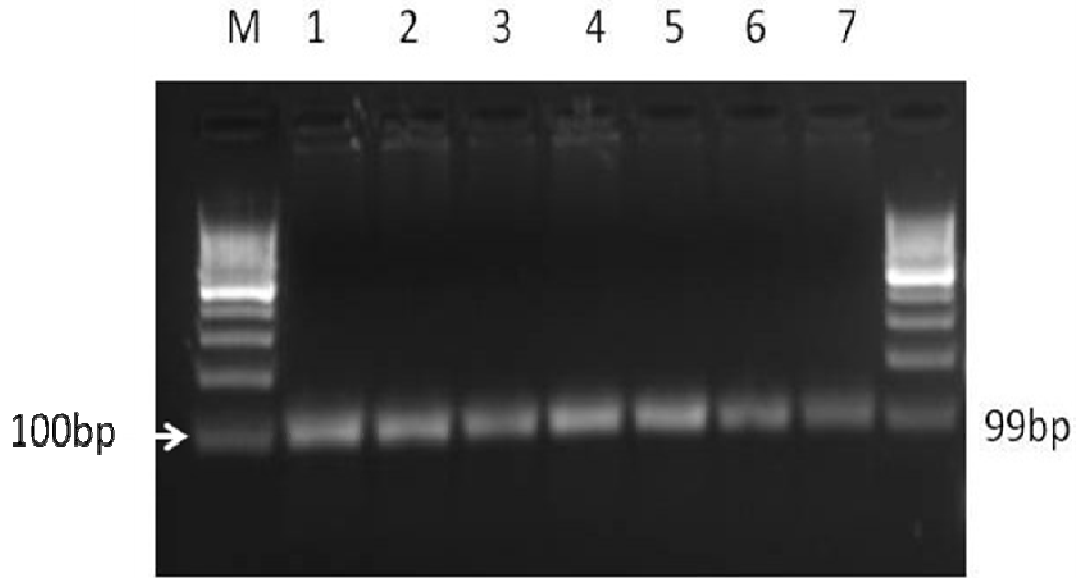
Parametre	Hasta (n=75)	Kontrol (n= 45)	p
Total Kolesterol (mg/dL)	228 (183-272)	171 (159-193.5)	<0.001
Trigliserid (mg/dL)	170 (108-224)	101 (74-130.5)	<0.001
HDL-K (mg/dL)	46 (39-53.2)	47 (42-59)	0.251
LDL-K (mg/dL)	144 (107-188)	100 (89-119.5)	<0.001
CRP (mg/L)	3.3 (3.3-4.2)	3.4 (3.2-3.4)	0.005
Hcy (μmol/L)	8.8 (6.4-12.6)	7.3 (5.3-8.9)	0.008
NO (μmol/L)	19.1 (14.4-23.1)	16.7 (11.1-20.9)	0.014
PON1 aktivitesi (U/L)	43.0 (23.4-76.9)	66.4 (32.0-91.1)	0.033

CRP, Hcy ve NO düzeylerine bakıldığında, hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek ($p<0.05$) bulundu (Tablo 16). PON1 aktivitesi hasta grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak düşük ($p<0.05$) bulundu (Tablo 16).

PON1 aktivitesi için hasta grubunda diyabet, sigara, hipertansiyon ve yaş için düzeltmeler yapıldıktan sonra, bunlardan bağımsız olarak düşük bulundu ($p=0.482$).

4.2. PZR ve RFLP ile Genotiplendirme Bulguları

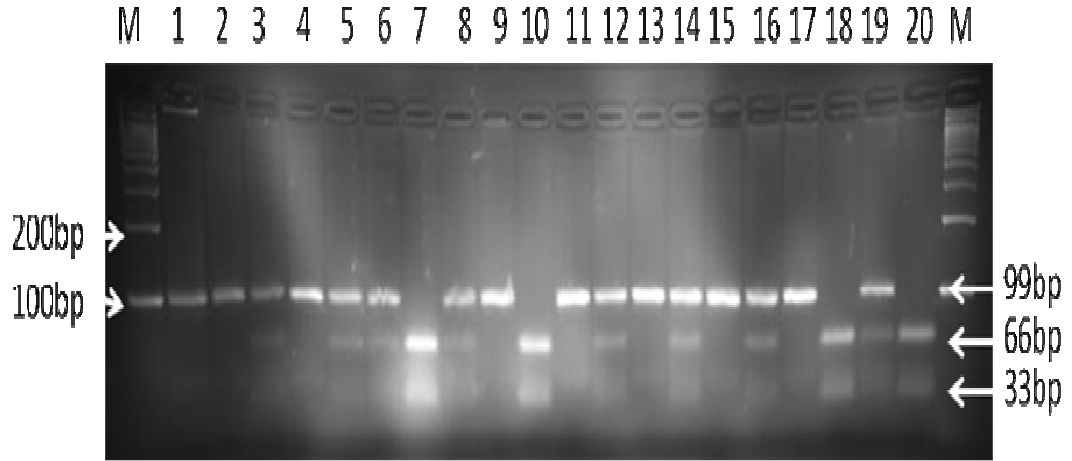
PON1 192 Q/R ve 55 L/M polimorfik bölgelerinin PZR ve RFLP sonucunda oluşan görüntüleri Şekil 8-11’de gösterilmiştir.



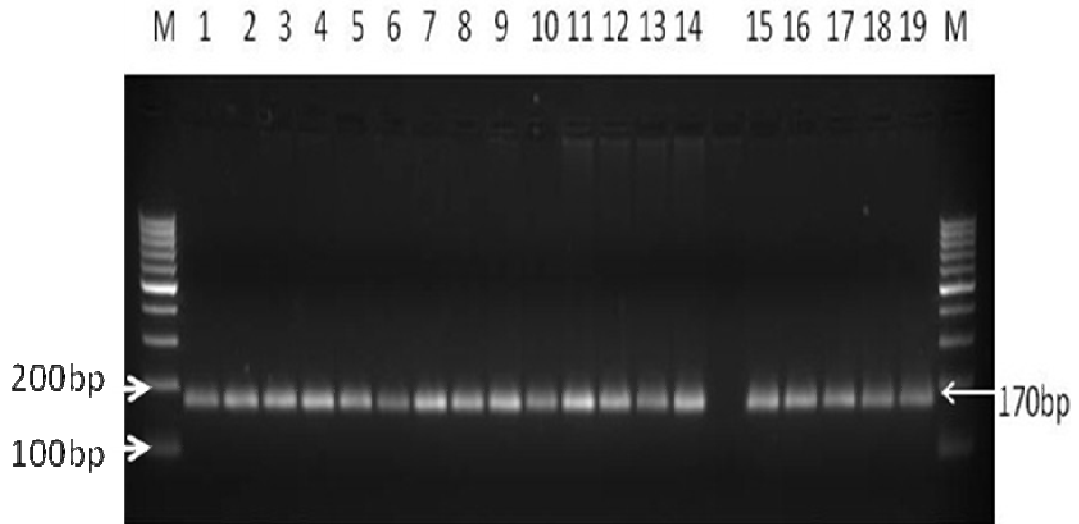
Şekil 8. PON1 Q/R 192 Polimorfik Bölgesine Spesifik Primerler Kullanılarak Elde Edilen PZR Ürününün, Etidyum Bromide ile Boyanmış %2’lik Agaroz Jelin Ultraviyole Transilluminatördeki Görüntüsü. M: DNA Boyut Markerı, 1-7. Sıralar: 99bp’lik PZR Ürünleri

4.3. PON1 Q/R 192 ve L/M 55 Genotip Dağılımı ile Q/R ve L/M Allel Sıklığının Hasta ve Kontrol Gruplarındaki Dağılımları

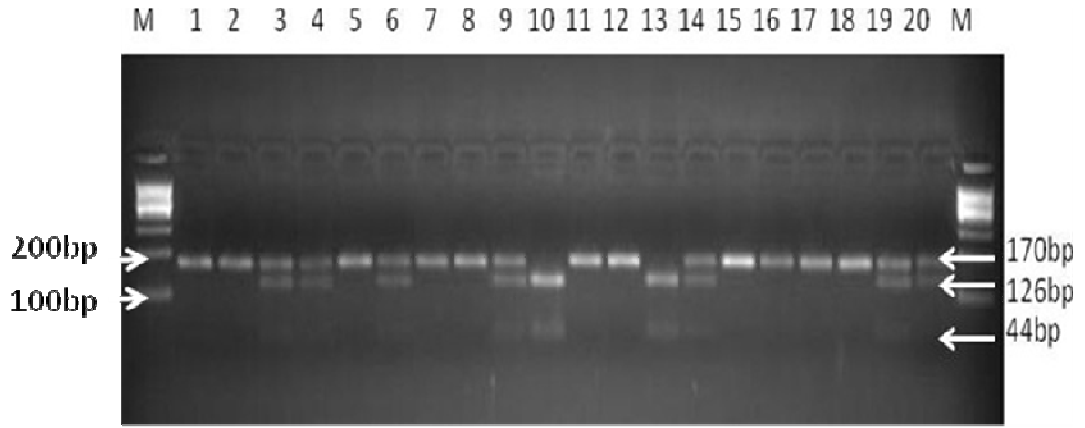
Kontrol grubundan bir kişinin DNA’sı çalışmadığı genetik analiz sonuçları 44 kişi üzerinden değerlendirilmiştir.



Şekil 9. PON1 Q/R 192 Polimorfik Bölgesine Spesifik Primerler Kullanılarak Elde Edilen PZR Ürününün AlwI Restriksiyon Enzimi ile Kesimi Sonrası Etidyum Bromide ile Boyanmış %4'lük Agaroz Jelin Ultraviyole Transilluminatördeki Görüntüsü. M: DNA Boyut Markerı, 1-2-4-9-11-13-15-17. Sıralar: 99bp'lik AlwI Enziminin Kesim Noktası İçermeyen (Q/Q 192 homozigot bireyler) Örnekler, 3-5-6-8-12-14-16-19. Sıralar: AlwI Restriksiyon Enziminin Kısmen Kestiği (Q/R heterozigot bireyler) Örnekler, 7-10-18-20. Sıralar: Alw I Restriksiyon Enziminin Tamamen Kestiği (R/R homozigot bireyler) Örnekler



Şekil 10. PON1 L/M 55 Polimorfik Bölgesine Spesifik Primerler Kullanılarak Elde Edilen PZR Ürününün Etidyum Bromide ile Boyanmış %2'lik Agaroz Jelin Ultraviyole Transilluminatördeki Görüntüsü. M: DNA Boyut Markerı, 1-19. Sıralar: 170 bp'lik PZR Ürünleri



Şekil 11. PON1 L/M 55 Polimorfik Bölgesine Spesifik Primerler Kullanılarak Elde Edilen PZR Ürününün NlaIII Restriksiyon Enzimi ile Kesimi Sonrası Etidyum Bromide ile Boyanmış %4'lük Agaroz Jelin Ultraviyole Transilluminatördeki Görüntüsü. M: DNA Boyut Markerı, 1-2-4-5-7-8-11-12-15-16-17-18. Sıralar: 170bp'lik NlaIII Enziminin Kesim Noktası İçermeyen (L/L 55 homozigot bireyler) Örnekler, 3-4-6-9-14-19-20. Sıralar: NlaIII Enziminin Kısmen Kestiği (L/M heterozigot bireyler) Örnekler, 10-13. Sıralar: NlaIII Restriksiyon Enziminin Tamamen Kestiği (M/M homozigot bireyler) Örnekler

4.3.1. PON1 Q/R 192 Genotip Dağılımı ve Q/R Allel Sıklığı

Hipotiroidili hastaların ve kontrol grubunun PON1 Q/R 192 genotip dağılımı ile Q ve R allel sıklığı Tablo 17'de gösterilmiştir. Hipotiroidili hasta grubunda QQ, QR ve RR genotip sıklığı sırası ile % 50.7, % 38.7 ve % 10.7 iken kontrol grubunda bu oranlar sırası ile % 36.4, % 50 ve %13.6 olarak bulundu. Hasta grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında QQ genotipi daha sık ve QR genotipi daha az görüldü ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Hasta grubunda Q alleli % 70, R alleli %30 oranlarında bulunurken kontrol grubunda Q alleli %61, M alleli %39 oranlarında bulundu. Her iki grupta en sık bulunan allel Q alleli olup Q ve R allel sıklığı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Q ve R allel sıklıklarının ods oranı (OR), OR 1.49 (0.85-2.55) olarak bulundu.

4.3.2. PON1 L/M 55 Genotip Dağılımı ve L/M Allel Sıklığı

Hipotiroidili hastaların ve kontrol grubunun PON1 L/M 55 genotip dağılımı ile L ve M allel sıklığı Tablo 17'de gösterilmiştir. Hipotiroidili hasta grubunda LL, LM ve MM genotip sıklığı sırası ile % 50.7, % 33.3 ve % 16 iken kontrol grubunda bu oranlar sırası ile %56.8, %36.4 ve %6.8 olarak bulundu.

Tablo 17. Hasta ve Kontrol Gruplarında PON1 Q/R 192 ve L/M 55 Genotip Dağılımı ve Q/R ve L/M Allel Sıklığı

	Hasta (n=75)	Kontrol (n=44)	p
Q/R 192			
QQ	38 (%50.7)	16 (%36.4)	0.338
QR	29 (%38.7)	22 (%50)	
RR	8 (%10.7)	6 (%13.6)	
Allel Sıklığı			
Q	0.7	0.61	0.172
R	0.3	0.39	OR 1.49 (0.85-2.55)
L/M 55			
LL	38 (%50.7)	25 (%56.8)	0.355
LM	25 (%33.3)	16 (%36.4)	
MM	12 (%16)	3 (%6.8)	
Allel Sıklığı			
L	0.67	0.72	0.397
M	0.33	0.28	OR 0.781 (0.44-1.385)

Her iki grupta da en sık görülen genotip LL genotipi olup kontrol grubunda hasta grubuna göre daha fazla görüldü ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Hasta grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında MM genotipi daha sık görüldü ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Hasta grubunda L alleli % 67, M alleli %33 oranlarında bulunurken kontrol grubunda L alleli %72, M alleli %28 oranında bulundu. Her iki grupta en sık bulunan allel L alleli olup L ve M allel sıklığı bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$). L ve M allel sıklıklarının ods oranı (OR), OR 0.781(0.44-1.385) olarak bulundu.

4.4. Hasta ve Kontrol Gruplarında PON1 Aktivitesi, Hcy, NO, CRP Düzeyleri, Cinsiyet ve Lipid Profillerinin PON1 Q/R 192 Genotiplerine Göre Dağılımları

Hipotiroidili hasta ve kontrol gruplarındaki PON1 aktivitesi, Hcy, NO, CRP düzeyleri, cinsiyet ve lipid profillerinin PON1 Q/R 192 genotiplerine göre dağılımları Tablo 18-19’da verilmiştir.

Serum PON1 aktiviteleri; hasta ve kontrol grubunda, sırası ile QQ genotipinde 23.4 (18.5-29.3) ve 26.2 (22.4-34.1) U/L, QR genotipinde 64.3 (55.2-84.0) ve 78.3 (65.0-93.0) U/L, RR genotipinde 90.8 (76.1-98.1) ve 119.3 (89.2-137.8) U/L olarak

bulundu. Hasta ve kontrol grubunun her ikisinde de QR ve RR genotiplerindeki bireylerin serum PON1 aktiviteleri QQ genotipindeki bireylerin PON1 aktivitesine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). RR genotipine sahip hasta ve kontrollerde PON1 aktivitesi QR genotipine göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$).

Serum NO düzeyleri; hasta ve kontrol grubunda, sırası ile QQ genotipinde 17.9 (12.9-21.7) ve 18.8 (14.7-23.2) $\mu\text{mol/L}$, QR genotipinde 21.8 (16.3-26.9) ve 12.8 (10.1-18.2) $\mu\text{mol/L}$, RR genotipinde 18.4 (15.9-21.2) ve 17.3 (11.7-19.3) $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. Hasta grubunda genotipler arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Kontrol grubunda QQ genotipine sahip bireylerin NO düzeyi QR genotipine sahip bireylerden anlamlı olarak daha yüksek bulundu ($p<0.05$). Diğer genotipler arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$).

Hasta ve kontrol gruplarında Hcy, CRP, total kolesterol, trigliserid, HDL, LDL düzeyleri ve cinsiyet açısından genotip dağılımları arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 18. Hasta Grubunda PON1 Aktivitesi, Hcy, NO, CRP Düzeyleri, Cinsiyet ve Lipid Profillerinin PON1 Q/R 192 Genotiplerine Göre Dağılımı

	Hasta Grubu (n=75)			p
Q/R 192	QQ (n=38)	QR (n=29)	RR (n=8)	
PON1 (U/L)	23.4 (18.5-29.3) ^a	64.3 (55.2-84.0) ^b	90.8 (76.1-98.1) ^b	<0.001
NO ($\mu\text{mol/L}$)	17.9 (12.9-21.7)	21.8 (16.3-26.9)	18.4 (15.9-21.2)	0.115
Hcy ($\mu\text{mol/L}$)	9.2 (6.4-12.2)	7.7 (6.5-12.6)	9.3 (4.8-12.3)	0.973
CRP (mg/L)	3.3 (3.3-4.2)	3.3 (3.3-4.8)	3.3 (3.3-3.4)	0.7
Total kolesterol (mg/dL)	240.7 $\pm$ 56.7	223.1 $\pm$ 56.2	234 $\pm$ 64.7	0.464
Trigliserid (mg/L)	165.5 (101-215)	187 (124.7-229.5)	135.5 (94-161.5)	0.215
HDL-K (mg/L)	46 (41-54)	45 (36.7-53.0)	42 (39.5-54.5)	0.575
LDL-K (mg/L)	153.0 $\pm$ 45.3	140.4 $\pm$ 57.8	157.3 $\pm$ 58.4	0.547
Kadın	32 (%84.2)	24 (%82.8)	7 (%87.5)	0.999
Erkek	6(%15.8)	5 (%17.2)	1 (%12.5)	

^{a,b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

Tablo 19. Kontrol Grubunda PON1 Aktivitesi, Hcy, NO, CRP Düzeyleri, Cinsiyet ve Lipid Profillerinin PON1 Q/R 192 Genotiplerine Göre Dağılımı

	Kontrol Grubu (n=44)			p
Q/R 192	QQ (n=16)	QR (n=22)	RR (n=6)	
PON1 (U/L)	26.2 (22.4-34.1) ^a	78.3 (65.0-93.0) ^b	119.3 (89.2-137.8) ^b	<0.001
NO (μmol/L)	18.8 (14.7-23.2) ^a	12.8 (10.1-18.2) ^b	17.3 (11.7-19.3) ^{ab}	0.048
Hcy (μmol/L)	7.6 ± 2.5	7.3 ± 2.3	5.5 ± 1.3	0.169
CRP (mg/L)	3.3 (3.2-3.4)	3.3 (3.2-3.4)	3.4 (3.2-3.4)	0.795
Total kolesterol (mg/dL)	170.6 ± 23.8	176.0 ± 25.9	175.5 ± 27.3	0.805
Trigliserid (mg/L)	109.0 ± 47.7	106.5 ± 48.6	104.5 ± 46.7	0.977
HDL-K (mg/L)	49.3 ± 15.0	48.5 ± 10.1	51.5 ± 6.4	0.860
LDL-K (mg/L)	101.1 ± 17.3	105.8 ± 24.1	102.8 ± 23.0	0.802
Kadın	14 (%87.5)	20 (%90.9)	5 (%83.3)	0,999
Erkek	2 (%12.5)	2 (%9.1)	1 (%16.7)	

^{a,b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

Hasta ve kontrol gruplarında QQ, QR ve RR genotipine sahip olan bireylerin PON1 aktivitelerini karşılaştırdığımız zaman istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (p>0.05) (Tablo 20).

Tablo 20. Hasta ve Kontrol Grubunda PON1 Aktivitesi İle PON1 192 Q/R Polimorfizmleri Arasındaki İlişki

	Hasta/Kontrol QQ	p	Hasta/Kontrol QR	p	Hasta/Kontrol RR	p
PON1 (U/L)	23.4 (18.5-29.3)/ 26.2 (22.4-34.1)	0.185	64.3 (55.2-84.0)/ 78.3 (65.0-93.0)	0.309	90.8 (76.1-98.1)/ 119.3 (89.2-137.8)	0.108

4.5. Hasta ve Kontrol Gruplarında PON1 Aktivitesi, Hcy, NO, CRP Düzeyleri, Cinsiyet ve Lipid Profillerinin PON1 L/M 55 Genotiplerine Göre Dağılımları

Hipotiroidili hasta ve kontrol gruplarındaki PON1 aktivitesi, Hcy, NO, CRP düzeyleri, cinsiyet ve lipid profillerinin PON1 L/M 55 genotiplerine göre dağılımları Tablo 21-22’de verilmiştir.

Serum PON1 aktiviteleri; hasta ve kontrol grubunda, sırası ile LL genotipinde 61.5 (36.3-90.2) ve 69.3 ± 37.7 U/L, LM genotipinde 39.8 (23.1-64.6) ve 61.5 ± 31.6 U/L, MM genotipinde 21.7 (16.8-23.4) ve 33.4 ± 10.4 U/L olarak bulundu. Hasta grubunda LL genotipine sahip bireylerin serum PON1 aktiviteleri MM genotipindeki bireylerin PON1 aktivitesine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu(p<0.05). LL genotipindeki bireylerin serum PON1 aktiviteleri LM genotipindeki bireylerin PON1 aktivitesine göre yüksek fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. LM genotipine sahip bireylerin serum PON1 aktiviteleri MM genotipindeki bireylerin PON1 aktivitesine göre daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak fark bulunmadı (p>0.05).

Kontrol grubunda LL ve LM genotipine sahip bireylerin PON1 aktivitesi MM genotipine sahip bireylerden daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak fark bulunmadı (p>0.05).

Tablo 21. Hasta Grubunda PON1 Aktivitesi, Hcy, NO, CRP Düzeyleri Cinsiyet ve Lipid Profillerinin PON1 L/M 55 Genotiplerine Göre Dağılımı

	Hasta Grubu (n=75)			p
L/M 55	LL (n=38)	LM (n=25)	MM (n=12)	
PON1 (U/L)	61.5 (36.3-90.2) ^a	39.8 (23.1-64.6) ^{ab}	21.7 (16.8-23.4) ^b	<0.001
NO (µmol/L)	20.2 ± 7.3	19.6 ± 6.5	20.2 ± 7.5	0.938
Hcy (µmol/L)	7.9 (6.4-12.6)	8.9 (6.6-12.9)	8.5 (6.0-11.5)	0.973
CRP (mg/L)	3.3 (3.3-4.1)	3.3 (3.3-4.3)	3.3 (3.3-7.2)	0.52
Total kolesterol (mg/dL)	239.4 ± 63.6	221.6 ± 42.0	237.8 ± 65.0	0.464
Trigliserid (mg/dL)	158.5 (106-211)	170 (114.5-216.7)	220 (101.5-288)	0.485
HDL-K (mg/dL)	47 (41-58)	43 (37.7-46.7)	43.5 (35-51.5)	0.102
LDL-K (mg/dL)	148 (98-203)	137 (113.5-171.5)	138.5 (97.5-187.5)	0.56
Kadın	32(%84.2)	22 (%88)	9 (%75)	0.577
Erkek	6 (%15.8)	3 (%12)	3 (%25)	

Tablo 22. Kontrol Grubunda PON1 Aktivitesi, Hcy, NO, CRP Düzeyleri Cinsiyet ve Lipid Profillerinin PON1 L/M 55 Genotiplerine Göre Dağılımı

	Kontrol Grubu (n=44)			p
L/M 55	LL (n=25)	LM (n=16)	MM (n=3)	
PON1 (U/L)	68.9 (38.1-82.5)	70.6 (24.3-93.3)	31.4 (27.8-38.1)	0.235
NO (μmol/L)	17.3 (11.6-20.9)	13.3 (10.6-18.9)	14.4 (11.6-20.4)	0.716
Hcy (μmol/L)	7.2 ± 2.2	6.9 ± 2.7	8.4 ± 1.4	0.578
CRP (mg/L)	3.4 (3.2-3.4)	3.2 (3.2-3.4)	3.4 (3.4-3.4)	0.403
Total kolesterol (mg/dL)	173.0 ± 22.6	174.8 ± 30.3	177.6 ± 15.6	0.944
Trigliserid (mg/L)	97.0 (72.0-127.5)	94.5 (73.5-120.0)	119.0 (119.0-149.7)	0.249
HDL-K (mg/L)	46.0 (43.0-56.0)	49.0 (42.5-61.5)	37.0 (34.0-45.2)	0.290
LDL-K (mg/L)	103.3 ± 19.0	102.8 ± 25.6	111.6 ± 20.0	0.804
Kadın	23 (92)	13 (%81.3)	3 (%100)	0.559
Erkek	2 (%8)	3 (%18.7)	0 (%0)	

Hasta ve kontrol grubunun ikisinde de NO, Hcy, CRP, total kolesterol, trigliserid, HDL-K ve LDL-K düzeyleri ile cinsiyet dağılımları açısından L/M genotipleri arasında bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Hasta ve kontrol gruplarında LL ve LM genotipine sahip olan bireylerin PON1 aktivitelerini karşılaştırdığımız zaman istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). MM genotipine sahip olan bireylerde ise hasta grubunun PON1 aktivitesi kontrol grubundan anlamlı olarak düşük ($p<0.05$) bulundu (Tablo 23).

Tablo 23. Hasta ve Kontrol Grubunda PON1 Aktivitesi ile PON1 55 LM Polimorfizmleri Arasındaki İlişki

	Hasta/Kontrol LL	p	Hasta/Kontrol LM	p	Hasta/Kontrol MM	p
PON1 (U/L)	61.5 (36.3-90.2)/ 68.9 (38.1-82.5)	0.731	39.8 (23.1-64.6)/ 70.6 (24.3-93.3)	0.101	21.7 (16.8-23.4)/ 31.4 (27.8-38.1)	0.048

4.6. Hasta Grubunda Hipertansiyon ve Diyabet'e Göre PON1 Q/R 192 ve L/M 55 Genotiplerinin Dağılımı

Hasta grubundaki tansiyon ve diyabete göre PON1 Q/R 192 ve L/M 55 genotiplerinin dağılımları Tablo 24 ve Tablo 25'te gösterilmiştir.

4.6.1. PON1 Q/R 192 Genotip Dağılımı

Hipertansif hastalarda QQ genotipi, normotansif hastalarda QR genotipi biraz daha sık görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Diyabeti olan hastalarda QQ ve QR genotipleri daha sık, diyabeti olmayan hastalarda da RR genotipi daha sık görülmesine rağmen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 24. Hasta Grubunda Tansiyon ve Diyabet'e Göre PON1 Q/R 192 Genotip Dağılımı

Durum	192 QQ	192 QR	192 RR	p
Hipertansif (n=11)	6 (%54.5)	4 (%36.4)	1 (%9.1)	1.00
Normotansif (n=64)	32 (%50)	25 (%39.1)	7 (%10.9)	
Diyabetik (n=7)	4 (%57.1)	3 (%42.9)	0 (%0)	0.755
Diyabetik olmayan (n=68)	34 (%50)	26 (%38.2)	8 (%11.8)	

4.6.2. PON1 L/M 55 Genotip Dağılımı

Hipertansif hastalarda LM ve MM genotipi, normotansif hastalarda LL genotipi biraz daha sık görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Diyabeti olan hastalarda MM genotipi daha sık, diyabeti olmayan hastalarda da LL ve LM genotipleri daha sık görülmesine rağmen bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 25. Hasta Grubunda Tansiyon ve Diyabet'e PON1 55 L/M Genotiplerinin Dağılımı

Durum	55 LL	55 LM	55 MM	p
Hipertansif (n=11)	5 (%45.5)	4 (%36.4)	2 (%18.2)	1.00
Normotansif (n=64)	33 (%51.6)	21 (%32.8)	10 (%15.6)	
Diyabetik (n=7)	3 (%42.9)	2 (%28.6)	2 (28.6)	0.749
Diyabetik olmayan (n=68)	35 (%51.5)	23 (%33.8)	10 (%14.7)	

Hasta grubunda hipertansiyonu olanlarla olmayanları CRP, Hcy ve NO düzeyleri açısından karşılaştırdığımızda anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Diyabeti olan hastalarda CRP, ve Hcy düzeyleri açısından fark bulunmazken ($p>0.05$), NO düzeyi anlamlı olarak yüksek ($p<0.05$) bulundu (Tablo 26).

Tablo 26. Hasta Grubunda Diyabeti Olan ve Olmayanlarda CRP, Hcy ve NO Düzeylerinin Karşılaştırılması

	DM var (n=7)	DM yok (n=68)	p
CRP (mg/L)	3.3 (3.3-4.5)	3.3 (3.3-4.2)	0.801
Hcy (μ mol/L)	10.2 (5.5-13.4)	8.2 (6.4-12.5)	0.702
NO (μ mol/L)	25.5 (20-30.5)	18.0 (14.0-22.6)	0.012

4.7. PON1 L/M 55 ve Q/R 192 Genotip Dağılımlarının Hipotiroidi Etiyolojisine Göre Değerlendirilmesi

Hipotiroidili hastalar etiyolojilerine göre Hashimoto ve diğerleri olarak iki alt gruba ayrılıp kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; PON1 55 L/M ve PON1 192 Q/R genotip dağılımları açısından istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 27).

4.8. PON1 L/M 55 ve Q/R 192 Genotip Dağılımlarının Metabolik Sendrom'a Göre Değerlendirilmesi

Hasta grubu metabolik sendrom varlığına göre iki alt gruba ayrılıp, kontrol grubunda metabolik sendromu olmayanlarla karşılaştırıldığında ise; PON1 55 L/M ve PON1

192 Q/R genotip dağılımları açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 28).

Tablo 27. Hipotiroidi Etiyolojisine Göre PON1 L/M 55 ve Q/R 192 Genotiplerinin Dağılımı

	Hashimoto (n=59)	Diğerleri (n=16)	Kontrol (n=44)	p
PON1 55				
LL	29 (%49.2)	9 (%56.3)	25 (%56.8)	0.61
LM	21 (%35.6)	4 (%25)	16 (%36.4)	
MM	9 (%15.3)	3 (%18.8)	3 (%6.8)	
PON1 192				
QQ	30 (%50.8)	8 (%50)	16 (%36.4)	0.678
QR	23 (%39)	6 (%37.5)	22 (%50)	
RR	6 (%10.2)	2 (%12.5)	6 (%13.6)	

Tablo 28. Metabolik Sendromu Olan ve Olmayan Hasta Grubu ile Metabolik Sendromu Olmayan Kontrol Grubunda PON1 L/M 55 ve Q/R 192 Genotip Dağılımları

Hasta grubu			Kontrol grubu	p
	MS olanlar (n=35)	MS olmayanlar (n=40)	MS olmayanlar (n=42)	
PON1 55				
LL	15 (%42.9)	23 (%57.5)	24 (%57.1)	0.447
LM	13 (%37.1)	12 (%30)	15 (%35.7)	
MM	7 (%20)	5 (%12.5)	3 (%7.1)	
PON1 192				
QQ	18 (%51.4)	20 (%50)	16 (%38.1)	0.731
QR	14 (%40)	15 (%37.5)	21 (%50)	
RR	3 (%8.6)	5 (%12.5)	5 (%11.9)	

Ayrıca metabolik sendromu olan ve olmayan hastalar ile kontrol grubunda metabolik sendromu olmayanlar arasında PON1 aktivitesi açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

4.9. Hipotiroidi Etiyolojisine Göre Hasta Grubu İle Kontrol Grubunda PON1 Aktivitesi, Hcy, NO ve CRP Düzeylerinin Karşılaştırılması

Etiyolojiye göre hasta grubu ile kontrol grubunu karşılaştırdığımızda; PON1 aktivitesi her iki hasta grubunda da kontrollere göre daha düşük olmasına rağmen üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). NO düzeyleri incelendiğinde; Hashimoto olan grupta kontrole göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$), diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$). Hcy düzeyleri; Hashimoto olan grupta kontrole göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$), diğer gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0.05$). CRP düzeylerinde hashimoto olmayan hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$), diğer gruplar arasında farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 29. Hipotiroidi Etiyolojisine Göre Hasta Grubu ile Kontrol Grubunda PON1 Aktivitesi, Hcy, NO ve CRP Düzeylerinin Karşılaştırılması

	Hashimoto (n=59)	Diğerleri (n=16)	Kontrol (n=45)	p
PON1 (U/L)	47.2 (23.5-76.3)	35.6 (21.8-71.0)	66.4 (32.0-91.1)	0.079
NO ($\mu\text{mol/L}$)	19.8 (15.3-23.7) ^a	15.8 (13.2-19.4) ^{ab}	16.7 (11.1-20.9) ^b	0.01
Homosistein ($\mu\text{mol/L}$)	8.9 (6.2-12.2) ^a	8.5 (7.0-13.2) ^{ab}	7.3 (5.3-8.9) ^b	0.026
CRP (mg/L)	3.3 (3.3-3.9) ^{ab}	3.7 (3.3-7.3) ^a	3.4(3.2-3.4) ^b	0.009

^{a,b}: Aynı harflerin yer aldığı gruplarda fark bulunmamaktadır.

Yapılan Spearman's korelasyon analizinde kontrol grubunda PON1 aktivitesi ile NO düzeyleri arasında negatif korelasyon ($\rho=-.382$, $p=0.01$) bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Hipotiroidizm genel popülasyonda sık görülen metabolik bir bozukluktur. Hastalık kadınlarda daha yaygındır ve yaşla birlikte görülme sıklığının arttığı bildirilmiştir (77). Bu çalışmada da literatürle uyumlu olarak hipotiroidili hastaların %84'ünü kadınlar oluşturmuştur.

Hipotiroidizm aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklar için artmış bir risk taşımaktadır. Ancak hipotiroidiye bağlı aterosklerozun patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır (78). Bunun için çok çeşitli faktörler suçlanmaktadır.

Hipotiroidili hastalarda ateroskleroza zemin hazırlayan bir lipid profili bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda total kolesterol, LDL-K, HDL-K ve trigliserid düzeylerinin yüksek (79, 80) olduğu bildirildiği gibi, bazı çalışmalarda ise HDL-K ve trigliserid düzeylerinde fark olmadığı bildirilmiştir (81). Total kolesterol ve LDL-K düzeylerindeki artışın, LDL-K ve IDL-K'nın azalmış katabolizması ile sonuçlanan LDL reseptör aktivitesindeki azalmadan kaynaklanabileceği belirtilmektedir (82, 83). Azalmış lipoprotein lipaz aktivitesinin, trigliseritten zengin lipoproteinlerin klirensini azaltacağı için, trigliserid düzeylerinin artmasına sebep olabileceği bildirilmiştir (79). Hipotiroidizmde özellikle hepatik lipazın ve CETP'nin düşük aktivitesi, kolesterol esterlerinin HDL₂'den VLDL, IDL ve HDL₃'e transportunda azalmaya yol açıp, artmış HDL kolesterol düzeyleri ile sonuçlanabileceği belirtilmiştir (84, 80). Literatürde trigliserid ve HDL-K düzeylerinde farklı sonuçlar bildirilse de, bu çalışmada, hipotiroidili hastalarda total kolesterol, LDL-K ve trigliserid düzeyleri yüksek olup, HDL-K düzeylerinde fark bulunmamıştır. Hipotiroidili hastalar her ne

kadar aterojenik lipid profiline sahip olsalar da bu tek başına aterosklerozun açıklanmasında yeterli değildir (85).

PON1'in aktivitesi ve konsantrasyonu populasyonlarda oldukça değişkendir. Enzimin miktarı ve niteliği vasküler hastalık gelişimi riskinde önemlidir. Bu yüzden *in vivo* PON1 düzeylerini etkileyen faktörlerin anlaşılması, özellikle de terapötik müdahaleler için bir hedef kabul edildiğinde önemlidir (86).

Hipotiroidili hastalarda, PON1 aktivitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Azizi ve ark (87) hipertiroidili ve hipotiroidili hastalarda kontrol grubuna göre PON1 aktivitesinin daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Sarandöl ve ark (5) tarafından yapılan çalışmada, deneysel hipotiroidili ratlarda kontrollere göre PON1 aktivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir. Subklinik hipotiroidili hastalarda yapılan bir çalışmada da PON1 aktivitesinin kontrol grubuna göre düşük bulunduğu bildirilmiştir (7). Başkol ve ark (6)'nın yaptıkları çalışmada ise tedavi öncesi hipotiroidili hastalarda, kontrol grubu ve tedavi sonrasına göre PON1 aktivitesinin daha düşük olduğu, tedavi sonrası hastaların PON1 aktivitelerinde artış olmasına rağmen, kontrollerle karşılaştırıldığında yine daha düşük bulunduğu bildirmiştir. Bazı çalışmalarda ise PON1 aktivitesinin hipotiroidili hastalar ile kontrol grubu arasında farklı olmadığı bildirmiştir (88, 89). Bu çalışmada da bizi destekleyen çalışmalarla uyumlu olarak, hipotiroidili hastalarda sağlıklı kontrollere göre PON1 aktivitesi düşük bulundu.

PON1 aktivitesinin düşüklüğünün sebepleri henüz netlik kazanmamıştır. Bu konuyla ilgili olarak birçok mekanizma ileri sürülmektedir. Bunlardan biri ve en önemlisi oksidatif strestir. Aviram ve ark (59, 90) PON1'in, hem HDL hem de LDL'nin oksidasyondan korunmasında önemli rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Bu etkinin PON1'in lipid peroksitleri ve kolesterol linoleat hidroperoksitleri hidroliz etmesiyle ilişkili olduğu ve lipoprotein ilişkili peroksitlerin hidrolizinde PON1'in inaktive olduğu bildirilmiştir. Bu inaktivasyonun, okside lipidler ile enzimin serbest sülfidril grubu arasındaki etkileşimden kaynaklandığı belirtilmiştir. Hipotiroidili hastalarda LDL-K'nın oksidasyona daha yatkın olduğunu ve dolaşımdaki okside LDL-K düzeylerinin arttığını bildiren çalışmalar mevcuttur (91, 92). Bu çalışmada, hipotiroidili grupla kontrol grubu arasında HDL-K düzeyleri açısından fark olmamasına rağmen PON1 aktivitesi hasta grubunda düşük bulunmuştur. Bu da literatürdeki bilgilerin ışığında, hipotiroidili hastalarda HDL-K düzeyinden bağımsız olarak PON1'in aktivitesini azaltan başka faktörlerin olduğunu göstermektedir.

Hipotiroidili hastalarda oksidatif stresin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Fakat çelişkili sonuçlar bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar oksidatif stresin arttığını (5-7) belirtirken bazıları bunu desteklememektedir (89). Hipotiroidizmdeki ateroskleroza yatkınlıkta, oksidatif stresin rolünün netlik kazanabilmesi için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yapılan çalışmalarda çeşitli hastalıklarda akut faz reaksiyonları sırasında PON1 aktivitesinin azaldığı belirtilmektedir (93). Ayub ve ark (94) miyokard enfarktüsünün semptomlarının başlamasından sonraki iki saat içinde, PON1 aktivitesi ve konsantrasyonunun azaldığını belirtmişlerdir. Kumon ve ark (95) PON1 aktivitesinin interlökin-1 ve TNF- α ile down regüle olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada hipotiroidili hastaların serumlarında bu parametrelerin arttığı gösterilmiştir (96). Bu çalışmada her ne kadar sitokin düzeylerine bakılmamış olsa da bir enflamasyon belirteci (akut faz reaktanı) olan CRP hasta grubunda yüksek bulundu. Bu da inflamatuvar cevaba bağlı olarak da PON1 aktivitesinin düşük olabileceğini düşündürdü.

PON1'in laktonaz aktivitesi de bulunmaktadır ve endojen substratlarından biri Hcy-tiyolaktonudur. PON1'in Hcy-tiyolaktonaz aktivitesi serumda Hcy-tiyolaktonu detoksifiye eder ve vasküler koruyucu bir rol oynar. Hiperhomosisteinematik farelerde PON1 geninin karaciğerdeki ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir. Böylece Hcy'nin azalmış PON1 aktivitesi, bozulmuş antioksidan fonksiyon ve azalmış Hcy-tiyolaktonaz kapasitesi ile proaterojenik etkilere sebep olabileceği bildirilmiştir (97, 98). Holven ve ark (99) hiperhomosisteinematik bireylerin PON aktivitesinin sağlıklı kontrollerden önemli ölçüde düşük bulunduğunu bildirmişlerdir. Literatürde hipotiroidili hastalarda PON1 aktivitesi ve Hcy düzeylerinin birlikte değerlendirildiği herhangi bir çalışma bulunamadı. İlk kez bu çalışmada hipotiroidili hastalarda Hcy düzeyleri yüksek, PON1 aktivitesi ise düşük bulundu. Hipotiroidili hastalardaki aterogeneze yatkınlığın sebeplerinden biri de, artmış Hcy düzeylerinin PON1 aktivitesinde azalmaya yol açmış olması olabilir. Bu çalışmada her ne kadar Hcy düzeyi ile PON1 aktivitesi arasında bir korelasyon bulunamasa da PON1'in Hcy-tiyolaktonaz aktivitesinin değerlendirilmesinin daha iyi bilgi verebileceği düşünüldü. Hasta grubunda diyabet, sigara, hipertansiyon ve yaş için düzeltmeler yapıldıktan sonra da PON1 aktivitesi bunlardan bağımsız olarak düşük bulundu. Bu da bize hipotiroidili hastalarda, PON1 aktivitesinde bu faktörlerin dışındaki bir sebeple düşüş olduğunu göstermektedir.

PON1 aktivitesi Hashimoto tiroiditi olan ve olmayan hastalarda, kontrol grubuna göre düşük fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Buradaki etken alt gruplara ayrıldığında hasta sayının azalması olabilir.

PON1 aktivitesinin düşük olmasının sebeplerinden bir diğeri de polimorfizmdir. PON1 geninde kodlayan bölgede belirgin iki tane polimorfizm bulunmaktadır. 192. pozisyonda glutamin yerine arjinin geçmesiyle 192 Q/R ve 55. pozisyonda lösin yerine metiyonin geçmesiyle de 55 L/M polimorfizmleri oluşmaktadır (100). PON1 QR 192 polimorfizminde; 192. pozisyonda R bulunan homozigot bireylerin serum paraoksonaz aktivitesi yüksek, Q bulunan homozigot bireylerde düşük, QR bulunan heterozigot bireylerde ise orta düzeyde aktivite görüldüğü bildirilmiştir (66). Bu çalışmada literatürle uyumlu olarak, RR ve QR genotipine sahip olan hasta ve kontrol grubundaki bireylerin PON1 aktiviteleri QQ'ya göre anlamlı olarak yüksek, RR genotipine sahip olanlar QR'ye göre yüksek fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Bu durum RR genotipindeki kişilerin sayısının azlığından kaynaklanmış olabilir.

PON1 55 L/M polimorfizminde; LL ve LM allellerine sahip olanların MM'ye göre daha yüksek paraoksonaz aktivitesine sahip olduğu, LL ve LM arasında fark olmadığı bildirilmiştir (101). Bu çalışmada da literatürle uyumlu olarak hasta grubunda, LL genotipine sahip olanların PON1 aktiviteleri MM'den yüksek, LM genotipinde olanların MM'ye göre yüksek fakat istatistiksel olarak anlamlı değil, LL ve LM arasında da fark bulunmamıştır. Kontrol grubunda, LL ve LM genotiplerine sahip olanların aktiviteleri MM'ye göre daha yüksek olmasına rağmen, muhtemelen MM genotipine sahip olanların sayısının sadece üç kişi olması sebebiyle istatistiksel fark bulunamamıştır. Substrat olarak paraokson kullanıldığı zaman, L 55 taşıyan allosimin M 55 taşıyan allosimden daha yüksek aktiviteye sahip olmasının muhtemel sebepleri olduğu bildirilmiştir. 55 L/M polimorfizminin karaciğerdeki enzim ekspresyonunu etkilediği; L 55 allelinin M 55 alleleline göre daha çok ekprese olduğu ve dolayısıyla L 55 alleli taşıyan bireylerin serumlarında PON1 yoğunluğunun daha yüksek olduğu bildirilmektedir (102). Ek olarak M 55 izoformunun L 55 izoformuna göre daha az stabil bir yapı gösterdiği bildirilmiştir (68).

Literatürde hipotiroidili hastalarda PON1 polimorfizminin değerlendirildiği herhangi bir yayına rastlamadık. Lambrinoudaki ve ark (103)'nın yaptıkları bir çalışmada postmenapozal kadınlarda PON1 R allel taşıyıcılarının daha düşük serbest T₃ düzeyi ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Şu ana kadar metabolik sendrom, diyabet, Alzheimer,

inme ve koroner kalp hastalığı gibi pek çok hastalıkta PON1 polimorfizmlerini değerlendiren çalışmalar yapılmıştır. Bu iki polimorfizmin görülme sıklığı değişik etnik gruplar arasında farklılıklar göstermektedir.

Türkiye’de yapılan bir çalışmada, insülin bağımsız diyabet hastaları ve diyabetik olmayan kontrol gruplarında PON1 192 Q/R ve PON1 55 L/M polimorfizmleri değerlendirilmiştir. Buna göre; 192 Q allel sıklığı hasta ve kontrol grubunda sırasıyla %68.84 ve %62.14, R allel sıklığı ise %31.15 ve %37.85 olarak bildirilmiştir. Genotip dağılımları ise hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla %48.3 ve %33.6 QQ, %41.1 ve %57.0 QR, %10.6 ve %9.3 RR olarak bildirilmiştir .

55 L allel sıklığı hasta ve kontrol grubunda sırasıyla %75.12 ve %70.18, M allel sıklığı ise %24.87 ve %29.81 olarak bildirilmiştir. Genotip dağılımları ise hasta ve kontrol gruplarında sırasıyla %54.1 ve %46.8 LL, %42.0 ve %46.8 LM, %3.9 ve %6.4 MM olarak bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada diyabet hastaları ve kontroller arasında 192 Q/R genotip dağılımı ve Q ve R allel sıklığı bakımından kontrol ve diyabetli gruplar arasında önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir. 55 L/M genotip dağılımı ve L ve M allel sıklığı bakımından da gruplar arasında önemli bir fark olmadığı bildirilmiştir (104).

Bu çalışmada ise hipotiroidili hasta grubunda QQ, QR ve RR genotip dağılımı sırası ile %50.7, %38.7 ve %10.7 iken kontrol grubunda bu oranlar sırası ile %36.4, %50 ve %13.6 olarak bulundu. Hasta grubunda Q alleli %70, R alleli %30 oranlarında bulunurken kontrol grubunda Q alleli %61, M alleli %39 oranlarında bulundu. Hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımları ve allel sıklıkları bakımından fark bulunmadı.

Hipotiroidili hasta grubunda LL, LM ve MM genotip sıklığı sırası ile %50.7, %33.3 ve %16 iken kontrol grubunda bu oranlar sırası ile %56.8, %36.4 ve %6.8 olarak bulundu. Hasta grubunda L alleli %67, M alleli %33 oranlarında bulunurken kontrol grubunda L alleli %72, M alleli %28 oranında bulundu. Yine hasta ve kontrol grubu arasında genotip dağılımları ve allel sıklıkları bakımından fark bulunamadı.

Bu çalışma farklı etiyolojilere bağlı hipotiroidili hastalarda PON1 polimorfizminin değerlendirildiği ilk çalışma olduğu için literatüre göre bir kıyaslama yapılamadı. Bu sonuçlar PON1 192 Q/R ve PON1 55 L/M polimorfizmlerinin hipotiroidili hastalardaki PON1 aktivitesinin düşüklüğü ve bu hastalardaki artmış ateroskleroz için önemli bir genetik yatkınlık oluşturmadığını düşündürmektedir. Ancak yine de

daha fazla hasta ve kontrol grubu içeren çalışmalarla bu bulguların desteklenmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada hasta grubunda PON1 192 Q/R genotiplerine göre NO, Hcy, CRP, total kolesterol, trigliserid, HDL-K ve LDL-K düzeyleri de incelendi fakat PON1 192 Q/R polimorfizmin bu parametreler üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bulundu. Kontrol grubunda ise sadece NO düzeyleri üzerine etkisi olduğu görüldü. QQ genotipine sahip olanların NO düzeyleri QR'ye sahip olanlara göre anlamlı olarak yüksek bulundu ki QQ genotipindeki bireylerin PON1 aktivite düzeyi en düşüktü. Bu durum belki de kontrol grubundaki NO ve PON1 aktivitesi arasındaki negatif korelasyonu açıklayabilir.

Hasta ve kontrol grupları arasında PON1 192 Q/R genotiplerine göre PON1 aktivitelerini karşılaştırdığımızda da anlamlı bir fark bulunmadı. Bu durum bize PON1 aktivitesinin alt gruplarda da 192 Q/R genotiplerinden bağımsız olarak düşük olduğunu gösterdi.

Hasta ve kontrol grubunda PON1 55 L/M genotiplerine göre NO, Hcy, CRP, total kolesterol, trigliserid, HDL-K ve LDL-K düzeyleri incelendiğinde yine PON1 55 L/M polimorfizminin bu parametreler üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı bulundu.

Hasta ve kontrol grupları arasında PON1 55 L/M genotiplerine göre PON1 aktivitelerini karşılaştırdığımızda, sadece MM genotipine sahip olan hastaların PON1 aktivitelerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu bulundu. Hasta grubunda MM genotipine sahip olanlar %16, kontrol grubunda ise %6.8 olarak görülmüştü fakat bu fark kontrol grubundaki kişi sayısı 3 ile sınırlı kaldığı için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştı. Belki de daha fazla hasta ve kontrol grubuyla yapılacak bir çalışmada gerçekten de MM genotipinin görülme sıklığının hipotiroidili hastalarda daha fazla olduğu ve aktivitenin de buna bağlı olarak düşük olduğu gösterilebilecektir.

Hasta grubunda diyabet ve hipertansiyonu olan kişiler de olduğu için bunlarda belirgin bir genotip dağılımı olup olmadığını incelediğimizde, PON1 192 Q/R ve PON1 55 L/M genotiplerinin dağılımı açısından herhangi bir fark bulunmadı. Bu da bize hipotiroidili hastalarda diyabet ve hipertansiyon gelişiminde PON1 polimorfizmlerinin etkisi olmadığını gösterebilir.

Hcy kardiyovasküler hastalıklar, doğumsal bozukluklar, osteoporoz, Alzheimer hastalığı ve böbrek yetmezliği gibi çeşitli patolojik durumlarda bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Hcy ile ilişkili bu hastalıkların çoğu aynı zamanda

oksidatif stresle de ilişkilidir (105). Yapılan çalışmalar Hcy düzeyi yüksekliğinin aterogeneze neden olabileceğini işaret etmektedir, ancak Hcy aracılı aterogeneze mekanizması henüz netlik kazanmamıştır. Bununla beraber bu konuda pek çok mekanizma ileri sürülmektedir. Bunlar arasında en önemlisinin oksidatif stres aracılı mekanizma olduğu düşünülmektedir. Hcy prooksidan aktiviteye sahiptir. Reaktif sülfidril grupları içerir (-SH), diğer çoğu tiyoller gibi (RSH) fizyolojik pH'da ve oksijen varlığında oksidasyona uğrayarak (RSSR) disülfid oluşturabilir.



Bu reaksiyon sonucunda süperoksit anyon radikali ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi çeşitli reaktif oksijen türleri açığa çıkar. Oluşan H_2O_2 'nin damar endotelinde hasara neden olurken süperoksit radikallerinin ise hem endotel hem de LDL partiküllerini etkileyerek lipid peroksidasyonunu başlattığı bildirilmektedir (106).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hiperhomosisteineminin, Hcy tiyolaktan ya da Hcy-tiyil ($\text{RS}^{\cdot}$) radikali oluşumu sonucunda oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir.

Bu oluşumların sonucunda serum proteinleri ile Hcy-tiyolaktanın reaksiyonu yeni protein antijenleri ve otoimmün antikorların oluşumuna yol açarak inflamatuvar cevabı artırdığı bildirilmiştir. Hiperhomosisteineminin LDL-K ve diğer plak bileşenlerinin oksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca S-nitrozohomosistein oluşumuyla NO'nun vazodilatör etkisini antagonize ederek aterogenezin erken bir aşaması olan endotelial disfonksiyona neden olduğu bildirilmiştir (107-109).

Hcy'nin düz kas hücrelerini etkileyerek, fibrozis, kalsifikasyon, proteoglikan birikimi ve elastik doku tabakalarının hasarına yol açarak aterosklerotik plakların konnektif doku değişikliklerine sebep olduğu belirtilmektedir. Hcy güçlü bir prokoagulandır, arteriyel duvarlarda mural trombus ve fibrin birikmesini başlattığı belirtilmektedir (110). Hcy yüksekliği ile ilgili bildirilen bu bilgiler ışığında, hipotiroidili hastalarda Hcy düzeylerinin düşürülmesine dönük tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi faydalı olabilir.

Bir diğer önemli nokta ise literatüre baktığımız zaman hipotiroidide Hcy düzeylerinin farklı olduğunu görmekteyiz. Gündüz ve ark (111)'nin çalışmasında klinik ve subklinik hastalarda kontrol grubuna göre Hcy düzeyleri yüksek bulunmuştur. Yine Mayer ve ark (112)'nin yaptıkları çalışmada da hipotiridili

hastalarda Hcy düzeyleri yüksek olarak bulunmuştur. William ve ark (113) ile Özcan ve ark (114) ise subklinik hipotiroidili hastalarla ötiroid kontroller arasında Hcy düzeyleri açısından fark bulunmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da hipotiroidili hastalarda kontrol grubuna göre Hcy düzeyleri yüksek bulundu. Yine Hashimoto olan grupta Hcy düzeyleri kontrollere göre yüksek bulundu. Hipotiroidili hastalardaki artmış Hcy'nin sebebinin, böbrekler üzerine olan etkisi sonucunda glomerüler filtrasyon hızının azalması olabileceği bildirilmiştir (115). Ayrıca, Hcy'nin metiyonine remetilasyonunda anahtar bir enzim olan metilentetrahidrofolat redüktaz'ın azalmış aktivitesinin de Hcy düzeylerinin artmasına neden olabileceği belirtilmiştir. Hipotiroidili bireylerde riboflavinin FAD'a dönüşümünün bozulabileceği ve sonuç olarak metilentetrahidrofolat redüktaz aktivitesinin de bozulabileceği bildirilmektedir (116, 117).

Literatürde Hcy ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcut olmakla birlikte açıklanan mekanizmalar ışığında belki de bu hasta grubundaki bildirilen artmış koroner kalp hastalığı ve aterosklerozdan Hcy düzeyindeki artışın sorumlu olabileceği düşünüldü.

Bu çalışmada serum NO düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu. Literatüre baktığımız zaman, Coria ve ark (89) ile Başkol ve ark (6) bu çalışmanın sonuçlarına benzer şekilde hipotiroidili hastalarda serum NO düzeylerini yüksek bulmuşlardır. Bununla beraber Özcan ve ark (114) subklinik hipotiroidili hastalarda, Engin ve ark (118) tiroidektomize ratlarda yaptıkları çalışmalarında, serum NO düzeylerini düşük olarak bulmuşlardır. Bu hasta grubunda çelişkili NO düzeyinin sebepleri henüz netlik kazanmamıştır.

NO, NOS tarafından L-arjinden sentezlenir. Retiküloendotelial hücreler, polimorfonükleer lökositler, plateletler, fibroblastlar, nöronal hücreler, nötrofiller, makrofajlar ve endotelial hücreler tarafından üretilir. Pek çok inflamatuvar durumda NO üretiminin arttığı bildirilmiştir (119, 120).

Bu çalışmada hipotiroidili hastaların çoğunluğunu Hashimoto tiroiditli grup oluşturmaktadır ve hasta grubunu etiyolojiye göre alt gruplara ayırıp incelediğimizde de Hashimoto tiroiditi olan grupta kontrollere göre anlamlı olarak NO düzeyleri yüksek bulundu. Vural ve ark (121) Hashimoto tiroiditli hastalarda NO düzeylerini bu çalışmayla uyumlu olarak yüksek bulmuşlardır. Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus gibi bazı otoimmün hastalıklarda NO düzeylerinin arttığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır ve bunun sebebinin interlökin-6, TNF- α gibi inflamatuvar sitokinler tarafından iNOS'un aktivasyonu ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (122,

123). Ayrıca Donckier ve ark (124) hashimoto tiroiditi'nde iNOS'un mRNA ekspresyonunun arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada her ne kadar sitokin düzeyleri ölçülmemiş olsa da literatürdeki bilgilere dayanarak, hipotiroidili hastalarda inflamasyona bağlı olarak NO'nun yükselebileceği düşünüldü.

Ancak bu çalışmada ilginç olarak inflamatuvar bir hastalık olduğu bilinen Hashimoto tiroiditli grupta CRP düzeylerini yüksek beklerken kontrol grubuna göre farklı bulunmadı. Hashimoto tiroiditi olmayan grupta kontrollere göre daha yüksek bulundu. Pearce ve ark (125)'nin yaptıkları çalışmada Hashimoto tiroiditli hastalarda CRP kontrollerden farklı bulunmamıştır. Yine Erden ve ark (126)'nın çalışmalarında da Hashimoto tiroiditinde kontrollere göre CRP düzeylerinde fark olmadığı bildirilmiştir. Bu durum CRP'nin nonspesifik bir akut faz reaktanı olması ya da Hashimoto tiroiditinde başka sitokinlerin rol oynamasından kaynaklanmış olabilir.

Yapılan çalışmalarda hipotiroidili hastalarda oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir (5-7). Bu çalışmada başka oksidatif stres belirteçlerine bakılmamış olsa da, antioksidan bir enzim olan PON1'in düşük olması, prooksidan etkileri olan Hcy'nin yüksek olması hipotiroidili hastalardaki oksidatif stresi destekleyen bulgulardır.

Fizyolojik düzeylerde NO'nun oksidatif stresi azaltırken, iNOS kaynaklı artmış NO üretiminin, reaktif oksijen türleri ve reaktif nitrojen türlerinin oluşumunu artırdığı bildirilmiştir. Oksidatif stresin de NO'nun yarı ömrünü azaltarak ve eNOS'un ekspresyon ve aktivitesini azaltarak NO üretimini azalttığı bildirilmiştir (127). NO'nun direk toksik etkileri olduğu gibi, süperoksit varlığında, kuvvetli prooksidan peroksinitrite ($\text{NO} + \text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$) dönüştüğü, peroksinitritin de lipid peroksidasyonu ve aminoasit rezidülerinin nitrozasyonuna sebep olduğu, hücre membranlarını, hücre sinyalizasyonunu ve hücre yaşamını bozduğu bildirilmektedir. Ayrıca peroksinitritin proinflamatuvar etkileri olduğu da bildirilmiştir (128). Literatürdeki bu bilgilere dayanarak hipotiroidili hastalarda nitrik oksit kaynaklı oksidatif stresin bulunduğu, hem de oksidatif stresin sebep olduğu vasküler yapılarda koruyucu rolleri olan eNOS kaynaklı NO'nun azalmasına bağlı ateroskleroza zemin hazırlayan bir ortamın bulunduğu düşünülebilir. Belki de spesifik olarak iNOS'u azaltmaya dönük tedavi yaklaşımlarının bu hastalarda faydalı olabileceği söylenebilir. Bu çalışmada hipotiroidili hastalarda NO düzeyleri yüksek bulundu, ancak diyabeti olan hipotiroidili hastalarda anlamlı olarak daha da yüksek NO düzeyleri görüldü. Diyabetik ratlarda yapılan bir çalışmada normal ratlara göre plazma ve üriner NO düzeylerinin arttığı bildirilmiştir (129). Yine başka bir çalışmada hipergliseminin

iNOS ekspresyonunu ve NO üretimini arttırdığı bildirilmiştir (130). Bu da bize hipotiroidi ve diyabet birlikteliğinde NO düzeylerinin daha fazla arttığını göstermektedir.

Hipotiroidizme artmış metabolik sendrom prevalansının eşlik ettiği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (131, 132). Bununla birlikte subklinik hipotiroidili hastalarda yapılan bir çalışmada, subklinik hipotiroidinin metabolik sendrom için bağımsız bir risk faktörü olmadığı da bildirilmiştir (133).

Bu çalışmada metabolik sendrom sıklığı da araştırıldı ve hipotiroidili hastalarda %46.6, kontrol grubunda ise %4.4 olarak bulundu. Bu durum hipotiroidide görülen lipid anormallikleri, metabolizmanın yavaşlamasına bağlı kilo alımına ve yine hipertansiyon riskinin artmasıyla ilişkilendirilebilir. Literatürde metabolik sendromlu hastalarda PON1 aktivitesinin düşük olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca PON1 192 Q/R polimorfizmi açısından fark olmadığı da bildirilmiştir (134). Başka bir çalışmada ise PON1 polimorfizmlerinin metabolik sendromla ilişkili olduğu gösterilmiştir (135). Bu çalışmada PON1 aktivitesi açısından gruplar arasında farklılık görülmedi. Bu durum bize hipotiroidideki PON1 aktivitesinin metabolik sendrom varlığından da bağımsız olarak düşük olduğunu gösterdi. Bu çalışmada metabolik sendromu olan ve olmayan hastalar ile kontrol grubunda PON1 polimorfizmleri de değerlendirildi, gruplar arasında farklılık görülmedi. Yapılan diğer çalışmalar daha fazla hasta popülasyonu ile gerçekleştirildiğinden ya da PON1 polimorfizmleri etnik farklılıklar gösterdiği için bu çalışmada fark bulunamamış olabilir.

Sonuç olarak, PON1 192 Q/R ve 55 L/M polimorfizmlerinin, PON1 aktivitesinde önemli değişikliklere neden olduğu, bu polimorfizmlerin genotip dağılımları ve allel sıklıklarının hasta ve kontrol gruplarında farklı olmadığı, hipotiroidili hastalardaki PON1 aktivitesinin bu polimorfizmlerden bağımsız olarak düşük olduğu ve bu hastalardaki artmış ateroskleroz için genetik bir risk oluşturmadığı, ayrıca PON1 aktivitesindeki düşüklüğe Hcy yüksekliğinin sebep olabileceği ve ikisinin birlikte bu hastalardaki ateroskleroza yakınlıkta rolü olabileceği, yüksek NO düzeyleri sonucunda da NO kaynaklı oksidatif strese maruz kaldıkları söylenebilir.

6. SONUÇLAR

Hipotiroidili hastalarda ve sağlıklı kontroller üzerinde yapılan bu çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda sıralandı:

- CRP, Hcy ve NO düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. PON1 aktivitesi hasta grubunda kontrol grubundan anlamlı olarak düşük bulundu.
- Hasta kontrol grupları arasında PON1 192 Q/R ve 55 L/M genotiplerinin dağılımı ve allel sıklıkları açısından istatistiksel bir fark olmadığı belirlendi.
- Her iki grupta en yüksek paraoksonaz aktivitesi LL ve RR genotiplerinde, orta düzeyde aktivite LM ve QR genotiplerinde, en düşük aktivite QQ ve MM genotiplerinde görülmekle birlikte kontrol grubunda 55 L/M genotipleri ile aktivite arasında fark bulunmadı.
- Bu polimorfizmlerin Hcy, CRP ve lipid düzeyleri üzerine etkisinin olmadığı görüldü.
- Kontrol grubunda QQ genotipine sahip olanların NO düzeyleri QR'ye sahip olanlardan yüksek bulundu. Diğerleri arasında fark bulunmadı.
- Etiyolojiye ve metabolik sendrom varlığına göre de polimorfizmlerin dağılımı ve allel sıklıkları bakımından fark bulunmadı.

7. KAYNAKLAR

1. Andreoli TE, Carpenter C, Griggs RC, Benjamin IJ. Cecil essentials of medicine (7. edisyon). Nobel Tıp Kitabevleri 2008, sy. 652-654.
2. Jung CH, Sung KC, Shin HS, et al. Thyroid dysfunction and their relation to cardiovascular risk factors such as lipid profile, hsCRP, and waist hip ratio in Korea. Korean J Intern Med. 2003; 18(3): 146-153.
3. Engin AB., Dincel AS., Gonul II., Engin A. Oxidative stress-induced endotelial cell damage in thyroidectomized rat. Experimental and Toxicologic Pathology 2012; 64: 481-485.
4. National Cholesterol Education Program. Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). Circulation 1994; 89: 1333-1445.
5. Sarandol E, Tas S, Dirican M, Serdar Z. Oxidative stress and serum paraoxonase activity in experimental hypothyroidism : effect of vitamin E supplementation Cell Biochem Funct 2005; 23: 1-8.
6. Baskol G, Atmaca H, Tanrıverdi F, Baskol M, Kocer D, Bayram F. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hypothyroidism before and after treatment. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2007; 115: 522-526.
7. Cebeci E, Oner FA, Usta M, Yurdakul S, Ergüney M. Evaluation of oxidative stress, the activities of paraoxonase and arylesterase in patient with subclinical hypothyroidism. J Investig Med 2012; 60: 23-28.
8. Precourt LP, Amre D, Denis MC et al. The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation. Atherosclerosis 2011; 214: 20-36.
9. Neves C, Alves M, Medina JL and Delgado JL. Thyroid diseases, dyslipidemia and cardiovascular pathology. Rev Port Cardiol 2008; 27 (10): 1211-1236.
10. Becker KL. Principles and practice of endocrinology and metabolism (3th ed). Lippincott Williams and Wilkins 2001, pp. 445-453.

11. Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. *Circulation* 2007; 116: 1725-1735.
12. Siafakus NM, Salesiotou V, Filaditaki V, Tzanacis N, Thalassinou N, Bouros D. Respiratory muscle strength in hypothyroidism. *Chest* 1992; 102: 189-194.
13. İliçin, Ünal, Biberoğlu, Akalın, Süleymanlar. Temel iç hastalıkları. Cilt 2 Güneş Kitapevi 1996, sy. 1701-1712.
14. Constant EL, de Volder AG, Ivanoiu A, et al. Cerebral blood flow and glucose metabolism in hypothyroidism a pozitron emission tomography study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3864-3870.
15. Dieckman T, Lansberg PJ, Kastelein JP, Wiersinga W. Prevalence and correction of hypothyroidism in a large cohort of patients referred for dyslipidemia. *Arc Intern Med* 1999; 131: 1490-1495.
16. De Groot JL. *Endocrinology* (14 th ed). W.B. Saunders Company, Philadelphia 2001.
17. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Tiroid hastalıkları tanı, tedavi ve izlem kılavuzu 2012.
18. Slatosky J, Shipton B and Wahba H. Thyroiditis: Differential diagnosis and management. *Am Fam Physician* 2000; 61(4): 1047-1052.
19. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz klinik kimyada temel ilkeler. Palme Yayıncılık 2005, sy. 463-479.
20. Gimbrone MA Jr. Vascular endothelium, hemodynamic forces and atherosclerosis. *Am J. Pathol* 1999; 155: 1-5.
21. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis. *Nature* 1993; 362: 801-809.
22. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Circulation*. 2002; 106(25): 3143-3421.
23. Maher VNG, Brown BG, Marcovina SM, et al. Effects of lowering elevated LDL cholesterol on the cardiovascular risk of lipoprotein(a). *JAMA* 1995; 274(22): 1771-1774.
24. Knopp RH. Drug treatment of lipid disorders. *N Eng J Med*. 1999; 341(7): 498-511.
25. Fruchard JC, Nierman MC, Stroes ESG, et al. New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 2004; 109 (23 Supp 1): III15-19.
26. Dikmen M. Homosistein metabolizması ve hastalıklarla ilişkisi. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2004; 24: 645-652.

27. Temel İ, Özerol E. Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 9(2): 149-157.
28. Barış N, Demir M, Ataytay A, Çuhadar S, Köseoğlu M. Hipotiroidizm ve hipertiroidizmde kardiyovasküler risk faktörleri. Yeni Tıp Dergisi 2011; 28: 30-33.
29. Arsene E, Refsum H, Bona KH. Serum total homocysteine and coronary heart disease. Int J Epidemiol 1995; 24(4): 704-709.
30. Cleophas TJ, Hornstra N, Hoogstraten B, Der Meulen J. Homocysteine a risk factor for coronary artery disease or not? A meta-analysis. Am J Cardiol 2000; 86(9): 1005-1009.
31. Şişman AR, Küme T, Akan P, Tuncel P. C-Reaktif Protein: Klinik önemi, ölçüm yöntemlerindeki gelişmeler, preanalitik ve analitik değişkenlikler. Türk Klinik Biyokimya Derg 2007; 5(1): 33-41.
32. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining the risk of first myocardial infarction. Circulation 1998; 98: 731-3.
33. Türköz Y, Özerol E. Nitrik oksit'in etkileri ve patolojik rolleri. Journal of Turgut Özal Medical Center 1997; 4(4).
34. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit: Biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Palme Yayıncılık 2003.
35. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Metabolik sendrom çalışma grubu metabolik sendrom klavuzu 2009.
36. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP). Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285(19):2486-2497.
37. Bayrak T, Bayrak A, Demirpençe E, Kılınç K. Yeni bir kardiyovasküler belirteç adayı: Paraoksonaz. Hacettepe Tıp Dergisi 2005; 36: 147-151.
38. Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. J Mol Med 2003; 81: 766-779.
39. Walker CH, Mackness MI. Esterases: problems of identification and classification. Biochem Pharmacol 1983; 32(22): 3265-3269.
40. Aldridge WN. Serum esterases I. Two types of esterase (A and B) hydrolyzing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination. Biochem J 1953; 53: 110-117.

41. Aldridge WN. Serum esterases II. An enzyme hydrolyzing diethyl p-nitrophenylacetate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J* 1953; 53: 117–124.
42. Ali SM, Chia SE. Interethnic variability of plasma paraoxonase (PON1) activity towards organophosphates and PON1 polymorphism among Asian populations. *Industrial Health* 2008; 46: 309-317.
43. Başkol G, Köse K. Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Dergisi* 2004; 26(2): 75-80.
44. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33: 498-507.
45. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92(16): 7187-7191.
46. Aviram M, Rosenblat B. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 393-399.
47. Khersonsky O, Tawfik DS. The histidine 115-histidine 134 dyad mediates the lactonase activity of mammalian serum paraoxonases. *J Biol Chem* 2006; 281(11): 7649-7656.
48. Josse D, Ebel C, Stroebel D, et al. Oligomeric states of the detergent-solubilized human serum paraoxonase (PON1). *J Biol Chem* 2002; 277(36): 33386-33397.
49. 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(5): 412-419.
50. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci* 2004; 107: 435-447.
51. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2004; 369(1): 78-88.
52. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 2000; 275: 3957–3962.
53. Tougou K, Nakamura A, Watanabe S, Okuyama Y, Morino A. Paraoxonase has a major role in the hydrolysis of prulifloxacin (NM441), a prodrug of a new antibacterial agent. *Drug Metab Dispos* 1998; 26(4): 355-359.

54. Biggadike K, Angell RM, Burgess CM, et al. Selective plasma hydrolysis of glucocorticoid g214 lactones and cyclic carbonates by the enzyme paraoxonase. *J Med Chem* 2000; 43: 19 –21.
55. Hughes J, Capleton A, Courage C. "A review of the effects of low-level exposure to organophosphate pesticides on fetal and childhood health". Institute for Environment and Health, IEH Web Report W11 2002.
56. Ekmekçi ÖB, Donma O, Ekmekçi H. Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; 35(2): 78-82.
57. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-480.
58. Rosenblat M, Gaidukov L, Khersonsky O, et al. The catalytic histidine dyad of high density lipoprotein-associated serum paraoxonase-1 (PON1) is essential for PON1-mediated inhibition of low density lipoprotein oxidation and stimulation of macrophage cholesterol efflux. *J Biol Chem* 2006; 281: (11): 7657–7665.
59. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101(8): 1581-1590.
60. Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase in lipid metabolism. In: Costa LG, Furlong CE Eds. *Paraoxonase (PON1) in health and disease: Basic and clinical aspects*. Norwell, MA: Kluwer Acad., 2002, pp. 79-92.
61. Azarsız E, Sönmez EY. Paraoksonaz ve klinik önemi. *Türk Biyokimya Dergisi* 2000; 25: 109-119.
62. Costa LG, Giordano G, Furlong CE. Pharmacological and dietary modulators of paraoxonase 1 (PON1) activity and expression: The hunt goes on. *Biochem Pharmacol* 2011; 81(3): 337-344.
63. Ekmekçi A, Konaç E, Önen HI. Gen polimorfizmi ve kansere yatkınlık. *Marmara Medical Journal* 2008; 21(3): 282-295.
64. La Du BN. Future studies of low-activity PON1 phenotype subjects may reveal how PON1 protects against cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(8): 1317-1318.
65. Furlong CE, Cole TB, Jarvic GP, Costa LG. Pharmacogenetics considerations of the paraoxonase polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2002; 3: 341-348.

66. Humbert R, Adler DA, Disteché CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993; 3(1): 73-76.
67. Baltter Garin MC, James RW, Dussoix P, et al. Paraonase polymorphism Met-Leu 54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraonase gene and increased cardiovascular risk in diabetes. *J Clin Invest* 1997; 99: 62-66.
68. Leviev I, Deakin S, James RW. Decreased stability of the M54 isoform of paraonase as a contributory factor to variations in human serum paraonase concentrations. *J Lipid Res* 2001; 42(4): 528-535.
69. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. Purification of human serum paraonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. *Drug Metab Dispos* 1991; 19(1): 100-106.
70. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155: 335-350.
71. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732): 1350-1354.
72. Arnheim N, Li HH, Cui XF. PCR analysis of DNA sequences in single cells: single sperm gene mapping and genetic disease diagnosis. *Genomics* 1990; 8(3): 415-419.
73. Linn S, Arber W. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*, X. In vitro restriction of phage fd replicative form. *Proc Natl Acad Sci USA* 1968; 59(4): 1300-1306.
74. Meselson M, Yuan R. DNA restriction enzyme from *E.coli*. *Nature* 1968; 217(5134): 1110-1114.
75. Aras K, Erşen G. Klinik biyokimya. Ankara. AÜ. Basımevi. 1975, sy. 17-18.
76. Eckerson HW, Romson J, Wyte C, et al. The human serum paraonase polymorphism: Identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet* 1983; 35: 214-227.
77. Canaris GJ, Manowitz NR, Mayor G, Ridgway EC. The Colorado thyroid disease prevalence study. *Arch Intern Med* 2000; 160: 526-534.
78. Cappola AR, Ladenson PW. Hypothyroidism and atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(6): 2438-2444.

79. Nikkila EA, Kekki M. Plasma triglyceride metabolism in thyroid disease. *J Clin Invest* 1972; 51: 2103-2114.
80. Dullaart RP, Hoogenberg K, Groener JE, Dikkeschei LD, Erkelens DW, Doorenbos H. The activity of cholesteryl ester transfer protein is decreased in hypothyroidism: a possible contribution to alterations in high-density lipoproteins. *Eur J Clin Invest* 1990; 20: 581-587.
81. Diekman T, Lansberg PJ, Kastelein JJ, Wiersinga WM. Prevalence and correction of hypothyroidism in a large cohort of patients referred for dyslipidemia. *Arch Intern Med* 1995; 155(14): 1490-1495.
82. Walton KW, Scott PJ, Dykes PW, Davies JW. The significance of alterations in serum lipids in thyroid dysfunction. II. Alterations of the metabolism and turnover of ¹³¹I-low-density lipoproteins in hypothyroidism and thyrotoxicosis. *Clin Sci* 1965; 29: 217-238.
83. Abrams JJ, Grundy SM. Cholesterol metabolism in hypothyroidism and hyperthyroidism in man. *J Lipid Res* 1981; 22: 323-38.
84. Lam KS, Chan MK, Yeung RT. High-density lipoprotein cholesterol, hepatic lipase and lipoprotein lipase activities in thyroid dysfunction--effects of treatment. *Q J Med* 1986; 59(229): 513-21.
85. Lien EA, Nedrebø BG, Varhaug JE, Nygård O, Aakvaag A, Ueland PM. Plasma total homocysteine levels during short-term iatrogenic hypothyroidism. *JCE & M* 2000; 85(3): 1049-1053.
86. Richter RJ, Furlong CE. Determination of paraoxonase (PON1) status requires more than genotyping. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 745-753.
87. Azizi F, Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Rahmani M, Arabi M. Serum paraoxonase 1 activity is decreased in thyroid dysfunction. *J Endocrinol Invest* 2003; 26(8): 703-9.
88. Milionis HJ, Tambaki AP, Kanioglou CN, Elisaf MS, Tselepis AD, Tsatsoulis A. Thyroid substitution therapy induces high-density lipoprotein-associated platelet-activating factor-acetylhydrolase in patients with subclinical hypothyroidism: a potential antiatherogenic effect. *Thyroid* 2005; 15(5): 455-60.
89. Coria MJ, Pastrán AI, Gimenez MS. Serum oxidative stress parameters of women with hypothyroidism. *Acta Biomed* 2009; 80(2): 135-9.
90. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, et al. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999; 26(7-8): 892-904.

91. Sundaram V, Hanna AN, Koneru L, Newman HA, Falko JM. Both hypothyroidism and hyperthyroidism enhance low density lipoprotein oxidation. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(10): 3421-4.
92. Duntas LH, Mantzou E, Koutras DA. Circulating levels of oxidized low-density lipoprotein in overt and mild hypothyroidism. *Thyroid* 2002; 12(11): 1003-7.
93. Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, et al. Antiinflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995; 96(6): 2758–2767.
94. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(2): 330-5.
95. Kumon Y, Nakauchi Y, Suehiro T, et al. Proinflammatory cytokines but not acute phase serum amyloid A or C-reactive protein, downregulate paraoxonase 1 (PON1) expression by HepG2 cells. *Amyloid* 2002; 9(3): 160-4.
96. Weetman AP. Cellular immune responses in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 61(4): 405-13.
97. Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006; 136(6 Suppl): 1741S-1749S.
98. Jakubowski H, Perla-Kaján J, Finnell RH, et al. Genetic or nutritional disorders in homocysteine or folate metabolism increase protein N-homocysteinylation in mice. *FASEB J* 2009; 23(6): 1721-7.
99. Holven KB, Aukrust P, Retterstøl K, et al. The antiatherogenic function of HDL is impaired in hyperhomocysteinemic subjects. *J Nutr* 2008; 138(11): 2070-5.
100. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol*. 1996; 7(2): 69-76.
101. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN. Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 1997; 122(2): 265-8.
102. Leviev I, Negro F, James RW. Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA, an explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2935–9.

103. Lambrinoudaki I, Kaparos G, Rizos D, et al. Apolipoprotein E and paraoxonase1 polymorphisms are associated with lower serum thyroid hormones in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009; 71(2): 284-290.
104. Agachan B, Yilmaz H, Karaali Z, Isbir T. Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct* 2004; 22(3): 163-168.
105. Suszynska J, Tisonczyk J, Lee HG, Smith MA, Jakubowski H. Reduced homocysteine-thiolactonase activity in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2010; 19(4): 1177-1183.
106. Jacobsen DW. Hyperhomocysteinemia and oxidative stress: time for a reality check? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(5): 1182-1184.
107. Loscalzo J. The oxidant stress of hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996; 98(1): 5-7.
108. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, et al. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *J Clin Invest* 1993; 91(1): 308-318.
109. Undas A, Perła J, Lacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylation proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke* 2004; 35(6): 1299-1304.
110. Yilmaz N. Relationship between paraoxonase and homocysteine: crossroads of oxidative diseases. *Arch Med Sci* 2012; 8(1): 138-153.
111. Gunduz M, Gunduz E, Kircelli F, Okur N, Ozkaya M. Role of surrogate markers of atherosclerosis in clinical and subclinical thyroidism. *Int J Endocrinol* 2012; 109797: 1-6.
112. Mayer O Jr, Simon J, Filipovský J, Plásková M, Pikner R. Hypothyroidism in coronary heart disease and its relation to selected risk factors. *Vasc Health Risk Manag* 2006; 2(4): 499-506.
113. Hueston WJ, King DE, Geesey ME. Serum biomarkers for cardiovascular inflammation in subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63(5): 582-587.
114. Ozcan O, Cakir E, Yaman H, et al. The effects of thyroxine replacement on the levels of serum asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other biochemical cardiovascular risk markers in patients with subclinical hypothyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005; 63(2): 203-206.
115. Kreisman SH, Hennessey JV. Consistent reversible elevations of serum creatinine levels in severe hypothyroidism. *Arch Intern Med* 1999; 159: 79-82.

116. Rivlin RS, Landon RG. Regulation of hepatic FAD levels by thyroid hormone. *Adv Enzyme Regul* 1966; 4: 45-48.
117. Cimino JA, Jhangiani S, Schwartz E, Cooperman JM. Riboflavin metabolism in the hypothyroid human adult. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987; 184: 151-153.
118. Engin AB, Sepici-Dincel A, Gonul II, Engin A. Oxidative stress-induced endothelial cell damage in thyroidectomized rat. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64(5): 481-485.
119. Stichtenoth DO, Frölich JC. Nitric oxide and inflammatory joint diseases. *Br J Rheumatol* 1998; 37(3): 246-257.
120. Evereklioglu C, Turkoz Y, Er H, Inaloz HS, Ozbek E, Cekmen M. Increased nitric oxide production in patients with Behçet's disease: is it a new activity marker? *J Am Acad Dermatol* 2002; 46(1): 50-54.
121. Vural P, Degirmencioglu S, Erden S, Gelincik A. The relationship between transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, nitric oxide and Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol* 2009; 9(2): 212-215.
122. Van't Hof RJ, Ralston SH. Nitric oxide and bone. *Immunology* 2001; 103(3): 255-261.
123. Nagy G, Clark JM, Buzás EI, Gorman CL, Cope AP. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity. *Immunol Lett* 2007; 111(1): 1-5.
124. Donckier JE, Michel L, Delos M, Havaux X, Van Beneden R. Interrelated overexpression of endothelial and inducible nitric oxide synthases, endothelin-1 and angiogenic factors in human papillary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64(6): 703-710.
125. Pearce EN, Bogazzi F, Martino E, et al. The prevalence of elevated serum C-reactive protein levels in inflammatory and noninflammatory thyroid disease. *Thyroid* 2003; 13(7): 643-648.
126. Erden S, Buyukozturk S, Vural P, Değirmencioglu S. Acute-phase reactants in Hashimoto thyroiditis. *Int Immunopharmacol* 2008; 8(13-14): 1863-1865.
127. Levine AB, Punihale D, Levine TB. Characterization of the role of nitric oxide and its clinical applications. *Cardiology* 2012; 122: 55-68.
128. Levonen AL, Patel RP, Brookes P, et al. Mechanisms of cell signaling by nitric oxide and peroxynitrite: from mitochondria to MAP kinases. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3: 215-229.
129. Bank N, Aynedjian HS. Role of EDRF (nitric oxide) in diabetic renal hyperfiltration. *Kidney Int* 1993; 43(6): 1306-1312.

130. Hua KF, Wang SH, Dong WC, Lin CY, Ho CL, Wu TH. High glucose increases nitric oxide generation in lipopolysaccharide-activated macrophages by enhancing activity of protein kinase C- α/δ and NF- κ B. *Inflamm Res* 2012. [Epub ahead of print]
131. Raterman HG, van Eijk IC, Voskuyl AE, et al. The metabolic syndrome is amplified in hypothyroid rheumatoid arthritis patients: a cross sectional study. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 39-42.
132. Erdogan M, Canataroglu A, Ganidagli S, Kulaksızoglu M. Metabolic syndrome prevalence in subclinic and overt hypothyroid patients and the relation among metabolic syndrome parameters. *J Endocrinol Invest* 2011; 34(7): 488-492.
133. Liu C, Scherbaum WA, Schott M, Schinner S. Subclinical hypothyroidism and the prevalence of the metabolic syndrome. *Horm Metab Res* 2011; 43(6): 417-421.
134. Sentí M, Tomás M, Fitó M, et al. Antioxidant paraoxonase1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(11): 5422-5426.
135. Kordi-Tamandani DM, Hashemi M, Sharifi N, Kaykhaei MA, Torkamanzehi A. Association between paraoxonase-1 gene polymorphisms and risk of metabolic syndrome. *Mol Biol Rep* 2012; 39(2): 937-943.

TC.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Araştırma Görevlisi Dr. Ayşen Caniklioğlu'na ait “HİPOTİROİDİLİ HASTALARDA PARAOKSONAZI POLİMORFİZMİ ve BAZI KARDİYOVASKÜLER RİSK BELİRTEÇLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ” adlı çalışma 09/08/2012 tarihinde jürimiz tarafından oy birliği/ oy çokluğu ile Biyokimya Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sabahattin Muhtaroglu (Başkan) İmza

Doç. Dr. Gülden Başkol (Danışman) İmza

Prof. Dr.Fahri Bayram..... İmza

Prof. Dr.Eser Kılıç..... İmza

Prof. Dr. Mustafa Kula..... İmza