

# Diabetes Mellitus'da Yüksek Dansiteli Lipoproteinlerin (HDL), Apoproteinlerinin İncelenmesi

Yavuz TAGA\*  
Neşe DİNLER\*\*  
Kemal ÖZKAN\*\*\*

## ÖZET

*İnsüline bağımlı, oral antidiabetik kullanan, diyet kontrolünde bulunan 36 diabetli hastanın, HDL fraksiyonu ayrılarak delipide edildi. Bu fraksiyonda poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi ile apolipoprotein dağılımları incelendi. Dansitometrik olarak incelenen değerler, 30 kişilik bir kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Oral antidiabetik ajanlar kullanan erkeklerde, HDL-A-II'nin azaldığı, HDL-A-I'in arttığı tespit edildi. Bunun dışında gruplar arasında bir fark tespit edilmedi.*

## SUMMARY

### Investigation of Apoproteins of the High Density Lipoproteins (HDL) in Diabetes Mellitus

*HDL fraction of plasma was separated in 36 diabetic patients who were insulin dependent, who were using oral antidiabetics and who were under diet control. This fraction was then delipidated and investigated by the method of polyacrylamide gel electrophoresis to show the apolipoprotein distribution. The densitometrically obtained values were compared with the values of 30 healthy controls. In men who were using oral antidiabetics, HDL-A-II values were found to be decreased and HDL-A-I, increased. There wasn't any other significant difference between the patients and controls.*

- \* Yard. Doç. Dr.; Uludağ Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Doktoru, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi  
\*\* Dr.; Uludağ Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi  
\*\*\* Prof. Dr.; Uludağ Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



Diabetes mellitusda aterosklerozis insidansının yüksek olduğunu gösteren birçok araştırma yapılmıştır<sup>1-4</sup>. Diabetin bu önemli komplikasyonunun oluşmasında, hem lipoproteinlerin hem de apolipoproteinlerin (apoprotein) yapı ve konsantrasyonundaki değişiklikler rol oynamaktadır<sup>1.2.4.5</sup>.

Son zamanlarda yapılan birçok epidemiyolojik çalışma, HDL konsantrasyonları ile, özellikle koroner aterosklerozis arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermiştir<sup>6-10</sup>.

HDL, yoğunluğu 1.063 ile 1.210 gr/ml arasında değişen heterojen bir lipoprotein grubudur. Kütlesinin yaklaşık % 50'si proteinden oluşmaktadır. Üzerinde major apoproteinler olarak A-I ve A-II, minör apoproteinler olarak da C-I, C-II, C-III, E ve D apoproteinleri bulunur. A-I ve A-II, HDL apoproteinlerinin yaklaşık % 90'nını oluştururlar<sup>6</sup>. HDL apoproteinlerinin, lipoprotein katabolizmasında önemli düzenleyici görevleri vardır. Apo A-I, Lesitin-kolesterol-açıl-transferaz (LCAT) enziminin aktivatörüdür. Apo C-II, lipoprotein lipazı (LPL) aktive eder ve gene apo A-II yardımıyla HDL partikülleri hücrel kolesterole affinite gösterirler<sup>11</sup>.

Bu çalışma, koroner aterosklerozis riski yüksek olan diabetes mellituslu hastalarda HDL apoprotein dağılımlarını incelemek ve bunu diabetik olmayan sağlıklılarla karşılaştırılarak aradaki farkları incelemek amacıyla planlandı.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Diabetes mellitus tanısı almış 36 hasta çalışma kapsamına alındı. Hastalar; insülin kullananlar (Grup A), oral antidiabetik olanlar (Grup B) ve diyetle kan şekerini düzenleyenler (Grup C) olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

Oral glüköz tolerans testi sonucu diabetes mellitus yönünden sağlıklı kabul edilen ve yaşları 20 ile 52 arasında değişen 30 kişi kontrol grubunu oluşturdu. Ortalamalar  $\pm$  standart hata olarak belirtildi. İstatistiksel yöntem olarak student (t) testi kullanıldı.

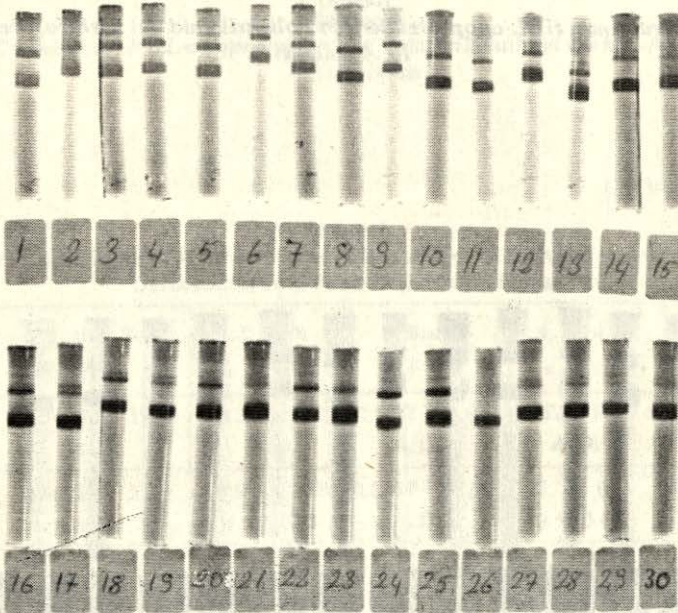
HDL fraksiyonu, taze plazmadan heparin-manganklorür yöntemi ile ayrıldı<sup>12</sup>. Bulanık olan süpernatantlar 0,45 mikrometre "pore" açıklığı olan "Millipore" filtreden süzülüler. Bu HDL fraksiyonu 3/1 oranında hazırlanmış etanol dietileter karışımı ile delipide edildi<sup>13</sup>. Örnekler, içinde 0.5 M sodyum klorür bulunan 0.2 M tris-HCL pH'sı 8.5 olan tamponda çözüldüler. Protein miktarları Lowry yöntemi ile belirlendi<sup>14</sup>. Jel başına 50 mikrogram protein olacak şekilde, 6 M üre içeren çözelti haline getirilen örnekler, 6 mm çapında ve 110 mm uzunluğundaki cam borular içinde hazırlanmış jellere uygulandı. Poliakrilamid jeller, % 10 akrilamid ve % 0.1 bisakrilamid ile hazırlandı. Tüp başına 1.5 miliamperlik akım verilerek, % 0.3 tris, % 1.44 glisin içeren ve pH'sı 8.8 olan tamponda 1.5 saat elektroforez yapıldı.

Protein bantları, % 25 izopropil alkol, % 10 glasial asetik asit içinde çözülmüş, % 0.54'lük "Coomassie brilliant blue" boyası ile bir gece boyandı. Ertesi sabah boya % 10 glasial asetik asitle değiştirildi. Bu işlem, boya giderilip bantlar ortaya çıkıncaya kadar 2-3 defa tekrarlandı<sup>15</sup>. Protein bantları 520 mm. dalga boyunda dansitometrik olarak (GELMAN, ABD) değerlendirildi.



## BULGULAR

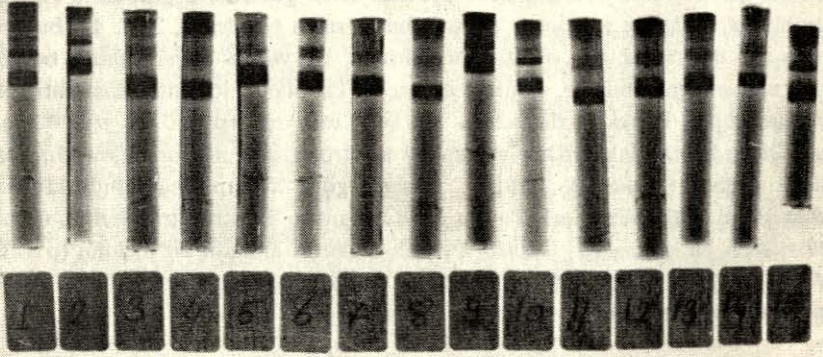
HDL- apoproteinlerinin poliakrilamid jel elektroforezi ile değerlendirilmesi için yapılan çalışma sonucunda, B ve C grupları dışında kontrol grubunda ve A grubunda jel üzerinde belirgin dört protein bantı görüldü. B grubunda 10 olguda, C grubunda 3 olguda ise beşer protein bantı vardı (Resim 1, 2, 3, 4). Bu protein bantlarının dansitometrik olarak incelenmesi ve yüzde değer olarak belirtilmesinden elde edilen sonuçlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, oral antidiabetik kullanan grupta, ikinci ve dördüncü bantların incelendiği ( $p < 0.02$ ,  $p < 0.01$ ) gözlemlendi. Diğer bantlardaki artma ve azalma kontrol grubu ile karşılaştırıldığı zaman anlamlı değildi (Tablo I). Gruplar cinslere göre ayrılıp değerlendirildiklerinde (Tablo II), B grubundaki erkeklerde birinci bantta, kontrol grubundaki erkeklerle göre anlamlı bir artma ( $p < 0.01$ ) ve ikinci bantta anlamlı bir azalma ( $p < 0.01$ ) görüldü. Bunların dışında diğer grupların kadın ve erkeklerinde birinci ve ikinci bantlarda, kontrole göre anlamlı bir fark görülmedi.



Resim: 1

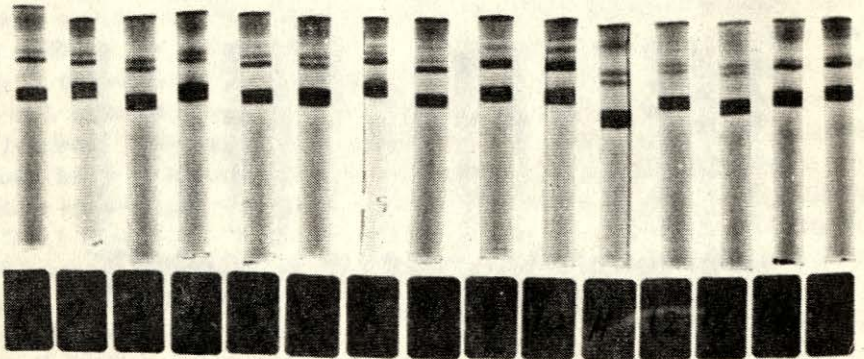
Kontrol Grubunun HDL-apoproteinlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi ile Ayrılması

A GRUBU



Resim: 2  
A Grubunun HDL-apoproteinlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi  
İle Ayrılması

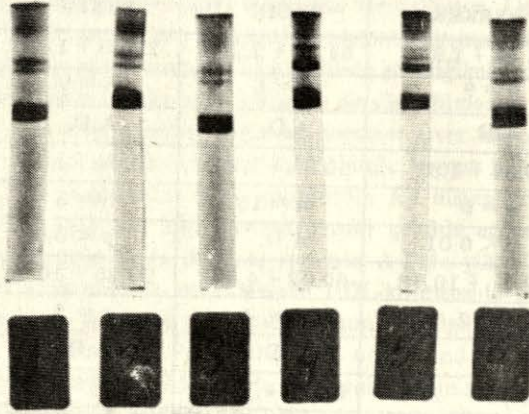
B-GRUBU



Resim: 3  
B-grubunun HDL-apoproteinlerinin Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi  
İle Ayrılması



C-GRUBU



Resim: 4  
C-grubunun HDL-apoproteinlerinin Poliakrilamid Jel Elektroforezi  
İle Ayrılması

Tablo: I  
Analitik Poliakrilamid Jel Elektroforezi İle Ayrılan, HDL-Apolipoproteinlerinin  
Densitometrik Olarak Değerlendirilmesi

	1. Bant % x $\pm$ SH	2. Bant % x $\pm$ SH	3. Bant % x $\pm$ SH	4. Bant % x $\pm$ SH	5. Bant % x $\pm$ SH
A GRUBU (n = 15)	54.32 $\pm$ 1.45 A.D.	25.12 $\pm$ 1.20 A.D.	11.07 $\pm$ 0.84 A.D.	9.62 $\pm$ 0.79 A.D.	—
B GRUBU (n = 15)	58.22 $\pm$ 2.47 A.D.	18.98 $\pm$ 2.04 p < 0.02	11.33 $\pm$ 0.78 A.D.	7.3 $\pm$ 0.7 p < 0.01	7.38 $\pm$ 0.61 —
C GRUBU (n = 6)	57.59 $\pm$ 4.28 A.D.	17.27 $\pm$ 3.97 A.D.	11.76 $\pm$ 1.2 A.D.	8.9 $\pm$ 2.03 A.D.	8.83 $\pm$ 0.62 —
KONTROL (n = 30)	54.28 $\pm$	24.82 $\pm$ 1.45	11.02 $\pm$ 0.73	10.13 $\pm$ 0.73	—

A.D.: Anlamlı Değil

*Tablo: II*  
*HDL A-I ve A-II Apolipoproteinlerinin Gruplar ve Cinsiyetler*  
*Arasında Dağılımı*

	HDL A-I		HDL A-II	
	ERKEK	KADIN	ERKEK	KADIN
GRUP A	54.45 ± 1.99	54.26 ± 2.27	22.89 ± 1.34	28.46 ± 1.42
	n = 9	n = 6	n = 9	n = 6
	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
GRUP B	64.04 ± 1.81	52.8 ± 1.93	13.04 ± 1.18	21.95 ± 2.53
	n = 5	n = 10	n = 5	n = 10
	p < 0.01	A.D.	p < 0.01	A.D.
GRUP C	52.7 ± 10.73	60.03 ± 4.4	20.35 ± 10.78	15.73 ± 4.19
	n = 2	n = 4	n = 2	n = 4
	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
KONTROL	54.98 ± 2.71	53.46 ± 1.78	22.18 ± 1.78	27.12 ± 1.75
	n = 16	n = 14	n = 16	n = 14

## TARTIŞMA

Literatürde incelediğimiz HDL apoprotein çalışmalarını<sup>11,16,17</sup>, A-I ve A-II/A-II oranı ile HDL-kolesterol düzeyleri arasında bir korelasyon bulduklarını belirtmektedirler. Gabor ve arkadaşları<sup>4</sup> ise diabetiklerde, HDL-kolesterol yönünden bir fark bulamamışlar, buna karşılık A-I ve A-II oranında bir azalma bulmuşlardır.

HDL apoproteinlerinin dağılımını gözönüne aldığımız zaman, HDL deki apoproteinlerin % 90'nının A-I ve A-II olduğu ve A-I/A-II oranında genelde 3/1 şeklinde olduğu<sup>18</sup> klasik bilgilerinden hareketle, birinci en kalın bantımızı A-I, ikinci en kalın bantımızı A-II, diğerlerini ise C, E, D apoproteinleri ile muhtemel bulaşık serum proteinleri olarak değerlendirdik. Bantlar, dansitometrik olarak değerlendirildiği ve yüzde miktarların gruplara dağılımı topluca incelendiği zaman (Tablo I), B grubunda A-II bantının (ikinci bant), kontrole nazaran anlamlı derecede düşük olduğunu tespit ettik. Bunun dışında, A-I ve A-II bantları açısından grupların kontrole göre farkları anlamlı değildi. Bununla birlikte gruplar cinslere göre ayrılarak A-I ve A-II yüzdeleri açısından değerlendirildikleri zaman (Tablo II), B grubu erkeklerinde kontrole göre, A-I yönünden anlamlı bir artış, A-II yönünden anlamlı bir azalma mevcuttu. Bunlar dışında diğer grupların kadın ve erkeklerinde, A-I ve A-II yönünden kontrole göre anlamlı bir farklılık yoktu. Dolayısıyla, Tablo I ve II'yi bir arada incelediğimiz zaman, aralarındaki en önemli farkın B grubu erkeklerinde A-I'in kadınlara ve kontrole göre daha yüksek A-II'ninde tam tersi aynı grubun kadınlarına ve kontrole nazaran daha düşük olduğunu gördük. Diğer bir deyişle biz HDL A-I ve A-II apoproteinleri yönünden yaptığımız incelemede, insüline bağımlı A grubu ve diyetle diabetini kontrol eden C grubu ile kontroller arasında bir fark



tespit etmedik. Ayrıca HDL-kolesterol değerleri ile A-I apoproteinleri yönünden de gerek genel olarak gerekse cinsler arasında bir fark göremedik<sup>19</sup>. Hatta özellikle oral antidiabetik alan erkeklerde, HDL-kolesterolü kontrole nazaran düşük olmasına rağmen, A-I anlamlı derecede yüksek, A-II düşüktü<sup>9</sup> (Tablo II). Dolayısıyla en azından oral antidiabetiklerin HDL apolipoproteinleri üzerine A-I'i arttırıcı, A-II'yi azaltıcı yönde bir etki oluşturabilecekleri sonucuna varmaktayız. Literatürde rastlayabildiğimiz diabet HDL apoprotein ilişkisini inceleyen çalışmalarda, diabet grupları, bizdeki gibi birbirinden ayrılmamıştır<sup>4</sup>. Literatürde gördüğümüz kadarıyla oral antidiabetiklerin belirttiğimiz tarzda bir etkisinden de söz edilmemektedir<sup>4.11.16.17</sup>.

Bugüne kadarki bilgilerimizin ışığında, koroner arter hastalığı riski ile HDL kolesterol düzeyleri arasında negatif bir ilişki olduğu hemen hemen kesindir<sup>6-10</sup>. Son zamanlarda bazı araştırmacılar HDL apoprotein A-I düzeyinin HDL kolesterol düzeyini yükselten ve düşüren faktörlerden benzer şekilde etkilendiğini ve HDL-kolesterolü yükselten faktörlerin HDL-apoprotein A-I'de yükselttiğini göstermişlerdir<sup>20</sup>. Bizim B grubumuzun erkeklerinde HDL-kolesterolü düşük bulunurken A-I'i yüksek bulmamız, Assmann ve arkadaşlarının<sup>20</sup> bulgularına uyum göstermektedir. Burada belirtmekte yarar gördüğümüz nokta oral antidiabetiklerin HDL A-I apoproteinini üzerine etkileri literatürde rastlayabildiğimiz kadarıyla henüz incelenmemiştir. Dolayısıyla oral antidiabetik alan erkeklerde HDL apo A-I, HDL kolesterol ve aterosklerozis insidansı ilişkilerini daha dikkatle incelemek gerekir düşüncesindeyiz.

#### KAYNAKLAR

1. WILSON, D.E., BROWN, W.V.: Lipids and Lipoproteins in diabetes mellitus, In: Advances in Modern Nutrition. (eds: Katren, H.M., Mahler, R.J.), 2 (pt.1), 1978, p. 127.
2. FEDELE, D., RENATO, F., LAPOLLA, A.: Serum lipid and lipoprotein levels and metabolic control in insulin-treated diabetics. Acta Diabetol Lat, 19: 151, 1982.
3. BIERMAN, E.L., GLOMSET, J.A.: Disorders of Lipid Metabolism. In: Textbook of Endocrinology. (ed. Williams, R.H.) 5th edition, W.B. Saunders Co., Philadelphia, London, Toronto, 1974, p. 890.
4. GABOR, J., SPAIN, M., KALANT, N.: Composition of serum verylow-density and high-density-lipoproteins in diabetes. Clin Chem, 26: 1261, 1980.
5. National Heart and Lung Institute Task Force on Arteriosclerosis. 2, U.S. Gout. Printing Office, Washington DC, p. 100, 1971.
6. MAHLEY, R.W.: Atherogenichyper lipoproteinemia. In: Symposium on Lipid Disorders. The Medical Clinics of North America. (ed. Havel, R.J.), Vol: 66 (2), W.B. Saunders Co, Philadelphia, p. 375-1982.
7. GORDON, T., CASTELLI, W.P., HJORLAND, M.C.: High density lipoproteins as a protective factor against coronary heart disease. Am J Med, 62: 707, 1977.



8. RHOADES, G.G., GULBRANDSEN, C.L., KAOAN, A.: Serum lipoproteins and coronary heart disease in a population study of Hawaii Japanese men. *N Engl J Med*, 294: 293, 1976.
9. MILLER, N.E., FORDE, O.H., THELLE, D.S.: High density lipoprotein and coronary heart disease: A prospective case-control study. *Lancet*, 1: 965, 1977.
10. JENKINS, P.J., HARPER, R.W., NESTEL, P.S.: Severity of coronary atherosclerosis related to lipoprotein concentration. *Br Med J*, 2: 388, 1978.
11. FIDGE, N., NESTEL, R., ISHIKAWA, T., REARDON, M., BILLINGTON, T.: Turnover of apoprotein A-II of high density lipoprotein and the relationship to other lipoproteins in normal and hyperlipidemic individuals. *Metabolism*, No: 7, July, 29: 643, 1980.
12. WARNICK, G.R., ALBERS, L.L.: A comprehensive evaluation of heparin-manganese precipitation procedure for estimating high-density-lipoprotein-cholesterol. *J Lipid Res*, 19: 66, 1978.
13. MAHLEY, R.W., WEISGRUBER, K.H.: Canine Lipoproteins and atherosclerosis. 1. Isolation and characterization of plasma lipoproteins from control dogs. *Circ Res*, 35: 713, 1974.
14. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FAR, A.L., RANDALL, L.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265, 1951.
15. GABRIEL, O.: Analytical Disc Gel Electrophoresis. In *Methods in Enzymology* (ed: Jakoby. W.B.). Vol: XXII, Academic Press., New York, 1971, p. 565.
16. CHEUNG, M.C., ALBERS, J.J.: The measurement of apolipoprotein A-I and A-II levels in man and women by immunassay. *J Clin Invest*, 60: 43, 1977.
17. CURRY, M.D., ALAUPOVIC, P., SUENRAM, C.A.: Determination of apolipoprotein A and its constitutive A-I and A-II polypeptides by separate electroimmunassays. *Clin Chem*, 22: 315, 1976.
18. SCHAEFER, E.J., EISENBERG, S., LEVY, R.S.: Lipoprotein apoprotein metabolism. *J Lipid Res*, 19: 667, 1978.
19. TAGA, Y., DİNLER, N., ÖZKAN, K.: Diabetes mellitusda lipit metabolizmasının genel olarak incelenmesi, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisinde yayınlanmak üzere sunuldu (1984).
20. ASSMANN, G., FUNKE, H., SCHRIEWER, H.: The relationship of HDL apoprotein A, and HDL-cholesterol to risk factors of coronary heart disease. *J Clin Chem Biochem*, 20: 287, 1982.

Yard. Doç. Dr. Yavuz TAGA  
 U.Ü. Tıp Fakültesi  
 Biyokimya Anabilim Dalı  
 Öğretim Üyesi  
 BURSA