

T1405

4



T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

+

**İDİOPATİK GLOMERÜLER KAPİLLER DUYARLI
BOZUKLUKLARINDA
PLAZMA PROTEİNLERİNİN YAPISAL
BOZUKLUĞUNUN DENATÜRASYONLA
GÖSTERİLMESİ.**

UZMANLIK TEZİ

DR. NEVZAT ÇAVUŞLU

T1405/1-

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR. SUAT ARTVINLİ

“Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonunca 98020103-01 proje no ile desteklenmiştir.”

“Tezinden kaynakça gösterilerek yararlanılabilir.”

ANTALYA , 2002

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ

TEŐEKKÜR

Tez çalıŐmalarım ve uzmanlık eğitimim sũresince tũm bilgi birikimi ve deneyimleriyle beni destekleyen çok değerli hocam Prof. Dr. Suat Artvinli baŐta olmak üzere tũm hocalarıma ve beraber çalıŐmaktan zevk duyduğum araştırma gũrevlisi ve uzman arkadaŐlarıma sonsuz teŐekkũrler.

**Dr. Nevzat avuşlu
Antalya , 2002**

TABLolar DİZİNİ

<i>Tablo.1. Nefrotik Sendrom Nedenleri</i>	5
<i>Tablo.2. İdiopatik Nefrotik Sendrom Oluşumunu Tetikleyebilen Etkenler</i>	8
<i>Tablo.3. Erişkin ve Çocukta Serum Tot. Kolesterol, Total Fosfolipid, Trigliserit Düzeyleri</i>	18
<i>Tablo.4. Normal İnsan Plazmasının Lipoprotein Tipleri ve Özellikleri.</i>	19
<i>Tablo.5. Normal Serum Elektroforetik Fraksiyonlarının Protein Alt Grubları</i>	23
<i>Tablo.6. Çalışmaya Alınan Normal ve İdiopatik NS lu Hasta Grublarının Özellikleri</i>	25
<i>Tablo.7. Üre Denaturasyonu Karışımının Hazırlanışı</i>	28
<i>Tablo.8. 2-ME Denaturasyonu Karışımının Hazırlanışı</i>	30
<i>Tablo.9. Fosfolipid Yakma İşlemi</i>	33
<i>Tablo.10. Fosfor Tayini</i>	33
<i>Tablo.11. Normal ve Nefrotik Kişilerin Yaş Dağılımı ve Serum Albumin, I. Prot, TG ve T.Kol Miktarları</i>	39
<i>Tablo.12. Normal ve Nefrotik Kişilerde Üre Denaturasyonu Sonrası Albumin /Globulin(A/G) Değerleri</i>	40
<i>Tablo.13. Üre Denaturasyonu Öncesi ve Sonrası Normal ve Nefrotik SPE Fraksiyonlarının Protein Alt Grubları Yüzdeleri</i>	41
<i>Tablo.14. 2-ME le Denatüre Edilmiş Normal ve Nefrotik Serumun T Kol Değerleri</i>	42
<i>Tablo.15. 2-ME le Denatüre Edilmiş Normal ve Nefrotik Serumun TG Değerleri</i>	43
<i>Tablo.16. Üre Denaturasyonu Sonrası BCG Boya Bağlama Yöntemiyle Albumin Değerleri</i>	44
<i>Tablo.17. Normal ve Nefrotik Kişilerdeki Fosfolipid Miktarları</i>	44
<i>Tablo.18. Üre Denaturasyonu Sonrası BCG Boya Bağlama Yöntemiyle Albumin Değerleri</i>	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.1. Glomerül ve çevresel yapıların şematik görünümü.	4
Şekil.2. Glomerüler yapının elektron mikroskopik görünümü	4
Şekil.3. Normal glomerüler kapiller duvarının elektron mikroskopik görünümü	5
Şekil.4. Disülfid bağının performik asid ile oksidatif ya da merkaptetanol ile redüktif olarak bozulması ve sisteik asid veya sisteinil grupların oluşturulması.	11
Şekil.5. Üre ve merkaptetanolle protein denaturasyonu.	12
Şekil.6. Albuminin α katlantıları ve β uzantılarının tersiyer yapısı. Albuminin önden ve sağ yandan görünümü Baz rezidüleri, asidik rezidüleri ve nötral rezidüleri	13
Şekil.7. Albumin boyutları, domain I, II, III dizilimi ve disülfid bağları.	14
Şekil.8. Albumin domainlerindeki 10 helikal segment arası S-S bağları ve subdomain A ve B	14
Şekil.9. pH'nın azalmasıyla albuminin üç boyutlu yapısındaki açılma	14
Şekil.10. Normal plazmanın ağırlıkça lipid içerikleri dağılım %'leri	19
Şekil.11. a) Normal SPE ve elektroforotik jel görünümü. b) Elektroforotik bantlardaki protein dağılımı.	24
Şekil.12. Standart-I ve II kullanılarak hazırlanan fosfor standart grafiği ve r değeri.	34
Şekil.13. Normal ve nefrotik serumda albumin ve total protein düzeyleri	45
Şekil.14. Normal ve nefrotik serumda T.Kol ve TG düzeyleri	45
Şekil.15. a) Normal-nefrotik serumun üre denaturasyonu ile SPE A/G oranları değişimi. b) Normal-nefrotik serumun üre denaturasyonu ile kontrol test A/G oranları ve test (A/G)/kontrol (A/G) değerleri.	46
Şekil.16. Normal-nefrotik serumun üre denaturasyonu ile SPE alb-glob değişimi.	46
Şekil.17. Normal-nefrotik serumda üre etkisinin SPE ile gösterilmesi	47
Şekil.18. Normal serumda üre inkubasyonu sonrası SPE protein bantlarının % değişimi	48
Şekil.19. Nefrotik serumda üre inkubasyonu sonrası SPE protein bantlarının % değişimi	48
Şekil.20. Farklı derişimlerdeki 2-ME ün normal-nefrotik serum t.kol düzeylerine etkisi	49
Şekil.21. 2-ME ün serum total kolesterol düzeyine etkisi	49
Şekil.22. Farklı derişimlerdeki 2-ME ün normal-nefrotik serumda TG düzeyine etkisi.	50
Şekil.23. 2-ME ün serum TG düzeyine etkisi	50
Şekil.24. Normal ve nefrotik bireylerin total fosfolipid değerleri dağılımı	51
Şekil.25. Normal ve nefrotik bireylerin total fosfolipid değerleri	51

KISALTMALAR

NS	: Nefrotik sendrom
GBM	: Glomeruler bazal membran
PAN	: Puromisin aminonükleozid
HSA	: Human serum albumin
AGE	: Agoroz jel elektroforez
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforez
IEF	: Izo elektrik fokuslama
MCD	: Minimal değişiklik hastalığı
BCG	: Bromcresol green
SPE	: Serum protein elektroforoezi
TG	: Trigliserid
T. Kol.	: Total kolesterol
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
IDL	: Ara yoğunluklu lipoprotein
2-ME	: 2-merkaptetanol
AIDS	: Kazanılmış immun yetmezlik sendromu
EBV	: Ebstein barr virus
DBT	: Difteri boğmaca tetanoz
Fsgs	: Fokal segmental glomerulo skleroz
IDDM	: İnsulin bağımlı diabetes mellitus
HLA	: İnsan lökosit antijeni
IL-2	: İnterlökin-2
AFP	: Alfa fetoprotein
AMG	: Alfa-2 makroglobulin
Hp	: Haptoglobin
Apo B	: Apolipoprotein B
Apo C-II	: Apolipoprotein C-II
Apo (a)	: Apolipoprotein(a)
LPL	: Lipoprotein lipaz
LCAT	: Lesitin kolèsterol açıl transferaz
PC	: Fosfotidil kolin
HMGKoA	: Hidroksi metil glutaril Ko enzim A
Lp (a)	: Lipoprotein (a)
BMI	: Vücut kütle indeksi
SF	: Serum fizyolojik
E-DEE	: Etanol-Dietileter
ANSA	: Amino naftol sülfonik asid
A/G	: Albumin/Globulin
ADR	: Adriamisin
AAT	: Alfa-1 antitripsin

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1-3
2. GENEL BİLGİLER	4-24
2.1. NEFROTİK SENDROM	4-10
2.1.1. <i>Nefrotik Sendrom Tanımı</i>	4-5
2.1.2. <i>Nefrotik Sendrom Nedenleri ve İdiopatik Nefrotik Sendrom</i>	5-9
2.1.3. <i>Kongenital Nefrotik Sendrom</i>	9-10
2.2. PROTEİN DENATURASYONU	10-12
2.2.1. <i>Hidrojen Bağlarının Kırılması</i>	11
2.2.2. <i>Hidrofobik Etkileşimlerin Bozulması</i>	11
2.2.3. <i>Elektrostatik Etkileşimlerin Bozulması</i>	11
2.2.4. <i>Disülfid Bağlarının Bozulması</i>	11-12
2.2.5. <i>Üre ve Guanidin Hidroklorürün Albumine Etkisi</i>	12
2.3. ALBUMİN	13-18
2.3.1. <i>Albumin Yapısı</i>	13-14
2.3.2. <i>pH'nın Albumine Etkisi</i>	14
2.3.3. <i>Albumin Sentezi, Albuminin Bazı Fizyopatolojik Özellikleri ve Nefrotik Sendrom Albumini</i>	15-17
2.3.4. <i>Albuminin Genetik Varyantları</i>	17-18
2.4. LİPOPROTEİNLER	18-23
2.4.1. <i>Serum Lipid ve Lipoproteinleri</i>	18-21
2.4.2. <i>Nefrotik Sendromdaki Lipid ve Lipoprotein Değişiklikleri</i>	21-23
2.5. PLAZMA PROTEİNLERİNİN ELEKTROFORETİK GRUPLANMASI	23-24
3. MATERYAL-METOD	25-35
3.1. NORMAL VE NEFROTİK HASTA GRUBLARININ SEÇİMİ	25-26
3.2. TOTAL PROTEİN VE ALBUMİN (BCG ile) TAYİNİ	26
3.2.1. <i>Total Protein Tayini</i>	26
3.2.2. <i>Albumin (BCG ile) Tayini</i>	26

3.3. ÜRE DENATURASYONU ve PROTEİN ELEKTROFOREZİ	27-29
3.3.1. Üre Denaturasyonu	27-28
3.3.2. Protein Elektroforezinin Yapılışı	28-29
3.4. 2-MERKAPTOETANOL (2-ME) DENATURASYONU, SERUM TG VE TOTAL KOLESTEROL DÜZEYLERİ TAYİNİ	29-31
3.4.1. Merkaptoetanol Denaturasyonu	30
3.4.2. Total Kolesterol Tayini	31
3.4.3. Trigliserit Tayini	31
3.5. FOSFOLİPİD DÜZEYİ TAYİNİ	31-35
3.5.1. Prensiip	31
3.5.2. Çözeltiler	32
3.5.3. Deneyin yapılışı	32-34
3.5.4. Fosfor Standart Grafiği Hazırlanışı	34-35
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	35
4. SONUÇLAR	36-51
5. TARTIŞMA	52-57
6. ÖZET	58
7. ABSTRACT	59
8. KAYNAKLAR	60-65

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nefrotik sendrom (NS), Glomeruler bazal membran (GBM) geçirgenliğinin bozulmasıyla çeşitli makromoleküllerin, özellikle albuminin (seçici proteinüri) idrarla yaygın atılımı ve protein yitimine bağlı olarak bir seri metabolik fiziksel ve biyokimyasal değişikliklerle ortaya çıkan klinik tablo bütünü olarak tanımlanagelmiş bir olgudur. N.S. a damgasını vuran en önemli protein serum albuminidir. NS de temel olay albumin kaybıdır ve ağır proteinürüdür. Bununla beraber hiperlipidemi, hipoalbuminemi ve ödem, N.S. un dört temel klinik ve biyokimyasal tanı koydurucu özelliğidir. Albumin ve bir grup protein kaybıyla ortaya çıkan bir seri olay sonrası, birçok sistemi ilgilendiren bozukluklar görülür. Her ne kadar NS renal GBM yi ilgilendiren patolojik sebeblere dayandırılrsa da , NS da albumin ve diğer plazma proteinlerinde yapısal bozuklukların varlığının ortaya konması ve genel sitotoksik ilaçlarla örneğin; puromisin aminonükleozid (PAN), adriamisin (ADR) deneysel N.S. oluşturulabilmesi olayın sadece böbreğe lokalize olamayacağına işaret etmektedir (1-7). Çok farklı etyolojik faktörün N.S. oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Deneysel N.S. oluşumu sırasında glomerüler hücrelerden interlökin salınımı patogeneizde immunolojik boyutun olduğunu da güçlendirmiştir (8). N.S. oluşumundan sorumlu tutulan kompleks immun tetikleyici faktörlere ve multisistemik tutulumu olan birçok durumda da NS un klinik biyokimyasal parametrelerinin ortaya çıkmasına rağmen N.S. oluşumunda sadece renal etyopatogeneze dikkat çekilmiştir.

Normal insan serum albumini (HSA), non-denaturan koşullarda agaroz jel (AGE) veya seluloz asetat serum elektroforezinde protein boyaları ile görüntülendiğinde, genellikle homojen anodik tek band oluşturur (9). Daha önceki çalışmalarda normal proteinlerin üre ile denaturasyonu sonucu daha katyonik izoformlarının ayrıldığı tespit edilmiştir. Albuminin pI değeri, kullanılan metoda göre 4.0-5.8 arasında değişen bir değerdir(10). Albuminin çok büyük miktarı 67.000 Kd luk moleküler ağırlıklı monomeri ve geri kalan kısmı polimerleri ve fragmanlarıdır. Affinite kromatografi ile saflaştırılmış HSA, SDS-PAGE (sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez) sonrası western blot tekniği

ile izlendiğinde monomerik-oligomerik olarak görülür(11). Nefrotik serumdan psödoglikand kromatografisi ile saflaştırılmış protein, % 1 agaroz jelinde, pH 4-7 arasında izoelektrik odaklama (IEF) ile ayrıştırılıp anti-albumin antikoru ile ve gümüş boyaları görünür hale getirildiğinde, pI 4.7 etrafında merkezleşmiş bandlar şeklinde görülür(1). Üre kullanılarak ultra thin-layer IEF yapılarak HSA'nın genetik varyantları araştırılmış; normal albuminde iki asidik ve iki bazik izoformu olan mikroheterojenöz yapı tespit edilmiştir (12). Katyonik albumin, albumin fraksiyonundan ayrı değildir. Minimal change disease (minimal değişiklik hastalığı-MCD) de albuminin iki formu rapor edilmiştir(1,2). Birisi serum albumininin ana komponenti olan anyonik izoform, diğeri üriner albuminin ana komponenti olan daha az anyonik izoform. Ayrıca albumin katyonik globulin fraksiyonunda da tespit edilmiştir (2). Bu çalışmalar nefrotik serumda görülüp normal AGE de görülmeyen katyonik albumin hakkında görüş vermektedir. Tüm bunlara göre, HSA'nın hem normalde hem de nefrotiklerde mikroheterojen olduğu literatür bulguları ile ortaya konmaktadır.

Bu çalışma ile idiopatik N.S. da HSA de yapısal bir bozukluk olup olmadığı, rutin laboratuvara uygulanabilen bir yöntemle araştırıldı. Bu amaçla normal ve nefrotik serumların üre ile denature edilmiş ve edilmemiş örnekleri, 24 saatlik inkubasyon sonrası agaroz jelinde serum protein elektroforezi ile irdelendi. Nefrotik ve normal albuminin üreye karşı davranışında fark olup olmadığı, bromcresol green (BCG) bağlama kapasitesinde de değişiklik olup olmadığı araştırıldı. İdiopatik nefrotik sendromun etyopatogenezinde, albumin yapısındaki bozukluğun önemli rolünün olabileceği ve bunun defektif polimerizasyona bağlı olabileceği araştırıldı.

N.S. nin diğer önemli bulgusu hiperlipoproteinemi olup serumda trigliserit (TG), total kolesterol (T.Kol) ve fosfolipidlerin artışı şeklinde gözlenir. Bu durumun, albumin kaybına bağlı olan protein eksikliğini kompanse etmeğe çalışan karaciğerin, protein sentezini arttırmasından dolayı ortaya çıktığı ileri sürülmüştür. Buna karşın yapılan bazı çalışmalarda N.S. da karaciğerde lipoprotein sentezinin arttığını yansıtacak şekilde kolesterol ve TG sentezinin arttığı gösterilememiştir (1). Ayrıca N.S. da, turnoverı, boyutları (1) ve endojen enzimatik aktivatörleri yönünden normal olmayan bir yapıda HDL (yüksek yoğunluklu

lipoprotein), VLDL(çok düşük yoğunluklu lipoprotein) ve LDL (düşük yoğunluklu lipoprotein) nin bulunduğu rapor edilmiştir (3-6). Bu yapısal bozukluğun varlığını bir kez daha kanıtlamak amacıyla, bu çalışmada protein disülfid bağlarını indirgeyen 2-merkaptoetanol (2-ME) ile total serum proteinleri denatüre edildi. Normal ve nefrotik serum lipoproteinlerinin bu denatüran etkiye karşı yanıtlarının farklı olup olmadığı, lipoproteinlerin lipid bileşkenlerinden olan TG ve T.Kol miktarlarıyla izlendi. Yapısal bozukluğun yardımcı bir kanıtı olarak serum fosfolipid miktarları da araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NEFROTİK SENDROM

2.1.1 Nefrotik Sendrom Tanımı.

Nefrotik sendrom aşağıdaki bulguları içeren klinik kompleksi tanımlar (13);

- 1) Ağır proteinüri; idrarda günde 3.5 gr yada daha fazla protein yitilmesi.
- 2) Yaygın ödem; en belirgin klinik bulgudur.
- 3) Hipoalbuminemi; plazma albumininin 100 mL de 3 gr in altında olması.
- 4) Hiperlipidemi ve lipidüri

Hastalığın patogenizden sorumlu mekanizma bilinmemekle birlikte immun mekanizmaların rol oynadığına ilişkin kanıtlar vardır. Hastalığın tiplerine göre azotemi, hematüri, hipertansiyon kliniğe eşlik edebilir. Nefrotik sendromun bileşenleri birbiriyle mantıksal bir ilişki taşırlar. Başlangıç olayı glomerüler kapiller duvarının bozukluğu gibi görünmekte olup, bu da plazma proteinlerine geçirgenliğin artışı ile sonuçlanır. Normal böbrek endoteli ile birlikte glomerüler kapiller duvar, GBM ve visseral epitelyal hücreler glomerüler filtratın geçebilmesi için bir bariyer görevi yapar. Herhangi bir yapısal ya da fizyokimyasal değişikliğe bağlı geçirgenlik artışı plazma proteinlerinin glomerüler filtrata kaçmasına neden olur. Ağır proteinüri ile serum albumini azalır, sonuçta hipoalbuminemi ve tersine dönmüş albumin/globulin oranı gelişir. Hiperlipideminin oluşum nedeni karanlıktır. Olasılıkla hipoalbuminemi lipoproteinleri de içeren tüm plazma proteinlerinin sentezini arttıran tetiği çeker. Lipoproteinlerin periferik yıkımı da azalmış olabilir(13,14).

Şekil.1. Glomerül ve çevresel yapıların şematik görünümü(Nelson Textbook of Pediatrics 16th ed.).

Şekil.2. Glomerüler yapının elektron mikroskopik görünümü(www.ulb.ac.be/science/biodic).

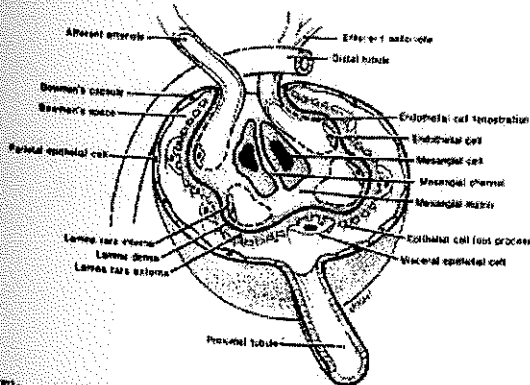
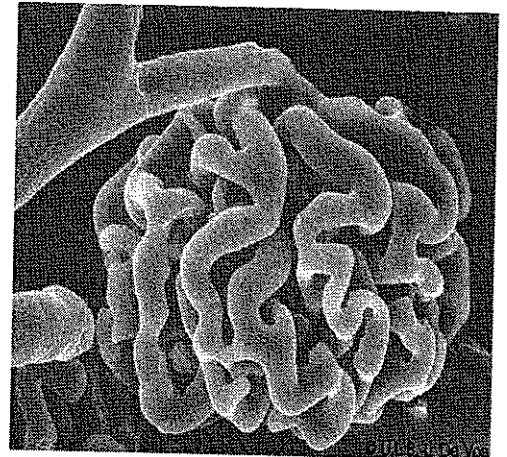
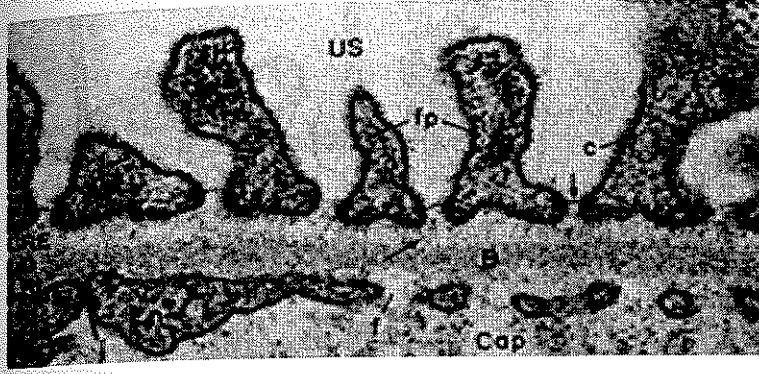


Figure 516-3 Schematic depiction of the glomerulus and surrounding structures.





Şekil.3. Normal glomerüler kapiller duvarının elektron mikroskopik görünümü. Endotel (en), endotel pencereleri(f), glomerüler bazal membran (B), santral yoğun tabaka; lamina densa(LD), lamina rara interna (LRI) ve eksterna (LRE), epitelial ayaklı çıkıntı(fp), hücresel ince tabaka(c). Glomeruler filtrat endotel pencereyi, bazal membranı ve filtrasyon yarığını geçer.Epitelial hücre ayaklı çıkıntıları arasından idrar boşluğuna (US) akar.(Nelson, Textbook of Pediatrics, 16th Edi. Behrman, Kliegman, Jenson. dan alınmıştır.)

2.1.2. Nefrotik Sendrom Nedenleri ve İdiyopatik Nefrotik Sendrom

Nefrotik sendrom tanımına uyan primer yada sekonder birçok olay tanımlanmıştır. Nefrotik sendrom sınıflaması değişik şekillerde yapılmıştır. En kabul gören sınıflamalardan biri aşağıdaki gibidir.

Tablo.1 Nefrotik Sendrom Nedenleri(13).

A) Primer Nefrotik Sendrom

1) Glomerulonefrit olmaksızın

Minimal lezyon hastalığı (İdiyopatik NS.)

Fokal segmental glomeruloskleroz (İdiyopatik NS.)

Kongenital nefrotik sendrom

2) Glomerulonefrit ile birlikte

Mezengial proliferatif glomerulonefrit (İdiyopatik NS.)

Membranoproliferatif glomerulonefrit

Membranöz nefropati

Akut postenfeksiyöz glomerulonefrit

B) Sistemik Hastalıklara Bağlı Nefrotik Sendrom

1) Enfeksiyonlar

- Viral (AIDS (kazanılmış immün yetmezlik sendromu), hepatit B, sitomegalovirus, EBV (ebstein barr virus) enfeksiyonları v.b.)
- Bakteriyel (subakut bakteriyel endokardit, şant nefriti vb.)
- Paraziter (malarya, shistozoma vb.)

2) Malign Hastalıklar

- Lenfoma ve lösemi
- Solid tümörler (Wilms tümörü, karsinomlar vb.)

3) Metabolik hastalıklar

- Diabetes mellitus
- Hipotroidi

4) İnflamatuar hastalıklar

- Sistemik Lupus Eritematozus
- Sistemik Vaskulit
- Henoch-Schönlein purpurası
- Romatoid Artrit

5) Diğer Hastalıklar

- Orak hücreli anemi
- Böbrek ven trombozu
- Hemolitik üremik sendrom

C) Ekzojen Maddelere Bağlı Nefrotik Sendromlar

- 1) Allerjenler(polenler, venomlar vb.)
- 2) Aşılarda (DBT (difteri boğmaca tetanoz)vb.)
- 3) Toksik maddeler(Ağır metaller, altın, eroin vb.)
- 4) İlaçlar (kaptopril, penisilamin vb.)

İdiopatik nefrotik sendrom tanımı, birbiri arasında değişim gösterebilen 3 farklı histopatolojik görünümle uyumlu, nedeni bilinmeyen (nefrotik görünümle uyumlu klinik bulgulara neden olan etkenin, tetiği çeken faktörün tam olarak tanımlanamadığı) klinik bir görünümdür. İdiopatik nefrotik sendromda histopatolojik görünüm 3 şekilde olabilir. İdiopatik nefrotik sendromda 3 histo-patolojik durum sözkonusudur (14):

- 1) Minimal change disease; % 85 (MCD)
- 2) Focal segmental glomerüloskleroz; % 10 (Fsgs)
- 3) Mesengial proliferasyon; %5

Bu lezyonlar farklı farklı hastalıklarla ilgili değildir ancak prognozları farklıdır. MCD ve fokal segmental glomerulosklerozun erken dönemleri histopatolojik olarak ayırt edilemeyecek kadar birbirine benzer. Deneysel nefrotik sendrom modelleri de (amino glikozid puromisin ile ratlarda) bu histopatolojik görünümle uyumludur. Tek doz puromisin verilen ratlarda minimal change nefrotik sendrom oluşurken, tekrarlayan dozlarda puromisin verildiğinde progressif glomerüloskleroz olduğu tespit edilmiştir. Puromisin aminonükleozid glomerül epitel hücre apoptozuna neden olur (15). Tüm bunlar idiyopatik nefrotik sendromun, etyolojisi ve patogenezi bilinmeyen, böbrekte MCD, Fsgs ve mezengial proliferasyon gibi değişik evrelerde değişik histopatolojik görünümle uyumlu bir hastalık olduğuna işaret etmektedir(13).

İdiopatik nefrotik sendrom primer bir hastalıktır. Birçok üst solunum yolu enfeksiyonu (en sık sebep olduğu düşünülen etkendir), allerjik reaksiyon ya da tablo.1 ve 2 de gösterilen birçok etken hastalığı tetikleyebilir ya da tekrarlamasına neden olabilir. Hodgkin lenfoma, mikozis fungoides (T cell maling lenfoma) ve diğer birçok neoplastik oluşumda da rapor edilmiştir. Paraneoplastik nefroz patofizyolojisi aydınlatılamamıştır. İnsuline bağımlı diabetes mellitus (IDDM) oluşumuyla MCD arası ilişki bulunmuştur (16,17).

İdiopatik NS nin ailesel sıklığı gösterilmiştir. HLA (Human Leucocyte Antigen)-B 12, HLA-DRW 7, HLA-DRW 8 ve idiyopatik N.S. arası ilişki tespit edilmiştir. İdiopatik N.S.

ın immunolojik temele dayandıran başka çalışmalar da vardır. T4 ve T8 hücrelerinin azaldığı ya da arttığını gösteren çalışmalar yapılarak bu hastalığın T lenfosit fonksiyonu bozukluğuna bağlı olabileceğine işaret edilmiştir. N.S. da concanavalin ve fitohemaglutinin gibi poliklonal aktivatörlere lenfosit direnci vardır. IL-2 (interlökin-2)reseptörleri remisyonda normal iken, proteiniirik fazda artmıştır. İdiopatik N.S. un immunsupressif ve steroide sıklıkla yanıt vermesi, immunolojik patogenezi gösteren önemli bir kriterdir. İdiopatik NS de IgM den IgG oluşumunun bozuk olduğu gösterilmiştir (18). Yine B hücrelerinden IgG sentezinin düşük olduğu gösterilmiştir (19). Ancak başka bir in-vivo çalışmada deneysel nefrotik ratlarda, Ig G nin normal üretime karşın artmış katabolik hızları tespit edilmiştir (20).

Tüm bunlar, bu hastalıklarla N.S. arasında major histokompatibilite kompleksi genleri ile immunolojik temele dayalı bir patogenetik ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Bu da idiyopatik N.S. un böbrek hasarı oluşumunun yanısıra diğer sistemik birçok değişime de neden olabileceği ya da diğer sistemik değişimler sonucu renal hasarın olabileceğini düşündürmektedir.

Tablo.2. İdiopatik Nefrotik Sendrom Oluşumunu Tetikleyebilen Etkenler (13).

A) İlaçlar ve ağır metaller:

- Non-steroid'anti inflamatuvar ilaçlar;
Tolmetin, indometazin, sulindak, 5-amino salisilik asit, salisilat, zomepirak, pirpropen, naproksen, fenoprofen, ibuprofen, diclofenak
- D-penisilamin
- Lityum
- Civa, altın
- Trimetadion

B) Allerji :

- Polen
- Yiyecek allerjisi
- Arı sokması
- Kontakt dermatit, sarmaşık, meşe zehirlenmesi,

C) Malignensi :

- Karsinom,
- Sarkom,
- Lenfositik lösemi,
- Hodgkin's Hastalığı,
- Mikozis fungoides

D) Immunizasyon

E) Diğerleri

- Shistozoma hametobium infeksiyonu,
- EBV primer infeksiyonu,
- AIDS(?)

Nefrotik sendrom patogeneğinde glomerüler geçirgenlik artışı önemlidir. İdiyopatik nefrotik sendromda bu olay tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Kapiller duvarda negatif yüklü glikoproteinlerin kaybı bununla ilgili olabilir.

2.1.3. Kongenital Nefrotik Sendrom

Kongenital NS tanımlamasına uyan çoğu genetik temele dayalı, birçok alt grubu vardır. Bunlardan en bilineni "mikrokistik hastalık" olarak bilinen, proksimal tubuler kistik dilatasyonların görüldüğü hipoalbuminemi kadar hipogammaglobulineminin de şiddetli olduğu klinik olarak protein kaybına bağlı sekonder bulguların (venöz tromboz, hipotroidizm, hiperkolesterolemi vb.) yanı sıra , birçok sistemik antitenin de (epilepsi ingiunal herni, gelişme geriliği vb.) olduğu Finnish tipi kongenital NS'dir. Bu hastalıkta tip-4 kollajen, laminin, Ig ve kompleman tespit edilememiştir (21). Finnish tipi NS otozomal

resesif geçişli gen ürünü bilinmeyen, antenatal tanısı 16-20 haftalar arası yüksek AFP düzeyi ile konulabilen bir hastalıktır. Ancak glomerüler bazal membran içeriğinde fonksiyonel anormalliğe neden olan bir durum söz konusu olabilir. Bazal membran lamina eksterna rara da hiper anyonik proteoglikan heparan sülfat patogenezi de önemlidir. Burada heparan sülfat kaybı tanımlanmıştır. Ancak GBM matriks komponentlerinin belirgin olarak normal olduğunu gösterir çalışmalar da vardır. Tüm bunlar Finnish tipi kongenital NS nin karmaşık bir zeminde, bir çok klinik durumun yanında, renal protein kaybının da olduğu bir durum olduğuna işaret eder(13).

Drash sendromu (nefropati, erkek psödohermafrotizm, Willm's tümörü), Galloway-Movat sendromu (mikrosefali, giral abnormalite, renal defekt) (22), diğer önemli kongenital NS nedenleridir. Bunların yanında kongenital NS mukopolisakkaridozlarda, infantil sialik asid depo hastalığında, karbohidrat yetmezlikli glikoprotein sendromu, nail-patella sendromu ve Löw's sendromu gibi durumlarla da birlikte olabilir.

Kongenital NS nin diğer nedenlerinde de, renal patolojinin yanısıra tüm sistemleri ilgilendiren patolojik durumların olabildiği görülmektedir.

2.2. PROTEİN DENATURASYONU

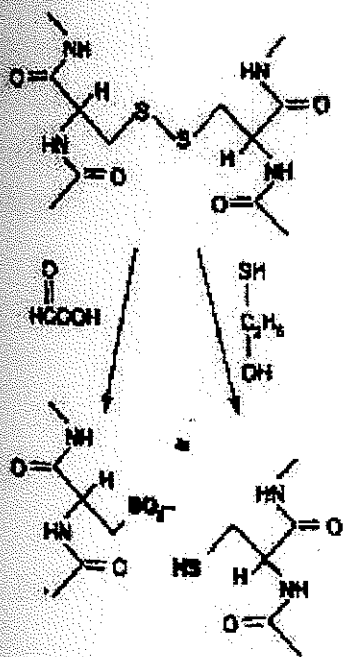
Denaturasyon protein ya da DNA nın üç boyutlu yapısının kaybı olarak tanımlanabilir. Normal üç boyutlu yapı "native state" olarak adlandırılır. Denaturasyon zaman zaman fizyolojik de olabilir; çift sarmal DNA, RNA sentezi için ya da enzim proteinler aktif şekle geçebilmek için, üç boyutlu yapılarını değiştirebilirler. Denaturasyon sonrası makromoleküller uygun koşullarda kendiliklerinden renature olabilirler. Uygun koşullarda renaturasyonun gerçekleşmesi, makromoleküllerin kendi üç boyutlu yapılarını korumak için gerekli bilgiyi taşıdıklarını göstermektedir. Proteinlerin üç boyutlu yapısının stabilizasyonunu sağlayan güçlerinden bazılarının ortadan kaldırılması, denaturasyona neden olur. Bunlar hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, elektrostatik etkileşimler ve disülfid bağlarıdır(23).

2.2.1. Hidrojen Bağlarının Kırılması; Isı, üre ve guanidin hidroklorür hidrojen bağlarına etkili denatüranlardır. Isı denaturasyonunda geçiş aralığı çok dardır. Üre ve guanidin hidroklorid H^+ alıp verebilen bileşiklerdir (8-10 M üre, 6-8 M Guanidin klorür). Üre, α -heliksin hidrojen bağlarını etkileyerek sarmal yapıyı bozar (24).

2.2.2. Hidrofobik Etkileşimlerin Bozulması; Aseton ve etanol gibi organik çözücüler, SDS gibi deterjanlar, soğuk ve üre gibi denatüranlarla sağlanır (23,24).

2.2.3. Elektrostatik Etkileşimlerin Bozulması; Asit yada alkali ortamda aşırı pH değişimi ile proteinlerin yüklü R grupları arasında iyonik bağlar bozulabilir. Ayrıca yüksek iyon derişimi de benzer etki gösterir. Ortam pH sı azaldıkça proteinlerin net yükü pozitif olur.

2.2.4 Disülfid Bağlarının Bozulması; S-S bağları protein yapısını stabilize eder. Aynı zincir içi, ya da farklı zincirler arası olabilir. Protein yapısı içinde sistin rezidüleri ile oluşan disülfid bağları, tiyol (-SH) grubu olan dithiotreitol ya da 2-merkaptetanol(2-ME) gibi denatüranlarla indirgenebilir ve molekülde yarıklanmalar meydana gelir. Sülfidril grupları proteinlerin yüksek reaktif gruplarıdır. Performik asid gibi ajanlarla da sülfidril grupları kolayca sisteik aside okside edilebilir(Şekil.4)(25).

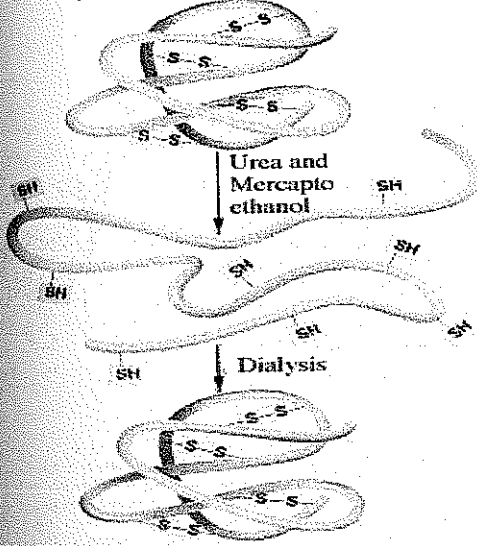


Sistein (Sistin) ---- oks ----> sisteik asid

Sistin ---- redük ----> sistein

Şekil.4. Disülfid bağının performik asid (solda) ile oksidatif yada merkaptetanol ile redüktif olarak bozulması ve sisteik asid (solda) veya sisteinil-(sağda) grupların oluşturulması(25).

Denaturation of Proteins



Ayrıca tüm proteinler üre ve merkaptetanolün beraberce kullanımı ile S-S bağlarından arındırılabilirler. Tüm proteinler üre yada guanidin hidroklorid ile denatüre edildikten sonra indirgenebilir ve tüm disülfid bağları açığa çıkarılır (Şekil.5) (26).

Şekil.5. Üre ve merkaptetanolle protein denaturasyonu.

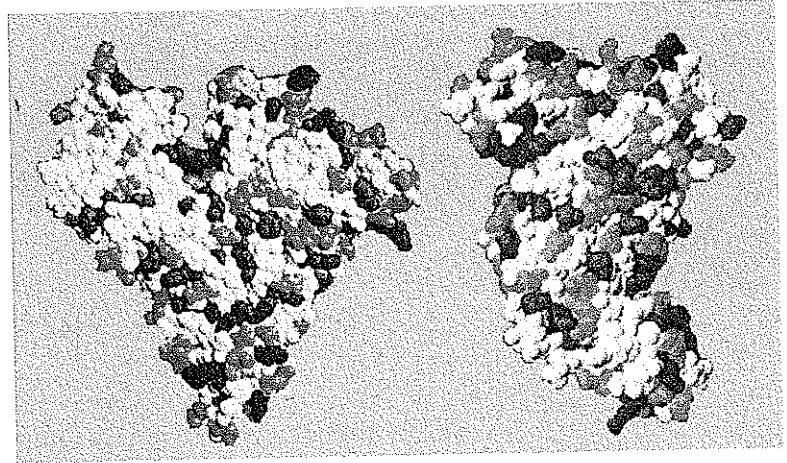
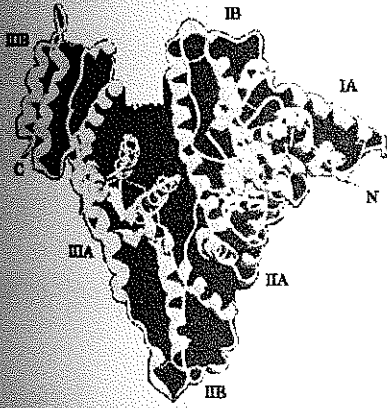
2.2.5. Üre ve Guanidin Hidroklorürün Albumine Etkisi

Guanidin hidroklorür albuminin yan zincir ve hidrojen bağlarına etkir (27). Guanidin hidroklorür konsantrasyona bağlı olarak proteinin, polar-apolar yüzeyleriyle etkileşim gösterir. Böylece sarmal yapının açılımına neden olur. Albuminde sistein tiyol grubları genelde iyonize formdadır. Albumin yapısındaki disülfid bağları asidik ya da alkali ortamda bozular. Isı da S-S bağlarını kırar. Guanidin hidroklorür ile değişik ısılarda denatüre olmuş albumin jel yapısına dönüşür. Üre de guanidin hidroklorür gibi etki gösterir. Ancak yüklü olmadığından, albuminin içine nüfuz edip küçük boşluklara yerleşir ve kapalı gibi olan cepleri altüst eder (28).

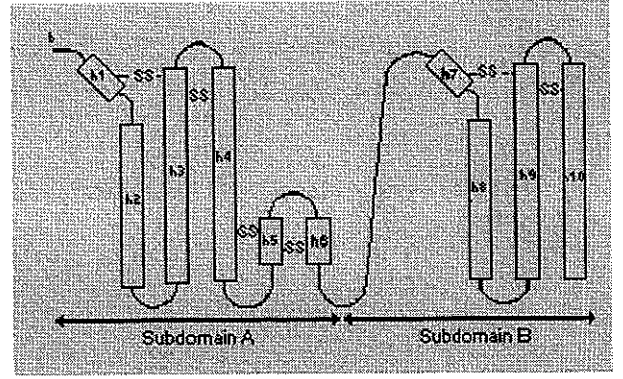
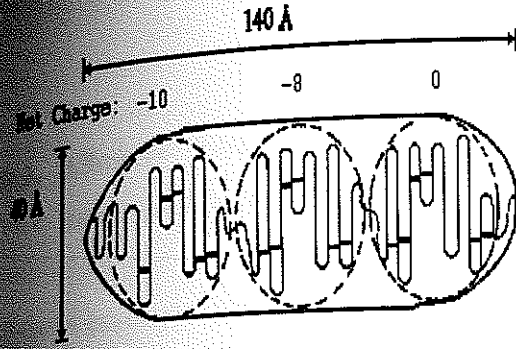
23. ALBUMİN

23.1 Albumin Yapısı

Albumin 17 disülfid bağı içeren 580 aminoasid uzunluğunda bir proteindir(Şekil.6). %50-68 lik bölüm α helix, %16-18 lik bölüm β uzantılarından oluşur (29). Oysa X-ray kristalografik yöntemlerle % 55 α helix, %45 gelişigüzel yapılardan oluştuğu tespit edilmiştir (30). Albumin methionin, triptofanca fakir, leucin, lizin, glutamatca zengindir. Domain I, II, III e ayrılır ve her domainde 3 loop (büyük-küçük-büyük) bulunur. Toplam 9 loop dan oluşur(Şekil.7). Her domain IA, IB gibi iki subdomaine ayrılır. Her bir domainde 10 tane helikal segment mevcuttur. 1-6. segmentler subdomain A' yı, 7-10. segmentler subdomain B' yi meydana getirir(Şekil.8). Albuminin yapısındaki 34. amino asidin serbest sistein tiyol grubu içermesi, diğer ekstraselüler proteinlerden farklılık gösteren bir özelliğidir. pH=5-7 de disülfid bağlarının hiçbiri indirgen ajanların erişebileceği konumda değildir. Ancak pH ın artması yada azalması ile disülfid bağlarına erişilebilir. Yani nötral pH da S-S bağları redükte ajanlardan korunaklıdır. Serbest tiyol grubunun olduğu sistin-34 ün, glutasyon, iodoacetamid yada sisteinle blokajı, karışık disülfid bağı ve albumin dimerleri oluşumunu engeller (31).



Şekil.6. Albuminin alfa katlantıları ve beta uzantılarının tersiyer yapısı (solda). Albuminin önden ve sağ yandan görünümü, mavi-baz rezidüler, kırmızı-asidik rezidüler ve sarı-nötral rezidüler (sağda).



Şekil.7. Albumin boyutları, domain I, II, III dizilimi ve disülfid bağları(sol)

Şekil.8. Albumin domainlerindeki 10 helikal segment arası S-S bağları ve subdomain A ve B(sağ).

2.3.2. pH'nın Albumine Etkisi

pH azalması yada artışı helikal yapıyı azaltır (Şekil.9)(32).

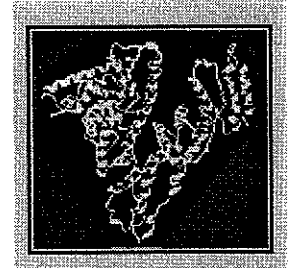
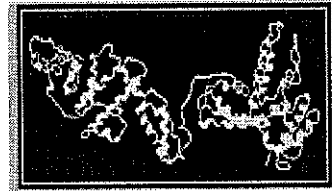
pH	2.7.....	4.3	8	10
Albumin	E ←	→ F ←	→ N ←	→ B ← → A
% α helix	35	45	55	48

E form

F form

N

form



E=expanded F=Fast N=Normal B=Basic A=Aged Albumin

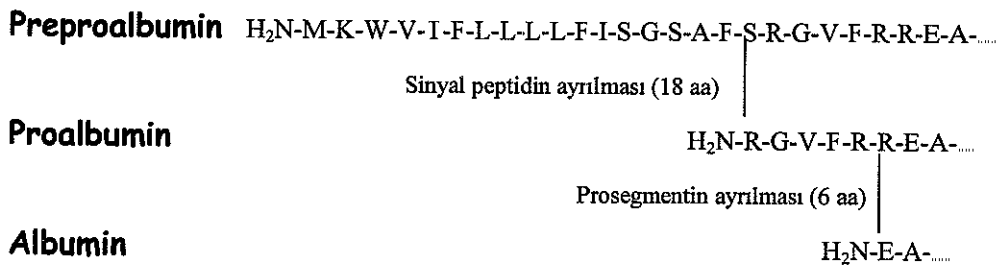
Şekil.9. pH'nın azalmasıyla albuminin üç boyutlu yapısındaki açılma.

N- F geçişinde domain III katlantısı bozulmaz. pH=4 den az olduğunda domain I içi helikal kayıp artar. pH=9 da 3-4 gün bekleyince diğer izomer, A formu oluşur (33).

2.3.3. Albumin Sentezi, Albuminin Bazı Fizyopatolojik Özellikleri ve Nefrotik Sendrom Albumini

Albumin insan plazmasının ana proteini olup total plazma proteinlerinin yaklaşık %60 ını oluşturur. Gebeliğin 20. haftasından yaşamın sonuna kadar insan plazmasının en fazla miktarda bulunan ve çok önemli fonksiyonları olan proteindir. Gebeliğin ilk yarısında (ilk 20 hafta) alfafeto protein (AFP) albumin yerine osmotik dengeyi sağlar. Albuminin yarılanma ömrü 15-19 gündür. Yaklaşık tamama yakını proksimal renal tubuler hücreler de glomeruler filtrattan geri emildiği için çok az miktarda atılır (34). Glomerüler filtrata plazma albuminin ancak %0.04 ü kadar geçer. Albumin fizyolojik pH da 200 den çok negatif yüke sahip stabil bir moleküldür. Bu özelliğiyle suda oldukça çözünürdür. Albuminin % 40 kadarı plazmada, kalan % 60 lık bölümü de hücre dışı aralıklarda bulunur. 66.3 kD luk moleküler ağırlığı ile rölatif olarak küçük bir proteindir. Albumin beyin omurilik sıvısı, interstisiyel sıvı, idrar ve gebelik sırasında amniotik sıvı gibi diğer ekstravaskuler vücut sıvılarının da önemli bileşenidir. Karbohidrat yan zincir taşımayan nadir plazma proteinlerinden biridir. 34. pozisyondaki serbest tiyol grubu, fizyolojik pH da sistein gibi tiyol bileşikleriyle reaksiyon verebilir (35).

Albumin gebeliğin ilk 20 haftasından sonra karaciğer parankimal hücrelerinden preproprotein olarak sentezlenir. Gebeliğin erken döneminde embriyonik yolk sac'tan AFP sentezi yapılmaktadır. Günde 12 gr albumin sentezlenebilir, bu tüm karaciğerin sentezlediği protein miktarının yarısına eşittir. Sentez hızı koloidal ozmotik basınçla ve protein alımıyla düzenlenir. Sentez hızı inflamatuvar sitokinlerle azaltılır. Katabolizması tüm hücrelerde pinositoz yoluyla olur(9).



Albuminin en önemli fonksiyonu kapiller osmotik basıncın düzenlenmesidir. Ancak bazı analbuminemik vakalarda orta derecede ödem olduğu görülmüş. Bu diğer proteinlerin sentezinin artışına ve osmotik basıncı dengede tutmalarına bağlanmaktadır. Albumin yüzeyindeki birçok negatif yük ve spesifik bağlanma bölgeleri albuminin birçok molekülü bağlayabilmesini ve taşıyabilmesini sağlar. Serbest yağ asitleri, fosfolipidler, metalik iyonlar, amino asitler, ilaçlar, hormonlar ve bilirubin bunlardan bazılarıdır. Albumin bunların çoğunun metabolizmasında ve detoksifikasyonunda önemli rol oynar. Albumin aminoasid deposu olarak da kullanılır. Triptofanın kan-beyin bariyerinden geçişinde rol oynar. Albumin serbest yağ asidi, divalan katyonlar, HOCl, bilirubin bağlayarak antioksidan olarak iş görür. pH değişimlerinde serbest iyonları ve diğer yüklü bileşikleri bağlayarak tampon gibi davranabilir. Tüm bu önemli fonksiyonlarına rağmen analbuminemik vakalarda sadece lipid ve kalsiyum taşınması etkilenmiştir (36). Hipoalbuminemi yapan başlıca nedenler; karaciğer hastalığı, protein alımı azlığı ve buna bağlı olarak bozuk sentez, doku hasarı ve inflamasyona bağlı olarak artmış katabolizma, idrar ya da feçesle protein kaybı ve amino asid alımındaki bozukluklardır.

Normal HSA, non-denaturan koşullarda agaroz jel (AGE) veya seluloz asetat serum elektroforezinde protein boyaları ile görüntülendiğinde, genellikle homojen anodik tek band oluşturur (9). Daha önceki çalışmalarda normal proteinlerin üre ile denaturasyonu sonucu daha katyonik izoformlarının ayrıldığı tespit edilmiştir. Albuminin pI değeri, kullanılan metoda göre 4.0-5.8 arasında değişen bir değerdir(10). Albuminin çok büyük miktarı 67.000 kD luk moleküler ağırlıklı monomeri ve geri kalan kısmı polimerleri ve fragmanlarıdır. Affinite kromatografi ile saflaştırılmış HSA, SDS-PAGE sonrası western blot tekniği ile izlendiğinde monomerik-oligomerik olarak görülür(11). Nefrotik serumdan psödo oligand kromatografisi ile saflaştırılmış protein, % 1 agaroz jelinde, pH 4-7 arasında izoelektrik odaklama (IEF) ile ayrıştırılıp anti-albumin antikorları ile ve gümüş boyaları görünür hale getirildiğinde, pI 4.7 etrafında merkezleşmiş bandlar şeklinde görülür(1). Üre kullanılarak ultra-thin layer IEF yapılarak HSA'nın genetik varyantları araştırılırken; normal albuminde iki asidik ve iki bazik izoformu olan mikroheterojenöz yapı tespit

edilmiştir (12). Katyonik albumin, albumin fraksiyonundan ayırı değildir. MCD de albuminin iki formu rapor edilmiştir(1,2). Birisi serum albuminin ana komponenti anyonik izoform, diğeri üriner albuminin ana komponenti olan daha az anyonik izoformdur. Depo albumin miktarı oldukça yeterlidir. NS de normalin %300 ü kadar daha fazla sentezlenebilir (13). Karaciğeri protein kaybını kompanse etmek için albumin sentezinin yanısıra diğeri bazı proteinlerin ve özellikle büyük proteinlerin sentezini artırır (AMG; alfa-2 makroglobulin, Hp; haptoglobin, lipoproteinler gibi). Sonuçta NS nin klasik elektroforetik görünümü ortaya çıkar. α_2 bandı artar diğeri bandlarda azalma meydana gelir.

2.3.4. Albuminin Genetik Varyantları

4. kromozomun uzun kolunda kodlanmıştır. Burası AFP ve Vit-D bağlayıcı proteine yakındır ve yoğun sekans analizi gösterir. Otozomal dominant kalıtlanır ve heterozigotlarda sınırdaki düşük (35 gr/L miktarlarında) seyredebilir. 80 farklı yapıyla kalıtlanan alel tespit edilmiştir ancak bunlarda albumin düzeyi normal sınırlardadır. Kodominansi ve her iki alel genle de kalıtlanan bölümler sözkonusudur. Bu izotipler bisalbuminemi olarak elektroforezde tespit edilebilir (37).

1980 lerde albuminin en az iki düzine elektroforetik varyantı tanımlanmıştır. Ancak bunların sadece ikisi albuminin primer yapısıyla uyumlu formlardır : Albumin A (ana form) ve albumin B (özellikle Avrupalılarda yaygındır). Albumin B , A dan daha katyoniktir (gly \rightarrow lys değişimi nedeniyle). İlaç, metabolit ve diğeri moleküllerin bağlanması gibi durumlarda elektroforezde değişik görünümlemler olabilir. Daha katodal migrasyon gösteren en az 2 dimer formda albumin varyantına rastlanmıştır. Dimer oluşumunun derecesi albuminin, IgA gibi proteinlerle kompleks oluşturması ve pI'sını değiştirir. Bunun yanında aynı serum farklı zamanlarda farklı elektroforetik görünüm verebilir. Bu farklı albuminlerin, belki de en önemli laboratuvar bulgusu α_1 -antitripsin ile kompleks oluşturmasıdır. Çoğu albumin izoformunun fonksiyonu normaldir. Bisalbuminemi serum

albuminin asemptomatik varyantıdır. Elektroforezde normal ve anormal göçen iki varyantı vardır. Familial disalbuminamik hipertiroksinemide anormal albuminin tiroksin bağlama kapasitesi artmıştır (38). Yeryüzünde çok farklı coğrafik yerin adıyla anılan birçok albumin allelik varyantı tanımlanmıştır. Normal albuminden farklılıkları çoğunlukla sadece bir amino asid farklılığıdır.

Analbuminamik hastalarda boya bağlama yöntemi ile albumin düzeyi 3-18 gr/L olarak bulunmuştur. Oysa aynı hastalarda albumin düzeyinin 0 gr/L olduğu immunassay ya da elektroforetik yöntemlerle gösterilmiştir (39).

2.4. LİPOPROTEİNLER

2.4.1. Serum Lipid ve Lipoproteinleri

Serum lipidleri, artan miktara göre sıralandığında trigliserit, total fosfolipid ve total kolesterolden oluşur. Bunlar arasında klinik amaçla en çok incelenenler nötral lipid olan total kolesterol ve TG dir. Tablo.3. de total kolesterol, TG ve total fosfolipidin serum miktarları mg/dL ve mmol/L olarak gösterilmiştir.

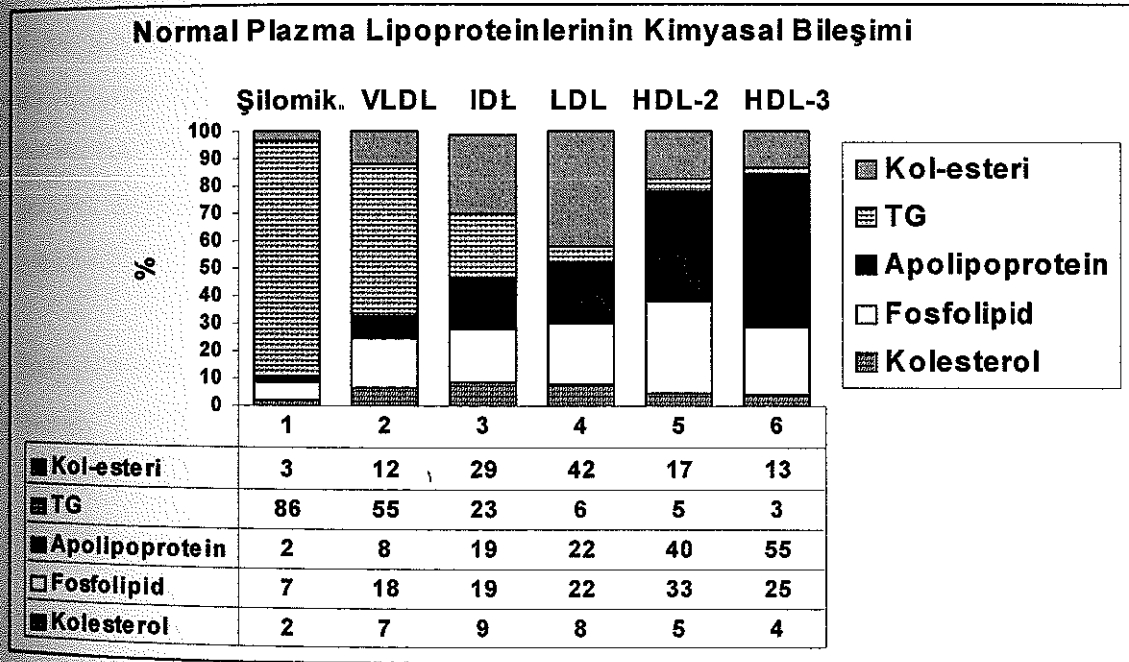
Tablo.3. Erişkin ve Çocukta Serum Total Kolesterol, Total Fosfolipid, TG Düzeyleri.

	0-4 yaş	5-19 yaş	19-64 yaş
Total kolesterol mg/dL	114-200	121-200	140-240
mmol/L	2.95-5.18	3.13-5.18	3.62-6.21
Total fosfolipid mg/dL	75-275	180-295	125-275
mmol/L	0.53-1.95	1.27-2.09	0.88-1.95
Trigliserit mg/dL	30-110	32-131	37-160
mmol/L	0.34-1.24	0.36-1.48	0.42-1.80

Bu lipidler açlık serumunda HDL, LDL ve VLDL gibi major lipoproteinler içinde bulunup, karaciğer, barsak ve yağ dokusu arasında taşınırlar. Tüm lipoproteinlerin bileşimi ve özellikleri tablo.4. ve şekil.10. da gösterilmiştir.

Tablo.4 Normal İnsan Plazmasının Lipoprotein Tipleri ve Özellikleri.

	Şilomikron	VLDL	IDL	LDL	HDL	Lp(a)
Yoğunluk(g/mL)	<0.95	0.95-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.210	1.040-1.130
Elektroforetik protein bölgesi	orjin	pre-beta	beta-prebeta	beta	alfa	pre-beta
MW (dalton)	0.4-30X10 ⁹	5-10X10 ⁶	3.9-4.8X10 ⁶	2.75X10 ⁶	1.8-3.6X10 ⁵	2.9-3.7X10 ⁶
lipid/protein	99/1	90/10	85/15	80/20	50/50	75/25-64/36
Major lipidler	Eksojen IG	Endojen IG	Endojen IG, Kol-est	Kol-es	Fosfolipid	Kol-est, fosfolipid
Çap (nm)	>70	25-70	22-25	19-22	4-10	
Major proteinler	A-I B-48 C-I C-II C-III	B-100 C-I C-II C-III E	B-100 E - - -	B-100 - - - -	A-I A-II - - -	(a) B-100 - - -



Şekil.10. Normal plazmanın ağırlıkça lipid içerikleri dağılım % leri

Plazma VLDL sinin çoğu karaciğer kaynaklıdır. Bu lipoprotein trigliseriti karaciğerden karaciğer dışı dokulara taşıma aracıdır. Barsak hücrelerinin şilomikron üretimi ile karaciğer hücresinin VLDL yapımı arasında pek çok benzerlik vardır. Apo B-100

granüle endoplazmik retikulumdaki ribozomlarda sentezlenip trigliseridin temel sentez yeri olan agranüle endoplazmik retikuluma lipoproteinlere yerleştirilir. Lipoproteinler kendilerine daha fazla lipid ve karbohidrat kalıntılarının eklendiği golgi aygıtından geçerler. Şilomikron ve VLDL salgılayıcı vakuolün hücre zarıyla kaynaşmasıyla barsak veya karaciğer hücresinden salgılanır. Apo B-100 VLDL oluşumunda vazgeçilmezdir. VLDL nin trigliseritleri lipoprotein lipaz tarafından hidrolize edilir. Bu enzim kan kapillerleri duvarına yerleşiktir, heparan sülfatın proteoglikan zincirleri ile endotele kancalanmıştır. Lipoprotein lipaz etkinliği için kofaktör olarak fosfolipidler ve apo C-II gereklidir. Apo C-II, VLDL nin bir apoproteinidir. Apo B-100 ile işaretli VLDL nin izlenmesiyle bu lipoproteinin IDL öncülü olduğu ve IDL nin de LDL öncülü olduğu gösterilmiştir. Plazma lipoproteinlerinin tümü, bir veya daha fazla metabolik döngü için birbirleriyle ilişkili yapıtaşları olup plazma lipid taşınmasındaki karmaşık olaylardan birlikte sorumludur.

Karaciğerde trigliserit sentezi VLDL sentezi ve salgılanması için akut bir uyarandır. Karaciğerde trigliserit sentezi ve VLDL salgılanmasındaki ana etmenler açlıktan ziyade tokluk hali, lipogenezin hızlanması ve yağ asidi esterlenmesine yol açan karbohidrattan zengin diyetle beslenme, dolaşımdaki serbest yağ asitlerinin artması, etanol içilmesi, insülinidir.

Bir antibiyotik olan puromisin protein sentezini inhibe eder ve yağlı karaciğer oluşturup serum VLDL derişiminde belirgin bir azalmaya neden olur. VLDL salgılanmasını azaltan diğer maddeler arasında etionin (α -amino- γ -merkaptobütirik asit), merkaptoetanol, karbon tetraklorür, kloroform, fosfor, kurşun ve arsenik bulunur(25).

HDL karaciğer ve barsakta sentezlenen ekstrahepatik dokulardan serbest kolesterolü uzaklaştıran ve kolesterol esterlerini karaciğere taşıyan lipoproteindir. Apo C-II nin dolaşımdaki deposudur ve kolesterol esterini VLDL ve LDL ye, TG lerle yerdeğştirerek aktarır. Apo C-II, HDL den VLDL ve şilomikronlara transfer edilir. HDL dokulardan aldığı serbest kolesterolü esterleştirmek için LCAT (lesitin kolesterol açil transferaz) kullanır. Bu enzim HDL nin yapısında bulunan apo A-I ile aktifleştirilen bir plazma enzimidir ve kolesterolden kolesterol esteri ve fosfotidil

kolinden lizolesitin meydana gelir. Yine HDL yapısındaki apo A-II bu enzimin inhibisyonundan sorumludur(25). HDL₃ den daha az yoğun olan HDL₂ oluşturulur.

2.4.2. Nefrotik Sendromdaki Lipid ve Lipoprotein Değişiklikleri

NS de klasik lipid değişimi, LDL, VLDL nin artışına bağlı olan hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemiden oluşur (40,41)). NS de hepatik VLDL fazla üretimi vardır(42). VLDL artışı IDL ve LDL artışına neden olur. HDL sentezinde artmıştır ancak HDL-3 ün idrara selektif kaybı vardır ve LCAT aktivitesi azalmıştır. Tüm bunlar dokulardan karaciğere kolesterol transportunu yavaşlatır(41,43). İnsanda ve deneysel N.S. da lipoproteinlerin lipid ve protein içeriklerinin ikisinin de hepatik sentezinin arttığı da bildirilmiştir (44).

Bu bulgulara bakarak nefrotik hiperlipemi iki şekilde açıklanmaya çalışılır:

- 1) Plazma albumini azalmasına yanıt olarak, hepatik albumin sentezi(9,13-14,45) gibi lipoproteinlerin sentezinde de artış olmalıdır. Lipid profili ile serum albumin düzeyi arası sıkı ilişki, albumin verilen hastalarda TG ve kolesterol sentezinin azalması şeklinde görülür fakat bu durum uzun dönemde değişir. Albumin sentezinde diyetle olan değişim, lipid değişimleri ile her zaman beraber görülmez.
- 2) Periferik lipolizin bozulmasıdır(46,47).

Bazı çalışmalarda Apo B-100 sentezinin arttığı gösterilememiştir(48). Ayrıca VLDL nin kolesterol bileşkeninin karaciğerde yapımını sağlayan HMGKoA redüktaz aktivitesi de yüksek bulunamamıştır(49). Daunomisinle oluşturulan deneysel NS de, VLDL, LDL ve HDL nin TG, kolesterol, fosfolipid içeriğinin arttığı gözlemlendi. VLDL lipid içeriği artışı çok fazla bulundu. HDL lipid düzeyi bir süre sonra normale döndü. Diyetle lipid alımı normalde karaciğer lipid düzeylerini arttırırken, N.S. da hiperlipidemiye rağmen karaciğer lipid düzeylerini arttırmadı (50).

VLDL artmakla beraber ılımlı vakalarda normal olabilir. Nefrotiklerde VLDL nin apo C-II içeriği de azalmıştır. Apo C-II lipoprotein lipaz aktivatörü olduğundan önemlidir ve VLDL artışı ile paralel seyreder. VLDL artışı IDL yi de arttırır. LDL nin katabolik

fraksiyonel hızı belirgin olarak azalmıştır. VLDL katabolizması ve apo B katabolizması da azalmıştır. Bir çalışmada da apo B nin metabolizmasında anlamlı bir değişiklik bulunmamıştır(3-5,42).

LPL, temelde yağ ve kas dokusunda lokalizedir. VLDL ve LDL hidrolizinde önemli bir basamakta yer alıp periferik lipolizden sorumludur. LPL aktivitesinin nefrotiklerde azaldığı görülmüştür. Ancak bu düşüşün nedeni tam olarak açıklanamamıştır. Bazı renal fonksiyonu bozuk ve üremik hastalarda LPL aktivitesinin düştüğü iyi bilinmektedir. Bu düşüşün multifaktöryel olduğu söylenmektedir (51). Nefrotik idrarda LPL yi inhibe eden glikoprotein kofaktörleri olduğu gösterilmiştir (52).

Albumin düşüşü ile kolesterol ve ester-kolesterol artışı arasında oldukça sıkı bir ilişki vardır. Fosfolipidler de N.S. de artar. Fosfolipid artışı kolesterolden daha az olup T.kol / FL oranı NS nin kliniği ileri derecede bozulduğunda düşer. Artmış fosfolipid düzeyi, azalmış lesitin miktarına karşın artmış lizolesitin ve sfingomyelinle beraberdir (53).

NS da, LCAT aktivitesi artmıştır. Buna bağlı olarak lizolesitin de artar ve albumin düzeyi düşük olduğundan daha çok LDL ye girer ve okside LDL formuna dönüş artar (53). Lizolesitin okside LDL nin major bileşenidir ve NS da kolesterolden bağımsız olarak artar. Non-renal hipoalbuminemide lizolesitin düzeyi normal bulunmuştur. Ancak renal hipoalbuminemide LDL, VLDL ve IDL deki lizolesitin düzeyinin yüksek olduğu görülmüştür (54). Normal ratlarda kolesterol-esteri ile LCAT aktivitesi arasında pozitif korelasyon varken, anti-Fx1A ile meydana getirilen deneysel NS da, negatif korelasyon gözlenmiş olup bu da NS daki çoğu kolesterol-esterinin normal LCAT etkisiyle oluşmadığına işaret eder (55).

Lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT), HDL sentezinde önemlidir ve NS da aktivitesinin azaldığı da rapor edilmiştir(56). Azalmış albumin konsantrasyonu LCAT aktivitesini azaltır ve üriner LCAT kaybıda sözkonusudur (mw;65.000Kd) (56) NS da idrarda kolesterol, TG, fosfolipid, yağ asidi görülebilir. İdrarda HDL varlığı da gösterilmiştir ancak LDL ye rastlanmamıştır. Bu bulgu LDL ve HLD nin moleküler büyüklüğüyle ilgili olabilir (57).

HDL normal miktarda seyrederek. Bazı çalışmalar HDL ve HDL-2 nin arttığını rapor ederken diğerleri azaldığını bulmuşlardır(58). Özellikle HDL-2 artar, HDL-3 idrara geçer ve azalmış gibi görülür (59). Apolipoprotein A-I düzeyi HDL normal olmasına rağmen çocuklarda ve yetişkinlerde artmıştır. HDL fosfolipidleri, HDL normalden bile yüksektir (60). Başka bir çalışmada ise apo-AI normal yada düşük bulunurken HDL-2 nin düştüğü HDL-3 düzeyinin arttığı gösterilmiştir (61,62).

Nefrotik sendromda onkotik basınç değişimi apolipoprotein gen ekspresyonunu regüle eder ancak bunun nasıl olduğu gösterilememiştir (63).

NS un belirleyici lipoproteinlerinden biride Lipoprotein (a) (Lp(a)) dır. NS da albumin düşüşüne bağlı olarak Lp(a) sentezi artar. Lp(a) LDL ye benzer. Apoprotein içeriği %65 apoB-100, %20 apo(a) ve kalan kısmı albuminden oluşur. Apo(a) apoB' ye disülfid bağlıdır(64). Apo(a) plazminojene benzer ve fibrinolizi inhibe etme yeteneği vardır. Apo(a) NS da artar ve remisyonda düzelir (65).

2.5. PLAZMA PROTEİNLERİNİN ELEKTROFORETİK GRUPLANMASI

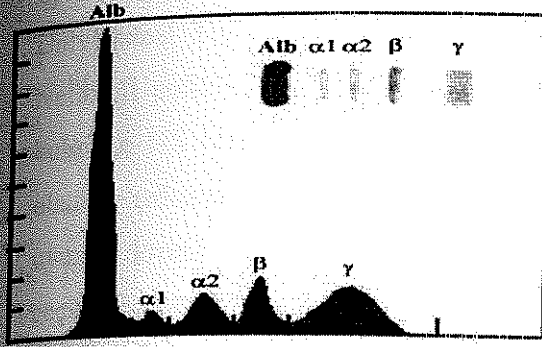
Protein elektroforezi klinik laboratuvarlarda serum ve diğer vücut sıvılarının protein içeriklerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Uygun destek ortamında zone elektroforez prensibine dayanır. Zone elektroforezinin klinikte yaygın olan bir türü agaroz jel elektroforezidir. Serum proteinleri, yüklerine göre 5 major fraksiyona ayrılır. Elektroforetik bantlarının protein içeriği aşağıdaki tablodaki gibidir.

Tablo.5. Normal Serum Elektroforetik Fraksiyonlarının Protein Alt Grupları

Elektroforetik Band	Albumin	α_1	α_2	β	γ
Protein içeriği	Alb	α_1 -antitripsin α_1 -asid glükoprot α_1 -transkörtin tiroid binding glb	α_2 -makroglb haptoglobin seruloplazmin eritropoetin	hemopeksin transferrin kompleman C ₃	IgA IgM IgG

Nefrotik sendromda α_2 makroglobulin artmasına bağlı olarak , klasik elektroforetik görünüm tüm serum proteinlerinin azalması sadece α_2 bandının artması şeklindedir.

Şekil.11. a) Normal SPE ve elektroforetik jel görünümü. b) Elektroforetik bandlardaki protein dağılımı.



b)

Albumin	%55-69
α_1	%1.5-4
α_2	%8-13
β	%7-15
γ	%9-18

3. MATERYAL-METOD

3.1 NORMAL VE NEFROTİK HASTA GRUBLARININ SEÇİMİ

Bu çalışma 30 idiopatik nefrotik sendromlu hasta ve bu hastalarla cinsiyet ve yaş uyumlu 30 normal kişinin serumu kullanılarak gerçekleştirildi. Hastalara, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı ve İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji poliklinik ve klinikleriyle işbirliği yapılarak ulaşıldı. Klinik ve laboratuvar bulguları NS tanımına uyan, idiopatik NS lu hastaların yeni tanı alan ya da relapsda olanları çalışmaya dahil edildi. Ulaşılan her hastadan sonra, aynı gün cinsiyet-yaş uyumlu kronik yada önemli bir sağlık problemi olmayan veya önemli bir hastalık geçirmemiş kontrolleri yine Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesi pediatri polikliniğinden ve aynı koşullara uyduğu sorgulanan hastane personeli ve hasta yakınlarından seçildi. Normal (sağlıklı) grubundaki kişilerinde dosyaları temin edilip incelendi. Her hasta ve sağlıklı çiftinin Body Mass Index(BMI)i , tansiyonu, yakınması, varsa önemli bir hastalık öyküsü, hastaların klinik bulgularıyla beraber kaydedildi. Önceki biyokimya, idrar, hematoloji ve diğer laboratuvar bulguları ve varsa renal biopsi raporuna göre NS un tipi belirlendi. Bunlar çalışma sonucu elde edilen bulgularla birlikte, bir değerlendirme formu oluşturularak kaydedildi.

Tablo.6. Çalışmaya Alınan Normal ve İdiopatik NS lu Hasta Gruplarının Özellikleri.

	Nefrotik (Hasta) Grub	Normal (Sağlıklı) Grub
Hasta Sayısı (n)	30	30
Cinsiyet (kadın/erkek)	12/18	12/18
Yaş(ortalama+SD)	(°p) 17,95±20,2(1-72 yaş)	17,97±19,9(1,5-70 yaş)
BMI(ortalama+SD)	(°p) 20.37±3.00	19.87±4.44
Serum Total Protein(g/dL)	(*p) 4.38±0.87	7.48±0.47
Albumin(g/dL)	(*p) 1.42±0.46	4.36±0.46
Serum Kolesterol(mg/dL)	(*p) 405.5±152.4	164.5±38.9
Serum Trigliserit(mg/dL)	(*p) 352.2±255.5	104.2±62.4
Renal Biopsi--İdiopatik NS alt grubu-----sayı (%) (kadın/erkek)(yaş 18>/18<)		
Minimal change disease	15(%50)(6/9)(14/1)	-----
Membrano proliferatif glomerulonefrit	11(%36)(5/6)(7/4)	-----
Fokal segmental glomerulonefrit	4(%14)(1/3)(0/4)	-----

*p < 0.0001 °p > 0.05

Çalışmaya alınan kişilerin kanları santrifüj edilip, serum total protein, albumin, total kolesterol ve trigliserit değerleri saptandıktan sonra herbir örnek:

- Total protein ve albumin (BCG; bromcresol green ile) tayini,
- Üre denaturasyonu ve üre denaturasyonu öncesi-sonrası protein elektroforezi,
- 2-merkaptoetanol denaturasyonu, total kolesterol ve trigliserit ölçümü,
- Fosfolipid tayini yapılmak üzere ayrıldı.

3.2. TOTAL PROTEİN VE ALBUMİN (BCG ile) TAYİNİ

3.2.1 Total Protein Tayini

Total protein tayini Abbott-Aeroset kitleri kullanılarak otoanalizörde yapıldı. Biüret reaktifi ile en az 2 peptid bağının reaksiyona girmesi esasına dayanan yöntem esas alınmıştır. Protein nitrojenleri ile alkali ortamda (NaOH) bakır iyonları kompleks oluşturur ve mor-menekşe renklenme 340 nm de spektrofotometrik olarak ölçülür(9).

3.2.2. Albumin (BCG ile)Tayini

Bu işlem Abbott-Aeroset kitleri kullanılarak otoanalizörde yapıldı. Ölçüm yöntemi albumin ile anyonik boya olan bromcresol green (BCG) in pH 4.2 de bağlanması ve BCG-albumin kompleksinin 628 nm de spektrofotmetrik olarak ölçülmesidir(9).

Albumin ölçümü hem kişilerin çalışmaya alınmaları sırasında hem de üre denaturasyonu öncesi-sonrasında yapıldı.

Her bir serumun BCG ile saptanmış olan test ve kontrol albumin değerleri ürenin albumine etkisinin boya bağlama yeteneğine göre izlenmesinde kullanıldı.

3.3 ÜRE DENATURASYONU ve PROTEİN ELEKTROFOREZİ

3.3.1 Üre Denaturasyonu

Üre Çözeltisi Hazırlanışı;

Üre, 8 M/L olacak şekilde %0.9 NaCl (serum fizyolojik, SF) içinde çözüldü. Bu çözelti içinde beklemekle kristal oluşmuşsa yeniden ılıtılıp çözülerek kullanıldı.

Hasta ve normal serum çiftleri üre ile ya da üre yerine SF ile 30 *C da 24 saat muamele edildi. Üreli işlem *test*, üresiz işlem *kontrol* olarak isimlendirildi. Herbir *serum-test*, 4 mg üre/mg protein oranı korunarak denatüre edildi.

150 µL Normal ya da Nefrotik Seruma Eklenecek 8 M Üre ya da % 0.9 NaCl Miktarının (X) Hesaplanması;

Hasta ve sağlıklı tüm serumların 4 mg üre / mg protein oranında olacak şekilde üre ile denatüre edilmesi amaçlandı. 8 g/dL protein içeren serum referans kabul edildi. 150 µL referans seruma 100 µL 8 M üre çözeltisi eklenmesiyle 4 mg üre /mg protein karışımı oluştu. Çünkü ,

80 µg/µL serum ise $80 \times 150 = 12\ 000 \mu\text{g}$ (12 mg) protein içerir.

8 M üre 480 g/L olduğuna göre

480 µg/µL $480 \times 100 = 48\ 000 \mu\text{g}$ (48 mg) üre içerir.

48 mg üre / 12 mg protein

4 mg üre / mg protein olur.

Çalışmaya alınan her sağlıklı ve hasta serumunun protein değeri saptandıktan sonra herbir serumun 150 µL sine bu oran elde edilecek şekilde 8 M üre çözeltisi eklendi.

Örneğin ;Serum protein değeri 6 g / dL ise

8 g/dL olan 150 µL seruma 100 µL 8 M üre eklenirse,

6 g/dL olan 150 µL seruma (X) µL 8 M üre eklenir.

$\chi = (6 \times 100) / 8 = 75 \mu\text{L}$ olacaktır.

Tablo 7. Üre Denaturasyonu Karışımının Hazırlanışı

	Nefrotik Serum		Normal Serum	
	Kontrol	Test	Kontrol	Test
Serum (μL)	150	150	150	150
NaCl % 0.9 (μL)	χ	---	χ	---
Üre 8 M (μL)	---	χ	---	χ

Karışımlar vortekslendi, 30 *C da 24 saat inkübe edildi. Herbir örneğe SPE uygulandı ve BCG bağlama kapasitesi saptandı.

Her hasta ve cinsiyet/yaş uyumlu sağlıklı çiftinin üre ile denatüre edilmiş test örnekleri, üre ile denatüre edilmemiş kontrol örneklerine göre değerlendirildi. Değerlendirme, serum protein elektroforezi (SPE) inde albumin ve albumin/globulin % si ve serum BCG bağlama kapasitesindeki değişime göre yapıldı.

Agaroz jel elektroforezi 15 li gruplarla yapıldığından bu süre içinde beklemesi gereken hasta/sağlıklı çiftlerin serumları 4 *C da buzdolabında saklandı. BCG analizi ise hemen yapıldı.

3.3.2 Protein Elektroforezinin Yapılışı

1-) **Aplikasyon** : Protein elektroforezi için hazırlanmış aplikatörlere 10'ar uL serum konuldu. 15 lik aplikatörlere, 8 M üre ile, bir gün denatüre edilmiş hasta ve kontrol serumları uygulandı. Bu işlem toplam en çok iki dakika içinde yapıldı. Aplikatör nemlendirme kabına konulup buzdolabına kaldırıldı.

2-) **Migrasyon** : Cihazın aplikatör taşıyıcı ve elektrot kısmı açıldı. Jel paketinden çıkarılıp (elektroforezde kullanılan agaroz jeli 0.8 gr/dL agarose ; pH 9.2 \pm 0.1 tris-barbital tamponu içerir), üzerindeki fazla sıvı kurutma kağıdı ile alındı. 200 uL distile su jelin yerleştirileceği çerçevenin ortasına uygulandı ve jel hava kabarcığı olmayacak

şekilde buraya kondu. Tamponlu stripler çıkarılıp (tampon stripler pH 9.2+0.3 tris-barbital, sodyum azid tamponu emdirilmiştir, jel ve elektrod arası iletimi sağlar) elektrodların üzerine yerleştirildi ve elektrodlarla düzgün olarak teması sağlandı. Elektrod ve aplikatör taşıyıcıları yatay pozisyona getirildi. Aplikatör dolaptan alınıp, koruyucu çerçeve çıkarıldıktan sonra 6 nolu taşıyıcıya yerleştirildi. Cihazın kapağı kapatılıp migrasyon için start verildi. Migrasyon otomatik olarak gerçekleştirildi. Bu aşamada, 30 sn uygulama, 20W ve 20 °C da 7 dakika elektroforez ve 65 °C 10 dakika kuruma gerçekleşir. Migrasyon programı tamamlandığında jel alınıp cihaz temizliği yapıldı ve stripler çıkarılıp atıldı. Elektrodlar distile su ile temizlendi.

3-) **Boyama ve yıkama** : Boya (0.4 g/dL amidoblack, %10 asetik asid) destaining solusyonu (0.05 g/dL sitrik asit) ve atık kabı kontrol edildi. Boyama bölümündeki jel taşıyıcı çıkarılıp, migrasyon işlemi tamamlanmış olan jel buraya takıldı ve boyamanın yapıldığı yere yerleştirilip otomatik olarak boyama (4 dakika amido black ile), fazla boyaların çıkarılması (destaining) (3 kez sırasıyla 3,2,1 dakika sırasıyla) ve kurutma (75 °C de 8 dakika) işlemi başlatıldı.

4-) **Değerlendirme**: Densitometreye yerleştirilip 570 nm de protein yoğunluğu ve dağılımı okundu.

Ürenin albumine etkisinin elektroforetik değerlendirilmesi için, hasta ve sağlıklı serum çiftlerinin test A/G lerinin kontrol A/G lerine oranı bulundu. Ya da test A/G deki değişme kontrol A/G ye göre % olarak ifade edildi.

3.4. 2-MERKAPTOETANOL (2-ME) DENATURASYONU, SERUM TRİGLİSERİT VE TOTAL KOLESTEROL DÜZEYLERİ TAYİNİ

2-ME ün NS lu hasta ve sağlıklı serumların lipoproteinlerine etkisi, serum T.Kol ve TG değişimleri tespit edilerek araştırıldı. 2-ME ün % 0.6, % 0.7 ve % 6.0 lık çözeltileri kullanılarak sağlıklı ve hasta serum çiftlerinin lipoproteinlerinin etkilenmelerinde fark olup olmayacağı izlendi. Yine bu işlemde de protein denaturasyonu işlemindeki gibi total protein miktarına göre 2- ME miktarı hesaplandı. % 0.6, % 0.7 ve % 6.0 lık, 2-ME

hazırlanarak, 100 er μL seruma total protein miktarına göre hesaplanan miktar 2-ME konuldu. Aynı işlem 2-ME yerine SF ile kontrol için de yapıldı (8 g/dL total protein içeren seruma 50 μL 2-ME , 4 g/dL total protein içeren seruma 25 μL 2-ME gibi).

3.4.1. Merkaptoetanol Denaturasyonu

Merkaptoetanol çözeltilerinin hazırlanışı;

% 0.6, 0.7 ve 6.0 2-ME çözeltileri, % 0.9 luk NaCl içinde (v/v) olarak hazırlandı.

Hasta ve sağlıklı serum çiftleri 2-ME ile ya da 2-ME yerine SF ile denatüre edildi. 2-ME içeren işlem *test*, içermeyen ise *kontrol* olarak isimlendirildi. 10 saniye vortekslenip hazırlanan serumda en fazla 20 dakika sonra Abbott Aeroset otoanalizörde total kolesterol ve trigliserit bakıldı. 2-ME kullanılan *test* serumu, kullanılmayan *kontrol* örneği ile karşılaştırıldı. Total kolesterol ve trigliserit değerindeki değişim % si değerlendirildi.

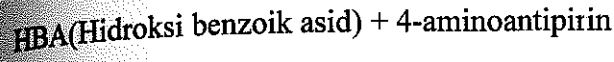
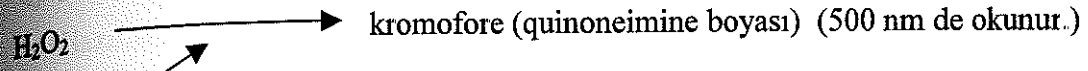
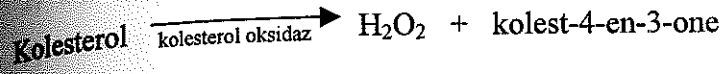
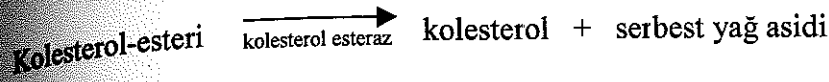
Herbir serum-test, 8 g/dL protein içeren serum örneği referans alınarak, 2-ME çözeltileriyle aynı protein oranı korunarak işlem gördü. Bunu hesaplarken, 100 μL referans seruma 50 μL 2-ME çözeltileri konacağı göz önüne alındı.

Tablo.8. 2-ME Denaturasyonu Karışımının Hazırlanışı

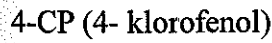
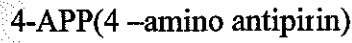
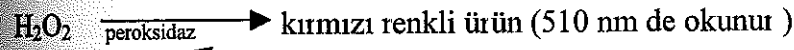
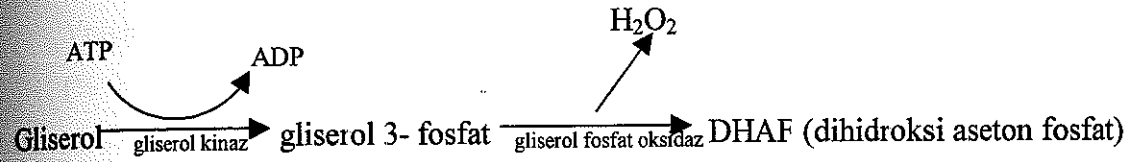
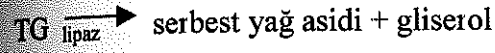
	Nefrotik Serum		Normal Serum	
	Kontrol	Test	Kontrol	Test
Serum (μL)	100	100	100	100
NaCl % 0.9 (μL)	χ	---	χ	---
2-ME çözeltileri (μL)	---	χ	---	χ

Karışımlar vortekslendi. Oda ısısında 20 dakika içinde total kolesterol ve trigliserit analizine alındı. Abbott Aeroset otoanalizöründe T. Kol ve TG mg/dL olarak ölçüldü, T. Kol ve TG değişimi, % olarak hesaplandı.

3.4.2. Total Kolesterol Tayini



3.4.3. Trigliserit Tayini



3.5. FOSFOLİPİD DÜZEYİ TAYİNİ

3.5.1. Prensip: Serumdan ekstre edilen fosfolipidler asit ortamda karbonize edilir ve organik fosfor olarak saptanır.

3.5.2. Çözeltiler

- 1) Etanol-Dietileter (E-DEE) 3:1 (v/v)
- 2) H₂O₂ %30
- 3) Amonyum molibdat % 0.22 (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4H₂O
- 4) Fiske –Subbarow Reaktifi;

Hazırlanışı; 200 ml taze fiske-subbarow hazırlamak için;

0.5 gr 1-amino-2-naphtol-4-sülfonik asid (ANSA) ile 200 ml taze hazırlanmış %7.5 luk Na₂S₂O₅ ile karıştırıldı ve 1 gr sodyum sülfid eklendi (Fiske-subbarow reaktifi siyah şişede en fazla 1 hafta saklandı).

- 5) Na₂S₂O₄ %7.5 200 ml
- 6) H₂SO₄ 10 N

Hazırlanışı; %98 lik H₂SO₄ den 200 ml, 10 N H₂SO₄ hazırlamak için;

(% X d X 1000) / molekül ağırlığı = (0.98 X 1.84 X 1000) / 98.08 = 18.4 mol/ L

Volum = (5 X 200) / 18.4 = 53.3 ml (10 N H₂SO₄ = 5 MH₂SO₄)

(% 98 lik H₂SO₄ den 53.4 ml alınıp 200 ml ye tamamlanarak 200 ml 10 N H₂SO₄ elde edildi.)

- 7) Standart fosfor (P) 0.15 µmol/mL

Hazırlanışı; 1 M KH₂PO₄ 130.1 gr/L (1 mol veya 30.97 gr/L P içerir)

0.15 mM KH₂PO₄ 20.4 mg/L (0.15 mmol P veya 4.64 mg/L P içerir)

20.4 mg KH₂PO₄ alınıp 1000 mL ye tamamlandı. 0.15 mmol/L KH₂PO₄ elde edilmiş oldu. Bu çözelti 0.15 µmol P/mL olarak standart-II yi oluşturur ve 4.64 µg/mL P içerir. Yarı yarıya sulandırılarak standart-I elde edildi.

3.5.3. Deneyin yapılışı

Ekstraksiyon işlemi referans 66 ya, fosfor tayini referans 67 ye göre yapıldı.

- 150 µL seruma 6 ml E-DEE karışımı eklenip vortekslendi.
- 7 ve 15 inci dakikalarda süpernatandan 1'er mL alınıp, E-DEE ile önceden ıslatılmış süzgeç kağıdı kullanılarak iki ayrı tüpe süzüldü.

- Azot atmosferi altında E-DEE tamamen uçuruldu. Kalıntı, fosfolipid analizi için kullanıldı.

Tablo.9. Fosfolipid Yakma İşlemi.

	Kör Tüp	Standart.I	Standart.II	Örnek(Kalıntı)
H_2SO_4 10 N (mL)	0.5	0.5	0.5	0.5
Standart-I (mL)	---	1.0	---	---
Standart-II (mL)	---	---	1.0	---
Su (mL)	1.0	---	---	1.0

Karışımlar 2 cm çaplı pyreks tüplerde 150-160 *C en az 3 saat yakıldı. 2 damla H_2SO_4 eklenip karışımlar renksizleşinceye kadar 1.5 saat boyunca yakmaya devam edildi. Yakma işlemi tamamlanıp tüplere aşağıdaki tablodaki miktarlarda amonyum molibdat ve fiske-subbarow reaktifi konuldu

Tablo.10. Fosfor Tayini

	Yakma işlemi yapılan tüp			
	Kör	Standart.I	Standart.II	Örnek
Amonyum molibdat(mL)	4.8	4.8	4.8	4.8
Fiske-subbarow (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2

Karışımlar vortekslendi. Cam bilyalarla kapatılmış tüplerde 7 dakika kaynar su banyosunda bırakıldı. 2 dakika içinde 830 nm de Shimadzu UV-1601 (UV-visible spectrophotometer) spektrofotometrede köre karşı okundu

Örneklerde Bulunan Fosfolipid Miktarının Hesaplanması:

1 M KH_2PO_4 -----30.97 gı/L fosfor,

0.15 μ M KH_2PO_4 -----4.64 μ gr /L fosfor içerir.

(Std-I abs + std-II abs) x (2/3) ----- 0.00464 mg/mL fosfor
Numune abs. (örnek 1 ve 2 ortalaması) ---- X mg/mL fosfor orantısından
numune fosfor içeriği bulunabilir. Ancak bu 25 µL serumdaki fosfor miktarı
olacağından 100 mL de 4000 katı olmalıdır.

$$4000 \times 0.00464 = 18.56 \text{ mg fosfor / dL}$$

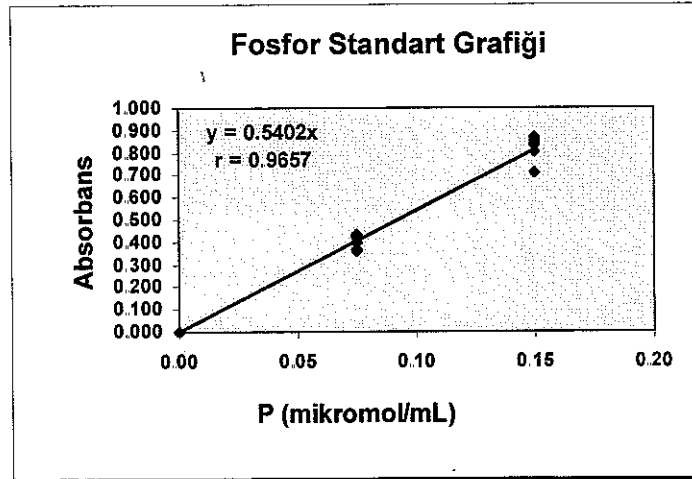
Fosfor ağırlıkça fosfolipidlerin % 2.2 si kadar olduğundan, bu miktar
 $18.56 \times (100 / 2.2) = 843 \text{ mg / dL fosfolipid miktarına karşılık gelir.}$

Sonuçta ;

(Std-I abs + std-II abs) x (2/3) ----- 843 mg / dL fosfolipid
Numune abs. (örnek 1 ve 2 ortalaması) ---- X mg / dL fosfolipid oranıtısı kullanıldı.

(Etanol-dietileterle muamele edilen serumdan, 7 ve 15 inci dakikalarda elde edilen
süpernatantlar arasında, belirgin absorbans farklılığı olmadığı görüldü ve ortalamaları
alındı).

3.5.4. Fosfor Standart Grafiği Hazırlanışı



Şekil.12. Standart-I ve standart-II kullanılarak hazırlanan fosfor standart grafiği ve r değeri

Std-I absorbansları . 0.395-0.361-0.369-0.427-0.420-0.400-0.436-0.432

Std-II absorbansları . 0.801-0.710-0.713-0.857-0.871-0.830-0.854-0.842

Ortalama Std-I= 0.405

Ortalama Std 2 =0.810

Her deneyde elde edilen standart absorbans değerleri birbirine yakın çıkmıştır ve yukarıdaki grafikteki gibidir (Şekil.12). Fosfor standart-I, II ve absorbans grafiği r değeri, 0.97 bulunmuştur. Bu grafiğe göre 0,15 mM fosfor , 0.810 luk absorbans vermiştir ve bu 843 mg/dL lik fosfolipide karşılık gelir.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel hesaplamalar SPSS 8.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Parametrelerin normal ve nefrotik grupları arası ya da grubıçı istatistiksel anlamlılık değerlendirmesinde uygun test öndęerlendirme ile seçildi ve T-test, Wilcoxon- Sigked test, Mann-Whitney testi ve regresyon analizi kullanıldı.

4. SONUÇLAR

Çalışmaya alınan kişilerin genel özellikleri ve biyokimyasal parametreleri tablo 6 ve 11 de gösterildi. Total protein, albumin, total kolesterol ve trigliserid serum düzeyleri, normal ve nefrotiklerde önemli derecede farklı bulundu (Şekil.13,14). (* $p < 0.0001$). Normal ve nefrotik grup arasında yaş ve BMI farkı önemsizdi ($p > 0.05$).

Nefrotik ve normal serum çiftleri üre denaturasyonu sonrası SPE ve serum BCG bağlama kapasitesi yönünden karşılaştırıldı (Tablo.12, 16).

Normal serumlarda test-kontrol kıyaslandığında, üre denaturasyonu SPE de albumin/globulin oranının % 72.49 ± 22.48 (ort \pm SD) azaldığı görüldü (Şekil.15.a, 16). Nefrotik serumda ise üre denaturasyonu albumin/globulin oranı % 13.45 ± 24.72 (ort \pm SD) azaldı (Şekil.15.a, 16). Bu iki değer kıyaslandığında anlamlı bir fark bulundu (* $p < 0,0001$). Tablo.12 de görüldüğü gibi bazı nefrotiklerde test A/G de kontrole göre artma olduğundan ürenin etkisi test (A/G) / kontrol (A/G) olarak da değerlendirildi (Şekil.15.b.). Bu oran nefrotiklerde anlamlı olarak yüksek bulundu (* $p < 0.0001$)

Şekil.17 de sonuçlara örnek olarak 19 numaralı normal-nefrotik çiftinin SPE ' nin elektroforetogramları dansitometrik analizleri ile gösterildi.

Normal SPE de albumin bandında azalma, α_2 ve β bandında artış (% 42.2 ve %19.3) görülmektedir. Normal test SPE görünümünün nefrotik kontrol SPE görünümü ile benzeştiği görülmektedir. A/G oranı da birbirine yakındır (Nefrotik kontrol için ortalama; 0.44 ve normal test için ortalama; 0.39). Yukarıda örnek olarak verilen 19 numaralı hasta ve kontrolünün SPE görünümü, tüm hasta ve kontrollerini temsil eder niteliktedir. Normal serumda üre denaturasyonu albumin bandı, α_1 ve α_2 bandına kaymış, nefrotik serumda ise üre denaturasyonu sonrası bandlarda belirgin değişim gözlenmemiştir.

Tablo.13 ve şekil 18, 19 da normal ve nefrotik bireylerde serumun üre ile denaturasyonu sonrası, kontrol örneklerine göre SPE değişimleri verilmiştir. Üre denaturasyonu normal serumda albumin, α_1 , α_2 ve γ bandlarında belirgin değişime neden olmuştur (albumin ve γ bandlarında azalma, α_1 , α_2 de artış ve $*p<0.0001$). Sadece β bandında anlamlı bir değişim gözlenmemiştir ($^{\circ}p>0.05$).

Nefrotik serumda üre denaturasyonu sonrası kontrol serum örneklerine göre SPE bandlarında % miktar olarak belirgin bir değişim gözlenmemiştir (albumin, α_1 , α_2 , β ve γ için $^{\circ}p>0.05$).

SPE albumin % miktarları üre ile işlem görmüş normal serum ve nefrotik kontrol serum arasında karşılaştırıldı ve anlamlı fark bulunamadı ($^{\circ}p>0.05$).

Üre denaturasyonu sonrası serumun BCG bağlama kapasitesi normal ve nefrotik çiftlerde kontrollerine göre önemli fark göstermedi. (Tablo.16 ve 18. $^{\circ}p>0.05$)

Üre denaturasyonu sonrası normal serumda SPE ile albumin % değerlerinde belirgin değişiklik gözlenirken, BCG yöntemiyle albumin değerlerinde anlamlı değişiklik izlenmemiştir (SPE de $*p<0.0001$ BCG de $^{\circ}p>0.05$). İdiopatik nefrotik serumda ise hem SPE ile hem boya bağlama yöntemiyle ölçülen albumin değerlerinde anlamlı değişim olmamıştır. (SPE de $^{\circ}p>0.05$ BCG de $^{\circ}p>0.05$)

Normal ve nefrotik serum çiftleri 2-ME denaturasyonu sonrası total kolesterol ve trigliserit düzeyleri yönünden karşılaştırıldı (Tablo.14, 15).

Şekil.20 de 2-ME denaturasyonu sonrası serum T.Kol. düzeyleri ortalamaları, normal(şekil.20.a) ve nefrotik(şekil.20.b) bireylerde, grubu içi test-kontrol kıyaslanarak ve mg/dL olarak gösterildi. T. Kol düzeyinin herbir grubda farklı derişimdeki 2-ME ile denaturasyonla anlamlı olarak düştüğü gözlendi ve nefrotik kontrol-%0.6 ME, nefrotik %0.6-%0.7 ME, nefrotik %0.7-%0.6 ME, normal kontrol-%0.6 ME, normal %0.6-%0.7 ME ve normal %0.7-%0.6 ME için p değeri, $*p<0.0001$ olarak bulundu. Normal ve nefrotik serumların 2-ME ile denatüre edilmiş test örneklerinde T.Kol. miktarının kontrole göre % değişimi bulundu ve gruplar arasında total

kolesteroldaki değişim(azalma) % leri karşılaştırıldı. % 0.6 2-ME ve % 0.7 2-ME derişiminde total kolesterolün % olarak azalması normal ve nefrotik serumlar arası anlamlı olarak farklı iken (*p<0.0001), % 6.0 2-ME derişiminde total kolesteroldaki % azalma istatistiksel olarak farklı bulunmadı (°p>0.05) (şekil 21).

Şekil.22 de 2-ME denaturasyonu sonrası serum trigliserit düzeyleri mg/dL olarak normal (şekil 22.a) ve nefrotik (şekil.22.b) bireylerde test-kontrol kıyaslanarak gösterildi. TG düzeyinin herbir grubda farklı derişimdeki 2-ME ile denaturasyonla anlamlı olarak düştüğü gözlemlendi ve nefrotik kontrol-%0.6 ME , nefrotik % 0.6-%0.7 ME , nefrotik %0.7-% 6.0 ME , normal kontrol-%0.6 ME , normal % 0.6-%0.7 ME ve normal 0.7-% 6.0 ME için p değeri, *p<0.0001 olarak bulundu. Normal ve nefrotik serumların trigliseritlerinde 2-ME denaturasyonuna bağlı olan azalmalar şekil.23 de % olarak değerlendirilip karşılaştırıldığında, % 6.0 derişiminde fark bulunmazken (°p>0.05), %0.7 ve %0.6 derişimlerinde *p< 0.0001 olacak şekilde anlamlı fark bulundu.

Tablo.17 ve şekil.24 de, normal ve nefrotik bireylerin kimyasal yöntemle saptanan serum total fosfolipid miktarlarının dağılımı görülmektedir. Normal kişilerin serum total fosfolipid değeri 173.7±46.4 ve nefrotik kişilerin 421.4±83.4 bulundu. İki grup arasında anlamlı bir fark vardır (*p<0.0001, şekil.25).

Tablo.11. Normal ve Nefrotik Kişilerin Yaş Dağılımı ve Serum Albumin, Total Protein, TG ve Total Kolesterol Miktarları.

NORMAL- Yaş (SAĞLIKLI)		Alb. g/dL	T.Prt g/dL	TG mg/dL	T.Kol mg/dL	NEFROTİK (HASTA)		Yaş	Alb. g/dL	T.Prt g/dL	TG mg/dL	T.Kol. mg/dL	
S1	HA	1.5	4.3	7.7	193	200	H1	FÇ	1	0.4	5.8	1421	442
S2	GO	1.5	4.0	8.5	116	179	H2	NH	1	1.3	4.4	101	278
S3	B.G	1.5	4.8	7.9	61	179	H3	YY	1.5	2.0	5.3	300	330
S4	HC	2	4.3	7.3	75	148	H4	UŞ	15	0.8	2.9	379	513
S5	AO	3	4.4	7.3	54	124	H5	FK	2.5	2.0	5.0	100	327
S6	SB	3	4.8	7.9	68	168	H6	MK	3	1.4	4.5	268	465
S7	KG	3.5	4.4	7.2	120	122	H7	İY	3.5	1.9	4.1	141	296
S8	V.K	7	4.3	7.0	102	174	H8	İS	6	1.0	4.0	321	567
S9	İG	7	4.9	7.8	118	134	H9	UÜ	7	1.9	4.5	261	300
S10	TY	7.5	4.2	7.4	46	132	H10	MA	7	0.4	3.7	495	792
S11	H.G	8	3.7	7.8	91	140	H11	HÖ	8	2.9	6.7	94	228
S12	EP	8	3.6	7.8	87	138	H12	OG	8	1.1	3.3	834	432
S13	NB	8	4.1	6.5	246	181	H13	ZO	8	1.3	3.9	307	464
S14	MA	8	4.0	6.7	47	180	H14	M.G	8.5	2.1	5.3	433	310
S15	MO	9.5	4.6	7.4	38	197	H15	EB	10	0.5	4.0	372	926
S16	AS	12	4.6	7.5	68	131	H16	YD	12	1.0	4.6	312	510
S17	HÇ	12	4.3	7.3	137	186	H17	AÖ	13	2.0	5.2	297	286
S18	ÇD	13	6.0	7.4	108	186	H18	AÇ	13	1.0	3.8	276	393
S19	M.M	13	4.2	7.7	95	182	H19	CY	14	0.8	3.9	163	375
S20	S.Ş	15	4.5	8.0	122	145	H20	YÜ	14	1.8	4.9	392	502
S21	BY	16	4.2	7.1	106	166	H21	ET	16	1.4	4.2	174	285
S22	M.Ö	19	4.3	7.1	126	196	H22	NB	18	1.2	3.5	446	277
S23	S.İ	23	4.0	7.6	345	305	H23	Ş.D	23	0.4	3.3	259	226
S24	D.K	24	4.0	7.9	86	130	H24	H.D	23	2.7	4.3	286	383
S25	C.S	24	4.2	7.2	74	120	H25	C.M	26	1.9	3.8	298	330
S26	G.T	37	4.2	7.8	90	155	H26	A.T	36	1.3	3.7	462	404
S27	G.Y	50	4.1	7.8	68	135	H27	D.K	48	2.2	5.3	100	382
S28	H.Ç	65	5.0	8.0	100	200	H28	H.T	65	0.8	3.5	567	418
S29	M.T	67	3.9	6.3	62	104	H29	M.T	67	1.2	5.0	304	314
S30	S.S	70	4.8	7.5	78	198	H30	H.D	74	2.0	4.9	402	380
ortalama		17.9	4.36	7.48	104	165	ortalama		17.9	1.42	4.41	352	404
SD		19.9	0.46	0.47	62	39	SD		20.2	0.73	0.82	255	152

Tablo.12. Normal ve Nefrotik Kişilerde Üre Denaturasyonu Sonrası Albumin /Globulin(A/G) Değerleri

NORMAL(SAĞLIKLI)				NEFROTİK (HASTA)			
Kontrol A/G	Test A/G	Test (A/G) Kontrol(A/G)		Kontrol A/G	Test A/G	Test (A/G) Kontrol(A/G)	
1.75	0.37	0.211	H1	FÇ	0.12	0.13	1.083
1.13	0.46	0.407	H2	N.H	0.52	0.56	1.077
2.19	0.31	0.146	H3	Y.Y	0.62	0.22	0.354
1.68	0.41	0.244	H4	UŞ	0.37	0.34	0.919
1.69	0.19	0.112	H5	F.K	0.54	0.53	0.981
1.58	0.40	0.253	H6	M.K	0.60	0.49	0.817
1.92	0.75	0.390	H7	İ.Y	0.78	0.76	0.974
1.83	0.83	0.454	H8	İ.S	0.24	0.26	1.083
2.15	0.07	0.033	H9	U.U	0.89	0.74	0.832
1.76	0.10	0.057	H10	MA	0.15	0.15	1.000
0.96	0.53	0.552	H11	H.Ö	0.96	0.36	0.375
0.94	0.60	0.638	H12	OG	0.36	0.36	1.000
1.75	0.26	0.148	H13	Z.O	0.30	0.29	0.966
1.52	0.87	0.573	H14	M.G	0.72	0.25	0.347
1.88	0.42	0.223	H15	E.B	0.21	0.21	1.000
2.11	0.10	0.047	H16	Y.D	0.40	0.39	0.975
1.67	0.20	0.120	H17	A.Ö	0.82	0.16	0.195
1.32	1.05	0.795	H18	A.Ç	0.37	0.36	0.973
1.50	0.44	0.293	H19	C.Y	0.27	0.28	1.084
1.31	0.55	0.420	H20	Y.Ü	0.61	0.53	0.869
1.53	0.18	0.118	H21	E.T	0.59	0.57	0.966
1.59	1.08	0.679	H22	N.B	0.43	0.48	1.116
1.18	0.63	0.534	H23	Ş.D	0.18	0.17	0.944
1.87	0.10	0.053	H24	H.D	0.12	0.06	0.500
1.99	0.10	0.050	H25	C.M	0.33	0.30	0.909
1.34	0.66	0.493	H26	A.T	0.16	0.17	1.063
1.53	0.08	0.052	H27	D.K	0.28	0.22	0.786
1.99	0.10	0.050	H28	H.T	0.33	0.30	0.909
1.36	0.07	0.051	H29	M.T	0.61	0.61	1.000
1.70	0.04	0.024	H30	H.D	0.45	0.41	0.911
1.624	0.398	0.2453	ortalama		0.444	0.355	0.7997
0.330	0.304	0.9207	SD		0.236	0.180	0.4062

Normal ve nefrotik serumlar kontrol (üresiz), test(üre ile denatüre edilmiş) olarak ayrılıp metodlar kısmında belirtildiği gibi SPE uygulandı. Elektroforotik A/G oranları belirlendi.

Tablo.13. Üre Denaturasyonu Öncesi ve Sonrası Normal ve Nefrotik Serumun Elektroforetik Fraksiyonlarının Protein Alt Grupları Yüzdeleri.

NORMAL										NEFROTİK									
Kontrol					Test					Kontrol					Test				
Alb (%)	α_1 (%)	α_2 (%)	β (%)	γ (%)	Alb (%)	α_1 (%)	α_2 (%)	β (%)	γ (%)	Alb (%)	α_1 (%)	α_2 (%)	β (%)	γ (%)	Alb (%)	α_1 (%)	α_2 (%)	β (%)	γ (%)
63.8	2.3	9.3	10.3	14.3	27.4	41.0	12.8	7.2	11.6	10.7	2.9	43.6	4.2	38.6	11.8	0.0	34.4	18.9	34.5
63.1	3.4	11.5	9.9	22.1	31.6	20.2	10.0	21.4	16.8	34.2	6.0	26.3	19.8	13.7	36.1	7.0	34.9	7.0	15.0
66.7	1.9	7.8	7.6	14.0	23.9	47.7	8.8	7.3	12.3	38.7	4.4	24.4	20.6	11.9	18.7	19.4	40.0	9.8	12.1
62.7	2.2	11.0	9.5	14.6	29.3	36.1	15.3	6.4	12.9	27.3	3.4	24.5	19.9	24.9	25.9	2.1	27.0	19.9	25.1
63.0	2.1	12.0	7.5	15.4	16.5	47.4	10.0	10.7	13.4	35.4	3.2	28.5	19.5	13.4	34.8	0.0	18.5	34.5	12.2
61.2	2.4	10.7	9.9	15.8	28.7	33.2	12.0	13.0	13.1	37.6	3.1	32.1	17.2	10.0	33.1	2.0	34.4	19.2	11.3
65.8	2.6	8.7	12.9	10.0	43.1	25.6	15.3	6.4	9.6	44.0	3.4	27.3	16.6	8.7	43.1	6.0	24.7	15.8	10.4
64.8	2.5	10.9	9.1	12.7	45.6	21.9	12.4	7.4	12.7	19.9	2.8	53.9	23.4	0.0	20.6	3.0	55.3	21.1	0.0
68.3	2.3	8.7	9.8	10.9	7.3	15.0	50.0	20.0	7.7	47.2	4.5	20.3	17.0	11.0	42.7	0.0	22.4	26.1	8.8
63.9	2.5	9.4	10.4	13.8	9.9	20.0	40.0	18.7	11.4	13.4	2.9	57.3	21.9	4.5	13.2	1.4	58.4	20.1	6.9
49.1	3.2	15.2	11.6	20.9	34.6	13.3	26.4	6.8	18.9	49.1	3.1	26.1	14.7	7.0	26.9	21.5	35.1	10.7	5.8
48.7	3.5	14.8	13.0	20.0	37.6	12.1	23.4	7.1	19.8	26.8	3.0	41.5	19.5	9.2	26.6	1.9	42.6	19.2	9.7
63.7	2.5	12.7	10.3	10.8	21.1	46.4	15.3	6.3	10.9	23.6	3.2	55.4	6.6	11.2	22.8	0.9	44.7	18.3	13.3
60.4	2.4	10.6	10.6	16.0	46.8	10.3	18.3	8.4	16.2	42.0	3.2	30.9	16.5	7.4	20.4	14.1	32.4	31.7	1.4
65.4	3.5	14.2	9.7	7.2	29.9	34.4	16.9	10.0	8.8	17.9	2.7	50.1	20.4	8.4	17.5	4.1	50.0	25.4	3.0
67.9	2.0	8.7	7.2	14.2	9.7	44.6	20.0	14.3	11.4	28.6	3.9	37.2	22.8	7.5	28.1	4.0	36.6	23.2	8.1
62.5	2.5	10.3	10.4	14.3	17.1	49.0	15.5	7.0	11.4	45.1	3.1	23.4	15.0	13.4	14.5	13.8	27.6	42.5	1.6
67.1	2.7	10.7	13.0	16.5	51.2	12.0	12.1	13.4	11.3	27.1	6.7	36.7	21.3	8.2	26.9	2.7	42.5	19.0	8.9
63.3	2.8	9.7	13.6	15.6	31.3	30.1	10.0	15.8	12.8	21.7	6.2	45.9	17.8	8.4	22.1	8.0	43.3	18.5	8.1
69.8	3.3	10.6	10.2	19.1	35.7	24.4	16.0	7.8	16.1	38.0	4.8	34.1	16.7	6.4	35.0	0.0	56.5	4.1	4.4
60.6	3.0	7.3	10.8	18.4	15.7	41.3	17.0	10.9	15.1	37.3	4.2	31.3	16.3	10.9	36.5	2.6	34.2	15.8	10.9
61.4	3.4	12.8	8.9	13.1	52.1	7.7	20.5	7.3	12.4	30.3	5.8	38.2	21.5	4.2	32.5	2.0	41.4	16.5	7.6
63.1	4.3	10.4	11.8	19.2	38.8	15.3	18.8	9.8	17.3	15.5	12.4	46.3	19.5	6.3	14.9	15.0	44.5	21.8	3.8
65.2	2.1	8.7	8.4	15.6	9.3	25.0	30.0	23.8	11.9	11.4	9.6	47.3	24.6	7.1	5.7	5.6	40.0	27.6	21.1
66.7	2.1	11.6	9.6	10.0	9.5	20.0	42.8	20.0	7.7	25.1	4.4	48.3	11.0	11.2	23.1	8.0	52.0	8.0	8.9
67.3	3.0	11.9	11.8	16.0	39.8	2.6	30.9	15.1	11.6	14.4	4.7	52.7	23.2	5.0	15.0	3.7	54.0	21.0	6.3
67.1	2.7	10.9	11.5	14.4	8.1	20.0	42.2	20.0	9.7	22.3	2.7	51.1	18.9	5.0	18.5	2.7	33.1	45.7	0.0
66.7	2.1	11.6	9.6	10.0	9.5	19.0	42.8	21.0	7.7	25.1	4.4	48.3	11.2	11.0	23.1	7.9	53.1	7.0	8.9
67.6	3.3	11.9	10.1	17.1	6.9	41.0	30.0	14.4	7.7	38.1	4.6	30.4	16.7	10.2	38.1	0.0	38.2	13.7	10.0
63.0	2.8	9.1	9.2	15.9	3.9	6.6	50.1	29.9	9.5	31.1	4.7	32.2	19.3	12.7	29.6	0.0	43.5	11.7	15.2
61.3	2.7	10.8	10.3	14.9	25.7	26.1	22.9	12.9	12.3	29.3	4.4	38.2	17.8	10.2	25.7	5.3	39.8	19.8	9.8
25.7	26.1	22.9	12.9	12.3	14.8	14.1	12.7	6.4	3.8	25.7	5.3	39.8	19.8	9.8	9.4	5.8	10.2	9.6	7.2

Tablo.14 2-ME ile Denatüre Edilmiş Normal ve Nefrotik Serumun Total Kolesterol Değerleri.

NORMAL (SAĞLIKLI)						NEFROTİK (HASTA)					
Total Kolesterol(mg/dL)						Total Kolesterol(mg/dL)					
	Kontrol	2-ME (%)				Kontrol	2-ME (%)				
		0.6	0.7	6.0			0.6	0.7	6.0		
S1	HA	162	66	34	1	H1	F.Ç	306	232	172	2
S2	GÖ	125	56	28	1	H2	N.H	216	144	90	2
S3	BG	139	57	29	2	H3	Y.Y	262	139	86	3
S4	HC	104	45	25	4	H4	U.Ş	406	307	246	41
S5	AÖ	86	34	18	1	H5	F.K	249	162	107	8
S6	SB	111	42	24	1	H6	M.K	360	248	165	19
S7	KG	79	34	18	2	H7	İ.Y	239	150	96	6
S8	V.K	119	52	28	2	H8	İ.S	454	300	214	19
S9	İ.G	101	45	22	9	H9	U.Ü	254	200	170	3
S10	T.Y	100	45	26	4	H10	M.A	638	548	454	82
S11	H.G	103	42	22	5	H11	H.Ö	158	104	65	7
S12	EP	94	40	30	2	H12	O.G	352	239	147	17
S13	NB	133	50	34	18	H13	Z.O	383	237	183	15
S14	MA	143	58	32	5	H14	M.G	226	137	85	4
S15	M.O	147	71	40	5	H15	E.B	808	636	511	68
S16	AS	87	38	19	7	H16	Y.D	391	255	210	7
S17	HÇ	131	49	36	3	H17	A.Ö	214	155	103	2
S18	Ç.D	133	44	36	4	H18	A.Ç	344	281	197	15
S19	MM	132	42	34	4	H19	C.Y	331	273	186	15
S20	S.Ş	104	30	25	3	H20	Y.Ü	422	334	218	17
S21	BY	121	41	32	5	H21	E.T	245	201	132	9
S22	MÖ	145	49	40	4	H22	N.B	238	194	136	11
S23	S.I	128	43	33	5	H23	Ş.D	190	120	94	8
S24	DK	85	34	21	3	H24	H.D	300	213	150	15
S25	CS	72	34	21	6	H25	C.M	260	166	109	5
S26	GT	104	39	23	5	H26	A.T	321	218	138	19
S27	GY	92	37	21	2	H27	D.K	268	195	123	8
S28	HÇ	138	41	25	8	H28	H.T	348	264	188	28
S29	MT	69	36	29	3	H29	M.T	242	196	138	17
S30	S.S	125	57	26	10	H30	H.D	288	184	146	14
ortalama		113.7	45.0	27.7	4.5	ortalama		323.8	234.4	168.6	16.2
SD		24.4	9.9	6.7	3.4	SD		132.3	113.6	97.1	18.2

Normal ve nefrotik serumlar kontrol ve test olarak ayrılıp metodlar kısmında belirtildiği gibi değişik derişimlerde 2-ME ile işlem yapıldı total kolesterol değerleri saptandı

Tablo.15. 2-ME le Denatüre Edilmiş Normal ve Nefrotik Serumun TG Değerleri.

NORMAL (SAĞLIKLI)						NEFROTİK (HASTA)					
TG(mg/dL)						TG(mg/dL)					
		Kontrol	2-ME (%)					Kontrol	2-ME (%)		
			0.6	0.7	6.0				0.6	0.7	6.0
S1	H.A	168	29	10	0	H1	FÇ	1410	857	617	1
S2	G.Ö	94	14	5	0	H2	NH	79	34	15	1
S3	B.G	74	10	5	0	H3	YY	270	86	36	1
S4	H.C	59	11	7	2	H4	UŞ	312	166	98	5
S5	A.Ö	41	7	4	0	H5	F.K	81	19	10	1
S6	S.B	49	6	4	0	H6	M.K	215	88	38	3
S7	K.G	81	14	7	0	H7	I.Y	109	30	12	1
S8	V.K	68	10	5	0	H8	İ.S	237	84	39	1
S9	İ.G	78	4	1	1	H9	U.Ü	226	126	80	2
S10	T.Y	23	1	0	0	H10	MA	402	267	167	3
S11	H.G	82	13	17	4	H11	H.Ö	73	27	13	3
S12	E.P	75	13	9	6	H12	O.G	710	305	142	14
S13	N.B	203	40	22	11	H13	Z.O	277	110	47	8
S14	M.A	55	7	5	2	H14	M.G	321	131	73	10
S15	M.O	25	1	0	0	H15	E.B	308	137	65	1
S16	A.S	59	6	5	5	H16	Y.D	266	94	61	0
S17	H.Ç	94	10	6	0	H17	A.Ö	250	124	57	0
S18	Ç.D	77	4	2	1	H18	A.Ç	234	143	65	4
S19	M.M	70	2	1	1	H19	C.Y	140	78	30	4
S20	S.Ş	92	4	1	1	H20	Y.Ü	324	193	76	8
S21	B.Y	80	8	6	1	H21	E.T	143	82	32	5
S22	M.Ö	94	5	2	1	H22	N.B	423	307	167	4
S23	S.İ	84	4	1	0	H23	Ş.D	231	85	52	0
S24	D.K	54	7	2	0	H24	H.D	230	108	55	0
S25	C.S	42	8	3	1	H25	C.M	238	88	54	2
S26	G.T	58	3	1	0	H26	A.T	375	135	78	4
S27	G.Y	42	4	3	0	H27	D.K	72	32	23	1
S28	H.Ç	66	12	3	0	H28	H.T	464	222	111	0
S29	M.T	40	4	2	0	H29	M.T	228	119	64	0
S30	S.S	49	5	4	0	H30	H.D	295	165	77	3
ortalama		72.5	8.9	4.8	1.2	ortalama		298.1	148.0	81.8	3.0
SD		36.8	8.0	4.8	2.4	SD		248.5	153.5	109.0	3.3

Normal ve nefrotik serumlar kontrol ve test olarak ayrılıp metodlar kısmında belirtildiği gibi değişik derişimler de 2-ME ile işlem yapıldı ve TG değerleri saptandı.

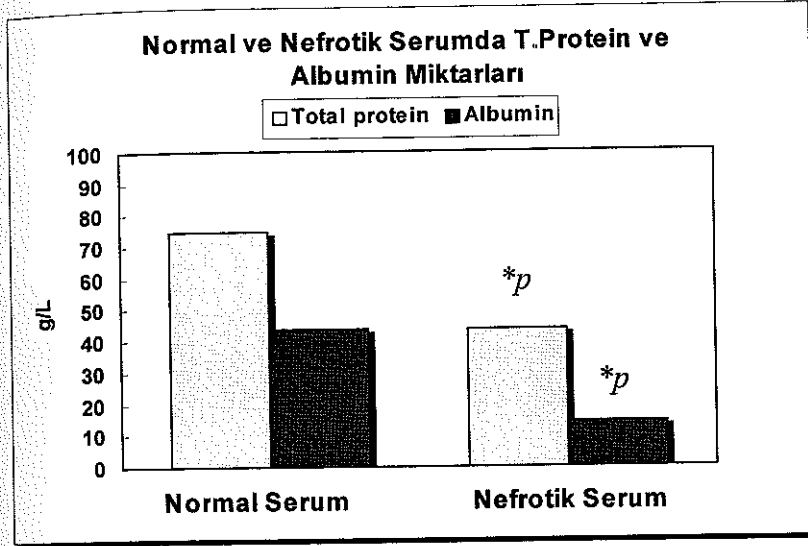
Tablo.16. Üre Denaturasyonu Sonrası BCG Boya Bağlama Yöntemiyle Albumin Değerleri (solda).

Tablo.17. Normal ve Nefrotik Kişilerdeki Fosfolipid Miktarları (sağda).

NORMAL		NEFROTİK		
BCG-Albumin(g/dL)		BCG-Albumin(g/dL)		
Kontrol	Test	Kontrol	Test	
3.0	H1	0.4	0.4	
2.9	H2	1.3	1.3	
3.4	H3	1.7	1.7	
3.0	H4	0.7	0.7	
2.8	H5	1.4	1.4	
3.0	H6	1.3	1.3	
3.1	H7	1.7	1.6	
3.2	H8	0.6	0.6	
3.1	H9	2.2	2.3	
2.9	H10	0.5	0.5	
2.6	H11	2.2	2.2	
2.4	H12	0.8	0.8	
3.1	H13	0.7	0.8	
3.0	H14	1.6	1.6	
3.3	H15	0.5	0.5	
3.1	H16	1.0	0.9	
2.9	H17	1.5	1.6	
3.4	H18	1.0	1.0	
3.2	H19	0.7	0.8	
3.0	H20	1.6	1.6	
2.9	H21	1.4	1.4	
3.4	H22	1.1	1.0	
2.8	H23	0.4	0.5	
3.7	H24	2.0	2.0	
3.8	H25	1.4	1.3	
3.7	H26	1.0	1.0	
3.1	H27	1.5	1.4	
4.2	H28	0.6	0.6	
3.6	H29	0.8	0.7	
2.7	H30	1.7	1.7	
3.20	3.10	Ort.	1.18	1.20
0.41	0.39	SD	0.52	0.52

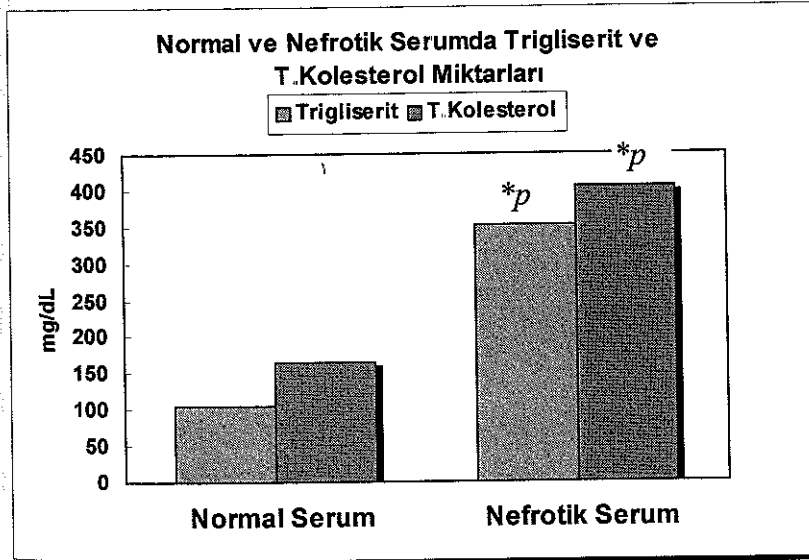
NORMAL		NEFROTİK	
Fosfolipid (mg/dL)			
S1-H1	168	451	
S2-H2	214	501	
S3-H3	216	179	
S4-H4	187	490	
S5-H5	243	525	
S6-H6	84	438	
S7-H7	168	439	
S8-H8	154	507	
S9-H9	145	355	
S10-H10	159	420	
S11-H11	220	321	
S12-H12	267	479	
S13-H13	163	368	
S14-H14	217	310	
S15-H15	165	256	
S16-H16	108	486	
S17-H17	116	459	
S18-H18	203	429	
S19-H19	215	465	
S20-H20	156	498	
S21-H21	219	450	
S22-H22	85	306	
S23-H23	184	490	
S24-H24	152	423	
S25-H25	168	492	
S26-H26	202	354	
S27-H27	154	367	
S28-H28	84	501	
S29-H29	221	432	
S30-H30	164	451	
ortalama	173.7	421.4	
SD	46.7	83.4	

Yaş ve cinsiyet uyumlu normal ve nefrotik bireylerin serumlarında albumin ve total protein düzeyleri BCG bağlama ve biüret yöntemiyle saptandı.



Şekil.13. Albumin ve total protein düzeyleri, normal ve nefrotik serumda anlamlı olarak farklı bulunmuştur (T Protein için $*p < 0.0001$, Albumin için $*p < 0.0001$)

Serum lipid düzeyleri enzimatik yöntemle saptandı.

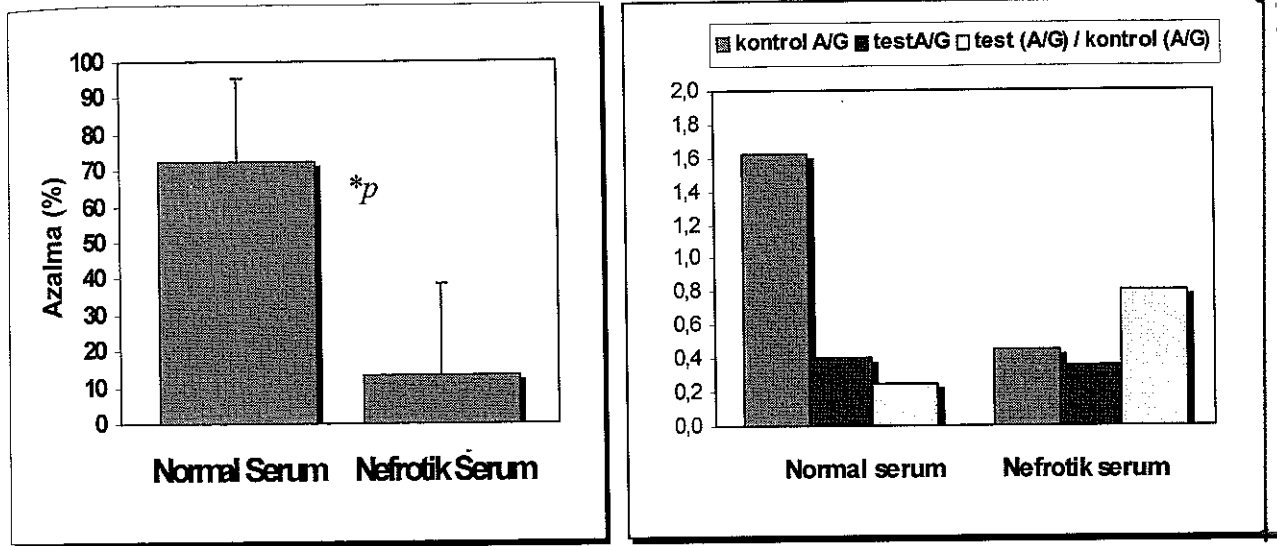


Şekil.14. Total kolesterol ve TG düzeyleri, normal ve nefrotik serumda anlamlı olarak farklı bulunmuştur (TG için $*p < 0.0001$, T Kolesterol için $*p < 0.0001$)

Serumlar, metodlar bölümünde tarif edildiği gibi kontrol-test olarak hazırlanıp 4 mg üre / mg protein derişiminde denatüre edildi. 30 *C da 24 saat inkübasyondan sonra elektroforez uygulandı.

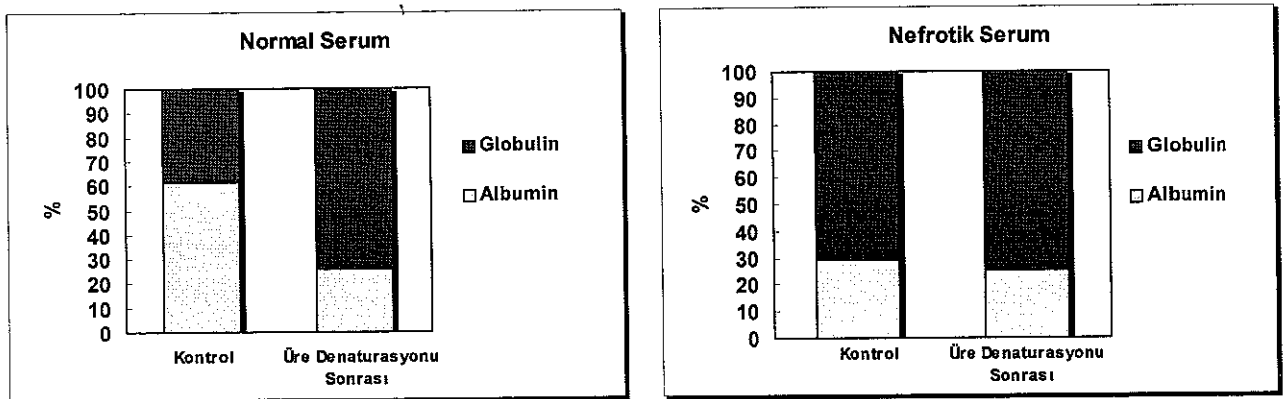
Şekil.15.a. Normal ve nefrotik serumun üre denaturasyonu ile SPE albumin / globulin oranları değişimi (solda)

Şekil.15.b. Normal ve nefrotik serumun üre denaturasyonu ile kontrol test A/G oranları ve test (A/G)/kontrol (A/G) değerleri (sağda).



Normal ve nefrotik serumdaki albumin / globulin oranı değişimi (* $p < 0.0001$).

Normal ve nefrotik serumda test (A/G) / kontrol (A/G) oranları birbirinden anlamlı olarak farklıdır (* $p < 0,0001$).

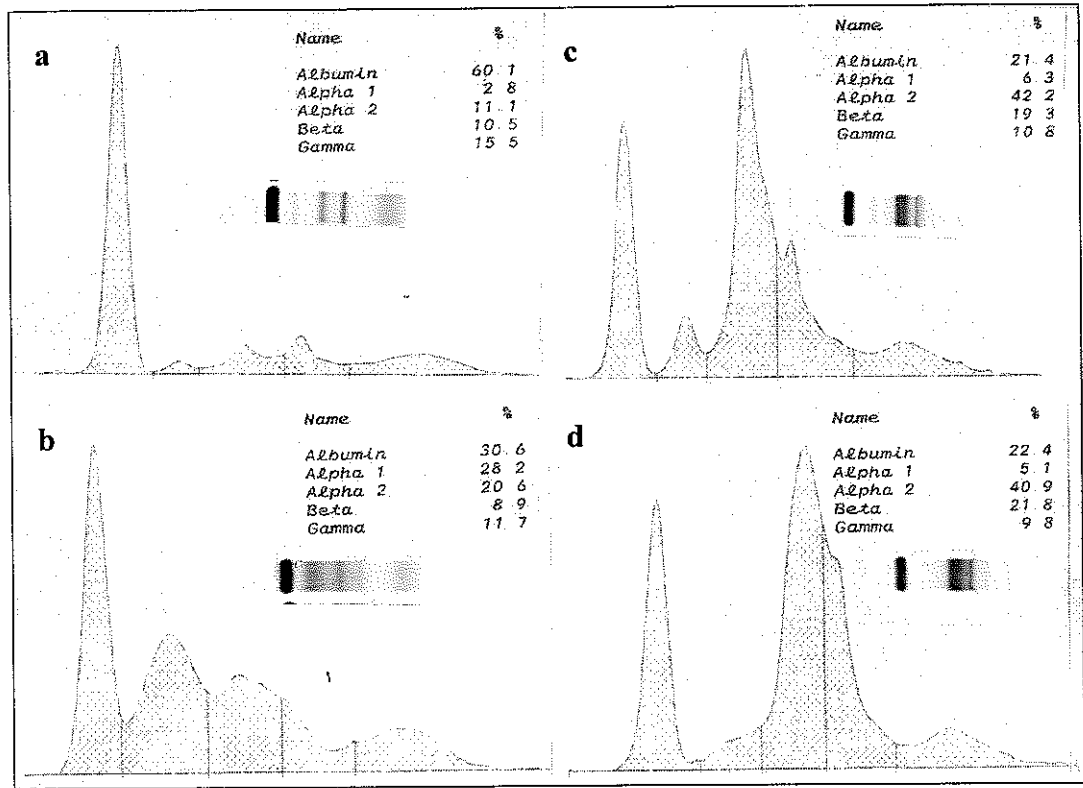


Şekil.16. Normal ve nefrotik serumun üre denaturasyonu ile SPE albumin / globulin değişimi.

Tablo.18. Üre Denaturasyonu sonrası BCG Boya Bağlama Yöntemiyle Albumin Değerleri

BCG Boya Bağlama Yöntemi	Albumin (g/dL)	
	Normal Serum	Nefrotik Serum
Kontrol	3.20±0.41	1.18±0.52
Test	3.10±0.39 (°p)	1.20±0.52 (°p)

Normal ve nefrotik serumların kontrol ve testleri üre denaturasyonu için metodlardaki gibi işleme konuldu (°p>0.05)

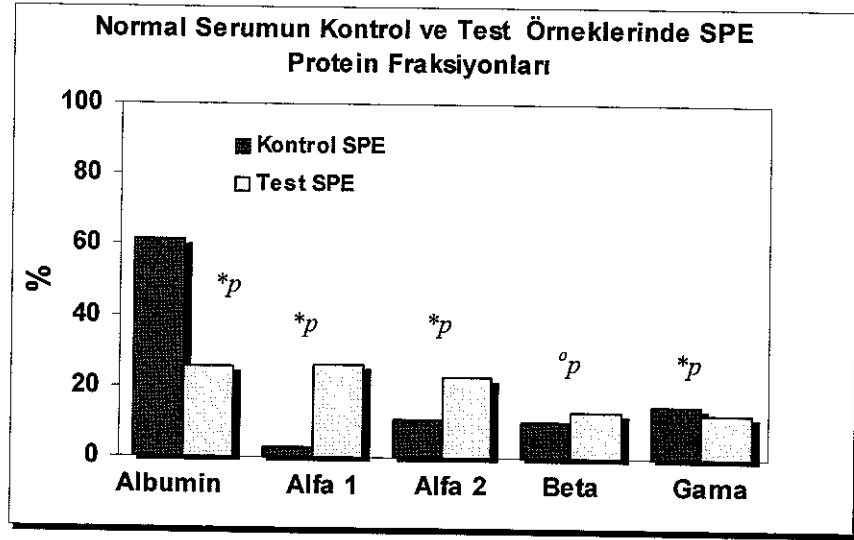


Şekil.17. Normal ve nefrotik seruma üre etkisinin SPE ile gösterilmesi.

- a) Normal kontrol c) Nefrotik kontrol
b) Normal test d) Nefrotik test

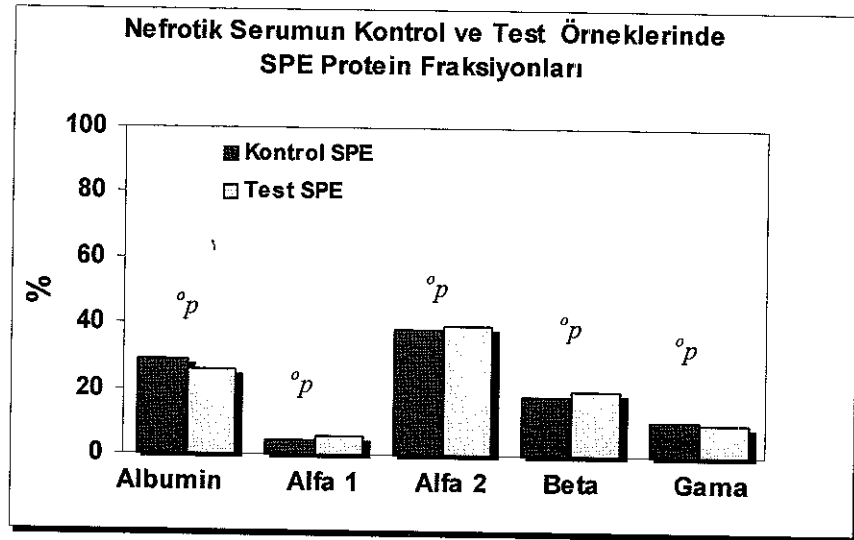
Serumlar kontrol-test olarak hazırlandı. 4 mg üre /mg protein derişiminin etkisini gözlemek için 30°C da 24 saat inkübe edildi. Elektroforetik analiz dansitometrik olarak ve band görünümünde gösterildi

Şekil.18. Normal serumda üre inkubasyonu sonrası SPE protein bandlarının % değişimleri.



(*p<0.0001, °p>0.05)

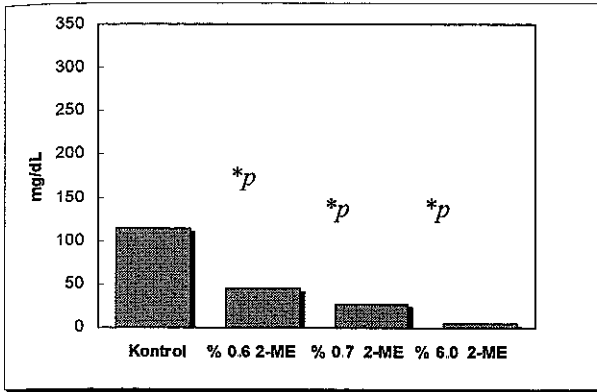
Şekil.19. Nefrotik serumda üre inkubasyonu sonrası SPE protein bandlarının % değişimleri.



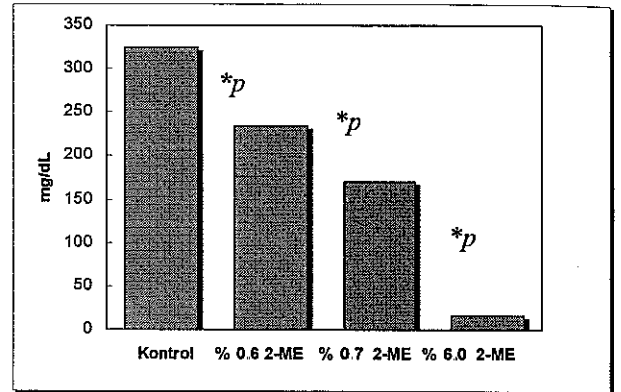
(°p>0.05)

Şekil.20. Farklı derişimlerdeki 2-ME ün normal ve nefrotik serumda total kolesterol düzeylerine etkisi.

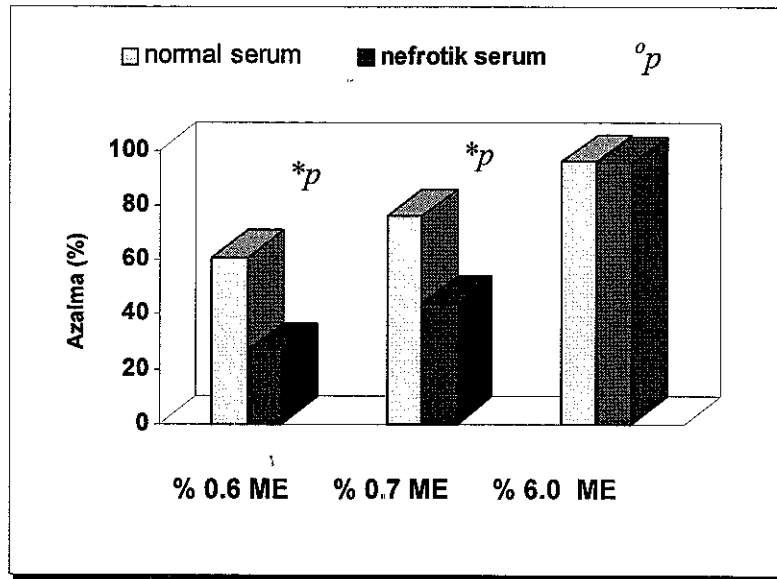
a) Normal Serum



b) Nefrotik Serum



Serumlar metodlarda belirtildiği gibi kontrol-test olarak hazırlanıp, herbir test grubu kontrole konulan SF ile aynı miktar % 0,6 % 0,7 yada % 6,0 2-ME ile denatüre edildi T Kolesterol enzimatik yöntemle saptandı(* $p < 0.0001$)

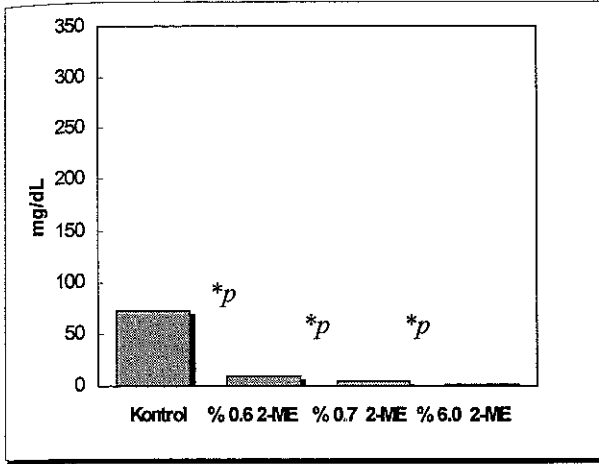


Şekil.21. 2-ME ün normal ve nefrotik serumda total kolesterol düzeyine etkisi.

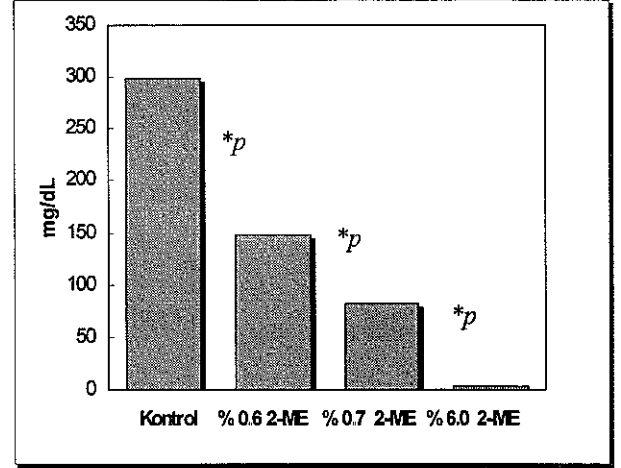
Lipid düzeyindeki azalmalar normale göre değerlendirildi (* $p < 0.0001$ ve ° $p > 0.05$).

Şekil.22. Farklı derişimlerdeki 2-ME ün normal ve nefrotik serumda TG düzeyine etkisi.

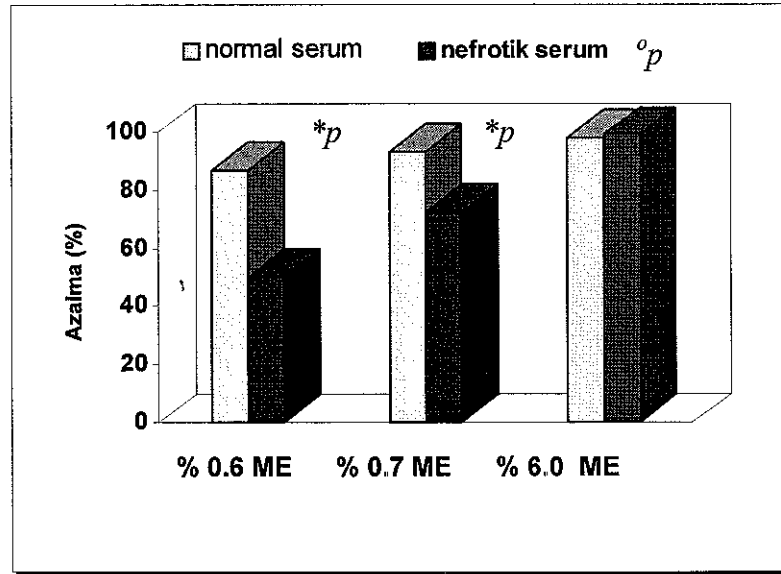
a) Normal Serum



b) Nefrotik Serum

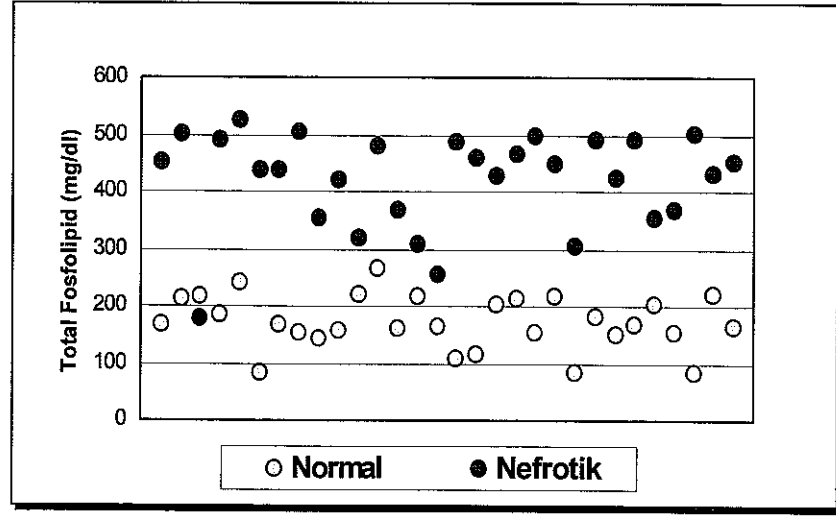


Serumlar metodlarda belirtildiği gibi kontrol-test olarak hazırlanıp herbir test grubu kontrole konulan SF ile aynı miktar % 0.6 % 0.7 ya da % 6.0 2-ME ile denatüre edildi. TG enzimatik yöntemle saptandı (* $p < 0.0001$)

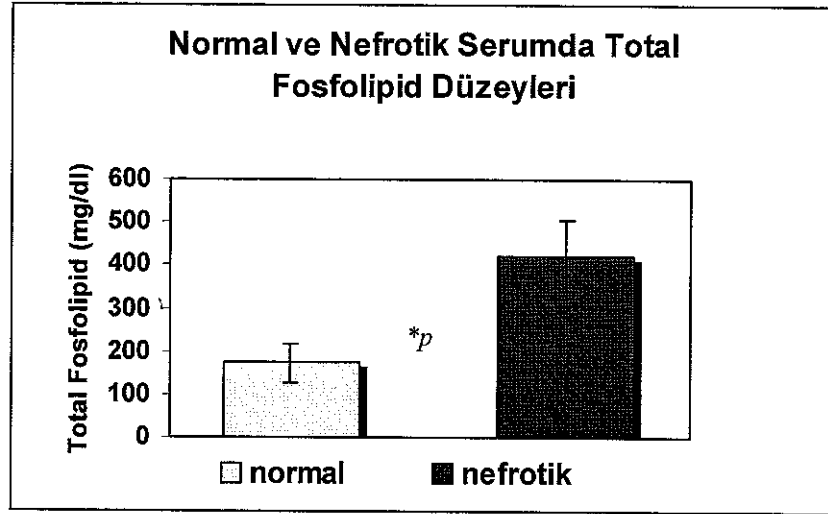


Şekil.23. 2-ME ün normal ve nefrotik serumda TG düzeyine etkisi.

Lipid düzeyindeki azalmalar normale göre değerlendirildi (* $p < 0.0001$ ve $^{\circ}p > 0.05$).



Şekil.24. Normal ve nefrotik bireylerin total fosfolipid değerleri dağılımı.



Şekil.25. Normal ve nefrotik bireylerin total fosfolipid değerleri.

Serumlardan E-DEE ile ekstrakte edilen fosfolipidler organik fosfora oksitlenerek Fiske-Subbarow yöntemiyle tespit edildi (normal seruma göre $*p < 0.0001$).

5. TARTIŞMA

NS biyokimyasal görünümü ile, başlıca yoğun albuminüri(> 3 g/gün), hipoalbuminemi, hiperlipoproteinemi, ve lipidüriden oluşan bir hastalıktır. Bu bulgular glomerüler bazal membran(GBM) geçirgenliğinin bozulmasından dolayı ortaya çıkıp herhangi bir belirli nedene bağlı olmayabilir. Bu türden N.S. primer (idiopatik) olup bu çalışmanın kapsamındadır. Ayrıca sistemik hastalıklara, eksojen faktörlere de bağlı N.S. olabilmektedir. Primer N.S. glomerülonefrit olmaksızın ya da glomerülonefritle birlikte görülebilmektedir. İdiopatik N.S un oluşumunu tetikleyen faktörler arasında D-penisillamin (Dimetil sistein) ve çeşitli non-steroid antiinflamatuvar grubundan ilaçlar bulunmaktadır. Ayrıca civa, altın gibi ağır metaller, allerjenler, malignan hastalıklar ve immunizasyon da bu tabloyu ortaya çıkarabilmektedir. Puromisin aminonükleozid (PAN) ve adriamisin (ADR) gibi protein sentezini bozan ve elektron transportunu etkileyen sitostatik maddeler deney hayvanlarında 7 gün gibi bir süre içinde N.S. oluşturduklarından literatürde deneysel N.S. örnekleri olarak bulunmaktadır. Bunları, hastalığın etyopatogenezini açıklığa kavuşturmak için kullanılmaktadır. Deneysel N.S. olgularında, hastalığın laboratuvar bulgularından olan albuminürinin, hipoalbuminemi ve hiperlipoproteinemi ile eş zamanlı olarak ortaya çıktığı görülmekte ve bu nedenle renal bozukluğun diğer serum bulgularının mutlak sorumlusu olmayabileceği izlenimi alınmaktadır. Bu durumda nefrotik sendromdan, ilk belirtisini GBM de veren sistemik bir hastalık olarak söz etmek gerekecektir. Ancak böyle bir olasılığı daha iyi vurgulayabilmek için bazı göstergelerin daha belirgin olarak konması gerekir. Örneğin, albuminüriye eşlik eden serum protein bozukluklarının sadece miktar değişimleri şeklinde olmadığını açıklığa kavuşturmak gerekir. Literatürde nefrotik serum albumin ve lipoproteinlerin yapılarının her zaman normal olmayabileceğini gösteren bulgular olduğu için bu konuya ağırlık verilmesi amaçlandı(1-7).

İnsan serum albumini (HSA) üre SDS gibi maddelerin kullanılmadığı non-denaturan koşullarda elektroforezle izlendiğinde AGE 'de, pH 8.7 de anodik uniform protein fraksiyonu olarak görülüp ve pI değeri 4.0-5.8 olarak

saptanır(10). pI değeri kullanılan koşullara göre değişmektedir. Bu bulgulara bakarak albuminin monomerik bir protein olduğu izlenimi alınır da gerçek daha farklı görünmektedir. Nitekim albumin genetik varyantlarının daha iyi izlenmesi amacıyla, 8 M üre kullanılan elektroforez koşullarında izoelektrik odaklama (IEF) ile incelendiğinde normal albuminin bile monomerik olmadığı 2 anodik 2 katodik alt biriminin olduğu gözlemlendi(12). Bu çalışmada albumin izoformları, anti-albumin antikoları ile görüntülendi. Albuminin primer yapısıyla uyumlu olan albumin A (ana form) ve albumin B (anaforma göre katyonik) varlığı gösterildi(33). Albuminin dimerik görüntüsü IgA ve α 1-antitripsin (ATT) ile kompleks yapmasıyla ilgili olup pI değerini de etkilemektedir. Nefrotik serum albumini MCD li hastalardan affinite kromatografi ile saflaştırıldı. Normal HSA'nın non-denaturan koşullardaki görüntüsünden farklı olarak homojen bir fraksiyon oluşturmadığı gözlemlendi. anti-albumin antikoları ve gümüş boyamaları ile pI 4.7 civarında dağılmış birden fazla sayıda protein bandının bulunduğu saptandı. Başka bir çalışmada ise, nefrotik serum albumininin başlıca anyonik izoformdan oluştuğu, idrarda atılanın daha katyonik izoformlar olduğu gösterildi(2). Bir diğer çalışmada, analbuminemik hastalarda BCG yöntemiyle albumin düzeyi 3-18 gr/L olarak bulunurken immunassay yada elektroforetik yöntemle düzey 0 gr/dL bulundu. Bu bulgu, analbuminemik serumda, yukarıda belirtilen çalışmadaki gibi, katodal migrasyon gösteren albumin izoformunun globulin fraksiyonları içinde kompleks yapmış olarak bulunabileceğini düşündürdü(39).

Normal serum albumininin denaturan koşullarda homojen monomerik görüntüsünün kaybolduğu, anodik katodik izoformlarının ortaya çıktığı katodik izoformların serum globulin fraksiyonlarıyla kompleks yaptığı gözlenirken, nefrotik serumlarda albuminin non-denaturan koşullarda bile homojen monomerik görüntüsünün bulunmayışı düşündürücü idi. Bu nedenle, nefrotik ve sağlıklı serum albumin fraksiyonlarının üre denaturasyonundan etkilenmelerinin ortak koşullarda eş zamanlı olarak incelenmesi düşünüldü.

Üre, albuminin hidrojen ve hidrofobik bağlarını etkileyerek albumin içine sokulan küçük boşluklarına girip kapalı ceplerini alt üst eden bir denaturandır (28). Normal ve nefrotik albumin arasında proteinin kuarterner yapısında olası

farkların ortaya çıkarılması için protein yapısını en az bozacak üre derişiminin bulunması hedeflendi. Üre çözeltilsinin hipoosmotik etkisini yok etmek için çözelti izotonik NaCl çözeltilsinde hazırlandı. 150 µL normal seruma 3-12 M aralığında izotonik üre çözeltileri ekleyip vortekslendikten sonra, bu çözeltiler arasından, serumu 24 saat inkubasyon sonrası jelleştirmeyecek karışım seçildi. Bu karışım da üre-protein oranının 4 mg üre/mg protein olmasının uygun olduğu gözlemlendi. Nefrotik serumların protein derişimidüşük olduğu için metotlarda belirtildiği gibi, uygun karışım oranı v/v olarak herbir nefrotik serum için hesaplandı. Sağlıklı(normal)-nefrotik(hasta) serum çiftlerine ürenin etkisi, kontrol(üresiz) ve test(ürel) örneklerden inkubasyon sonunda yapılan elektroforetik analizle gözlemlendi. Sağlıklı serumlarda test AGE kontrol AGE ye göre incelendiğinde albumin fraksiyonunda ortalama %50 kadar azalma görüldü. Kontrol AGE lerde A/G oranı, 1.62 ± 0.33 , test AGE lerde 0.36 ± 0.30 ve test(A/G) / kontrol (A/G) 0.24 ± 0.92 idi, (* $p < 0.0001$). Nefrotik serumların bulguları ise sağlıklılarınkinden çok farklı olup albumin fraksiyonunda azalma olmazken test (A/G), kontrol (A/G) ye göre önemli değişme göstermedi (tablo.12, şekil.15.b). Bu durumda (test A/G)/(kontrol A/G) yaklaşık 1 idi. Sonuçlar, normal serum albumin fraksiyonunun birtakım katyonik izoformlar içerdiği bu izoformun doğalken hidrojen ya da hidrofob etkileşimlerle anyonik fraksiyona bağlı olup üre denaturasyonu sonunda ana yapıdan ayrıldığını gösterdi. Nefrotik serum albumin fraksiyonuna bakıldığında bundan birtakım katyonik izoform ayrılışı olmadığı görüldü. Bu durumda iki seçenek olabilirdi. Ya nefrotik albumin fraksiyonu katyonik izoform içermez, ya da kullanılan denaturasyon koşullarında ayırlamayacak bir bütünlüğe sahiptir. Her iki durumda da nefrotik albumin normal yapıda değil demektir. Literatürde MCD den saflaştırılmış nefrotik serum albumininin daha çok anyonik albumin izoformundan oluşurken, idrarda katyonik izoformlar bulunduğu gösterildi(1). Ayrıca nefrotik serumlarda artmış olan Lp(a) nın apoprotein kısmında albumin bulunduğu gözlemlendi(64). Bu durumda nefrotik albuminin katyonik izoformları ya globulin fraksiyonlarına bağlı olarak serumda ya da albuminüri şeklinde idrarda bulunmaktadır.

Şekil.15.a ve tablo.16, 18 de de görüldüğü gibi, üre denaturasyonu etkisiyle serumun BCG bağlama yöntemine göre albumin düzeyi, elektroforetik albumin

düzeyi ile benzer değişim göstermedi. Elektroforetik albumin düzeyi azalırken BCG albumin düzeyi aynı kaldı. Bu da anyonik BCG yi bağlayan katyonik izoformların globuler fraksiyonlara özellikle α_1 ve α_2 globulin fraksiyonlarına göç edişiyile uyum gösterdi (tablo.13 ve şekil.18). Analbuminemide BCG ile saptanan serum albumin düzeylerinin elektroforetik ve immünassay albumin miktarlarıyla uyum göstermemesi, hastalıkta, katyonik albumin izoformlarının globulin fraksiyonları içinde saklı olabileceğini vurguladı (39).

N.S da, yoğun albuminüriye bağlı olarak ortaya çıkan hipoalbuminemi, albumin sentezini arttırdığı gibi (9,13) lipoproteinlerin sentezini de uyardığı bilinir (68). N. S da sentezi uyarılan başlıca lipoprotein VLDL olup hipertrigliseridemi ve hiperkolesteroleminin başlıca nedeni olması doğal görülür. Nefrotik hastalarda ve deneysel N.S. da hepatik VLDL, HDL₂ ve HDL₃ ün yapımlarının arttığı, HDL₃ ün idrara atılması nedeniyle, serumda azaldığı da rapor edilmiştir. Ayrıca, bu lipoproteinlerin lipid ve apoproteinlerinin hepatik sentezlerini araştırıp bu sentezlerin arttığını gösteren çalışmalar da vardır (69).

Literatürün daha yoğun araştırılmasından anlaşıldığına göre , N.S. da lipoprotein artışı hipoalbuminemiye bağlı olarak sadece kompensatuar olmayıp lipoproteinlerin yapısal ve metabolik bozukluklarını da kapsamaktadır. Diyetle lipid alımının arttırılışı normal deneklerde karaciğer lipid düzeylerini arttırırken N.S. da karaciğerde , serumdaki hiperlipidemiye rağmen, lipid düzeyleri düşük bulunmuştur (50). Daunomisinle oluşturulan deneysel N.S da VLDL, LDL ve HDL nin trigliserit, kolesterol, fosfolipid içeriğinin arttığı gözlendi (50). VLDL ve LDL nin yapısal ve metabolik bozukluğu ile ilişkili olarak VLDL ve LDL nin ve ApoB-100 ün katobolik hızları azalmış olarak bulundu (3,42). Nefrotiklerde VLDL nin ApoC-II içeriği az bulundu (70). HDL nin yapısal bozukluğu ile ilişkili olarak; nefrotik çocuklarda ve erişkinlerde serum HDL düzeyi normal olmasına karşın Apo A-I düzeyi (71) ve HDL fosfolipidleri artmış olarak bulundu (56). Bir başka çalışmada da HDL katobolizması yavaşlamış olarak bulundu.

Bu çalışmada nefrotik serum lipoproteinlerinin olası yapısal bozukluklarını ortaya çıkarabilmek için, literatürdeki bazı çalışmalardan esinlenerek(72,74), protein

disülfit bağlarını indirgeyen bir denatüran olan 2-ME denendi. Nefrotik apolipoproteinlerin bozukluğu, lipoproteinler saflaştırmadan yapılacağı için, albumin dahil çoğu plazma proteinlerinde S-S bağları olduğu düşünülerek ayırt edici parametre olarak serum lipidleri seçildi. Disülfid bağlarından kaynaklanan primer yapı farklılığını gözleyebilmek için bir örnek hasta-sağlam çifti üzerinde çalışıldı. Çeşitli 2-ME derişimleri ile serum protein karışımları denenerek serumu jelleştirmeden hem disülfid bağlarının lipidleri düzenlemedeki belirleyiciliğini ve hem de nefrotik sağlıklı farkını gösterebilecek derişim ve karışımlar seçildi. 2-ME çözeltilerinin hipoosmotik etkisini yoketmek için çözeltiler izotonik NaCl içinde hazırlandı. Nefrotik serumların protein derişimi düşük olduğu için, metodlarda belirtildiği gibi, uygun karışım oranı v/v olarak herbir nefrotik serum için hesaplanarak 2-ME miktarı düşürüldü. Normal(sağlıklı)-nefrotik(hasta) serum çiftlerine 2-ME çözeltilerinin etkisi, kontrol(2-ME süz) ve test (2-ME lü) örneklerden yapılan trigliserid ve total kolesterol analizleri ile gözlendi(tablo.14, 15).Normal-nefrotik çiftlerinin %6.0 2-ME derişimindeki test örneklerinde TG ve T. Kol değerleri kontrollerine göre incelendiğinde lipidlerin % 100 e varan düzeylerde düştüğü görüldü (Şekil.20-23). % 0.6 ve % 0.7 2-ME derişiminin kullanıldığı deneylerde test örneklerinin lipid düzeyleri kontrollerine göre incelendiğinde lipidlerin istatistiksel olarak anlamlı düştüğü gözlendiği gibi sağlıklı-nefrotik arasında da anlamlı fark olduğu gözlendi (Şekil.20-23). Sonuçlar, % 6.0 2-ME derişiminin etkileri izlendiği durumda, sağlıklı ve nefrotik lipoprotein lipidlerinin, apoproteindeki disülfid bağlarının indirgenmesiyle hemen tamamen gizli konuma geçebileceğini gösterdi. % 0.6 ve %0.7 2-ME derişimlerinin izlendiği durumda ise, nefrotik lipoprotein lipidlerinin daha az gizlenebildiği ve bu nedenle nefrotik serum apolipoproteinlerinde disülfit bağı yerleşimi ve/veya sayısının normalden farklı olması gerektiği anlaşıldı.

Bulgular, bu çalışmada 2-ME kullanımına yön veren iki literatür bulgusu ile de uyum içinde bulundu. Bunlardan biri, disülfit bağlarını indirgeyen 2-ME nin VLDL nin karaciğerden salgılanmasını önlemesi(72) diğeri ise apolipoprotein B100 ün amino-terminalinde %11 lik kısımda yerleşik olan 6 intramoleküler disülfid bağının lipoprotein oluşumunu belirleyici nitelikte olması idi (73,74). 2-ME ile denaturasyondan sonra serumlarda nötral lipidlerinin konum değiştirerek

gizlenebilmesi belirtilen çalışmalarla açıklanabildi. Bunun yanında nefrotik lipoproteinlerin 2-ME denaturasyonuna normallerden farklı yanıt vermesi apoprotein B-100 de apolipoproteinlerde disülfid bağ defekti olabileceğini vurguladı. Ayrıca, idiopatik nefrotik sendrom oluşumunun penisilamin (dimetil sistein) ve ağır metaller gibi tiyol/disülfid oluşumunda karışıklık yaratabilecek maddelerle tetiklenmesi bu düşünceyi güçlendirdi.

Serum fosfolipidlerinin analizindeki amaç daha çok yapısal niteliği olan bu lipid sınıfının nefrotik sendromda artışını gözleyerek plazma lipoproteinlerinin olası yapısal bozukluğuna ağırlık kazandırmaktır. Fosfolipid analizi 2-ME ile denature edilmiş örneklerle uygulanmadı. Çünkü fosfolipid analizi TG ve total kolesterol analizlerinden farklı olarak enzimatik yöntemle yapılmamaktadır. Lipidin ekstre edilmesi aşamasında lipoproteinde lipid-protein düzeni tamamen alt-üst olacağı için diğer lipidlerle başarılı gözlemler fosfolipidlerle başarılamayacaktır.

İdiopatik nefrotik sendromlu 30 hasta ile yaş ve cins uyumlu sağlam kişilerin katılımı ile yapılan bu çalışma, üre denaturasyonu aracılığı ile nefrotik kişilerin serum albumininin katyonik izoformunu içermeyen defektif bir yapısı olduğunu, 2-ME denaturasyonu aracılığı ile serum apolipoprotein B-100 de disülfid bağ yerleşimi ve/veya sayısının normalden farklı olduğunu gösterdi. Böylece, albumin ve serum lipoproteinlerinin yapısal bozukluğunu gösteren literatür bulgularına bir yenisini kazandırdı.

6. ÖZET

İdiopatik nefrotik sendromlu 30 hasta yaş ve cins uyumlu olan 30 sağlıklı kişi ile karşılaştırılarak üre ve 2-merkaptolanol denaturasyonu yardımıyla serum albumin ve serum lipoproteinlerinin yapısal bozukluğu gösterilmeye çalışıldı. 4 mg üre/mg protein derişimi kullanılarak hasta ve sağlıklı serumlar 30 *C da 24 saat denatüre edildi. Sağlıklı serum albumin fraksiyonunun ortalama ½ si katyonik izoform olarak ayrılıp α_1 ve α_2 globulin fraksiyonlarına göç ederken bu gözlem nefrotik albumin fraksiyonunda belirgin değildi. Sağlıklı-nefrotik serum çiftlerinin denatüre edilmiş test örnekleri denature edilmemiş kontrol örnekleriyle albumin/globulin oranları yönünden kıyaslandı. Sağlıklılarda 0.24±0.92 ve nefrotiklerde 0.79±0.40 olarak bulunan test(A/G)/kontrol(A/G) oranları karşılaştırıldı ve anlamlı fark bulundu(p<0.0001). Serumların tümünde üre denaturasyonundan sonra BCG ile saptanan albumin değerlerinde kontrol örneklerine göre önemli fark gözlenmedi. Bu bulgu, elektroforetik değerlendirmeler eşliğinde, katyonik albuminin BCG nin bağlanmasından sorumlu olduğu sadece normal albumin bandında yerleşik olmayıp globulin fraksiyonlarında da bulunabileceğini kanıtladı. % 6.0, % 0.6 ve % 0.7 derişimlerinde 2-ME ile denatüre edilen serumlarda apolipoproteinlerin değışimi serum total kolesterol ve trigliserit düzeyleri ile izlendi. %6.0 2-ME derişimde % 100 e varan lipid azalmaları ile nefrotik ve normal kişiler ayırt edilemezken diğer iki derişimde trigliseritler sağlıklılarda % 88.55±5.41 ve % 93.74±4.47 nefrotiklerde % 53.60±11.76 ve % 75.97±8.09 azalırken, kolesterol sağlıklılarda % 59.94±5.60 ve % 75.36±4.44 nefrotiklerde % 28.74±8.22 ve % 51.00±8.85 azaldı (p<0.0001). Serum total fosfolipid düzeyleri sağlıklılarda 173.77±46.72 mg/dL ve nefrotiklerde 421.40±83.42 mg/dL bulundu. Nefrotik serum albumin ve apolipoprotein B nin yapısal bozuklukları protein denaturasyonu ile gözlemlenir şekilde sokularak nefrotik sendromun sadece glomerüler membran bozukluğuna bağlı olmadığı görüşüne ağırlık kazandırıldı.

7. ABSTRACT

The structural defects of serum albumin and serum lipoproteins were tried to be shown on 30 patients with idiopathic nephrotic syndrome and 30 healthy individuals adjusted for age and gender by using the denaturation of urea and 2-mercaptoethanol. The sera of healthy people and patients were denaturated at 30 °C for 24 hours by using 4 mg urea/mg protein. Approximately ½ of healthy serum albumin fraction separated as cationic isoform and migrated to α_1 and α_2 fractions but this was not evident for nephrotic albumin fraction. The denaturated test samples of healthy-nephrotic serum pairs were compared with control samples that were not denaturated as albumin/globulin ratios. The ratios of test (A/G) / control (A/G) which were found as 0.24 ± 0.92 for healthy group and for 0.79 ± 0.40 nephrotic patients were compared and a significant difference was found ($p < 0.0001$). The albumin values of serum samples obtained by BCG after urea denaturation were not significantly different from the control samples. By the evaluation of electrophoresis this finding proved that cationic albumin was responsible for binding of BCG and was placed not only on albumin band but also would place on globulin bands. The changes of apolipoproteins were observed on serum samples that were denaturated with % 6.0, % 0.7 and % 0.6 concentrations of 2-ME using serum levels of total cholesterol and triglyceride. The healthy and nephrotic individuals could not be distinguished by % 6.0 concentration of 2-ME at nearly % 100 percent lipid decreases. By the other two concentrations of 2-ME; the triglyceride levels decreased by % 88.55 ± 5.41 and % 93.74 ± 4.47 for healthy individuals and by % 53.60 ± 11.76 and % 75.97 ± 8.09 for nephrotic patients. The cholesterol levels decreased by % 59.94 ± 5.60 and % 75.36 ± 4.44 for healthy individuals and by % 28.74 ± 8.22 and % 51.00 ± 8.85 for nephrotic patients ($p < 0.0001$). The serum phospholipid levels were found to be 173.77 ± 46.72 mg/dL and 421.40 ± 83.42 mg/dL for healthy and nephrotic individuals, respectively. The structural defects of nephrotic serum albumin and apolipoprotein B were observed by protein denaturation and the idea suggesting that the nephrotic syndrome is not only due to the defective glomerular membrane was supported.

8. KAYNAKLAR

1. Ghiggeri G. M., Candiano G., Ginevri F., Gusmana R. Renal selectivity properties towards endogenous albumin in minimal change nephropathy. *Kidney Int.*, 32;69-77, 1987.
2. Ghiggeri G. M., Candiano G., Ginevri F., Oleggini R. Characterization of cationic albumin in minimal change nephropathy. *Kidney Int.*, 32;547-553, 1987.
3. Furukawa S., Hirano T., Mamo J.C., Nagano S. Catabolic defect of triglyceride is associated with abnormal VLDL in experimental nephrosis. *Metabolism* 39; 101-107, 1990.
4. Vega G. L., Toto D., Grundy S. M. Metabolism of LDL in nephrotic dislipidemia. *Kidney Int.* 47;579-586, 1995.
5. Vazirini N.D., Ziang K.H. Down regulation of hepatic LDL receptor expression in experimental nephrosis. *Kidney Int.* 50;887-93, 1996.
6. Bertani T., Paggi A., Ozzani R., Delaini F. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events. *Lab Invest.* 46;16-23, 1982.
7. Marutaka M., Iwakaki H., Suguri T., Tanaka N. Alteration of membran fluidity in K562 cells exposed to the anticancer drug adriamycin. *Res. Com. Mol. Pathol. Pharmacol.* 85;163-170, 1994.
8. Bricio T., Molina A., Mampaso F. Effect of antiinterleukin-1 administration to induced nephrosis. *APMIS* 100;401-407, 1992.
9. Tietz Norbert W. Textbook of clinical chemistry. W.B. Saunders Company. 1999.
10. Silverman L.H., Chistenson RH. Amino acids and proteins. In: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry, 4 th Ed., edited by Burtis CA, Ashwood ER, Philadelphia London Toronto Montreal Sydney Tokyo, WB Saunders, 257-282,1996.
11. Kshirsagor B., Wilson B., Wiggins R.C. Polymeric complexes and fragments of albumin in normal human serum plasma. *Clin. Chim. Acta.* 143;265-73, 1984.
12. Rochu D., Crespeau H., Fine JM. Characterization of genetic variants of human albumin by isoelectric focusing. *Rev. Fr. Transfus Hemobiol* 34:35-47, 1991

13. Dason A.M., Cameron J.S., Grünfeld J.P., Kerr E. Oxford Textbook of Clinical Nephrology, Volume.1-3. Oxford Medical Publication.1997.
14. Behrman, Kleigman, Jenson. Nelson Textbook of Pediatrics. 16th ed.1996.
15. Sanvel V., Pandya M., Bheskaran M. Puromycin aminonucleoside induced glomerular epithelial cell apoptosis. *Exp. Mol. Pathol.* 70;54-64, 2001.
16. Peces R., Riera R.J., Larrea C. Steroid-responsive relapsing nephrotic syndrome associated with early diabetic glomerulopathy in a child. *Nephron.* 46:78-82 1987.
17. Dornan T.L., Jenkins S., Cotton R.E., Tattarsell R.B. The nephrotic syndrome at presentation of insulin-dependent diabetes mellitus; cause or coincidence? *Diabet Med.* 5:387-90, 1988.
18. Heslan J.M., Lautie J.P., Intrator L., Barc C. Impaired Ig G synthesis in patients with the nephrotic syndrome. *Clin. Nephrol.* 18;144-7, 1985.
19. Ooi B.S., Ooi Y.M., Hurtebise P.E. Diminished synthesis of Ig by peripheral lymphocytes of patients with idiopathic glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* 65;789-97, 1980.
20. Beaman M., Oldfield S., MacLennan I.C.M. Hypogammaglobulinemia in nephrotic rats is attributable to hypercatabolism of Ig G. *Clin. Exp. Immunol.* 74;425-30, 1988.
21. Autio-Hermanien H., Kartune T., Risteli L., Risteli J., Rapola J. Accumulation laminin and type 4 collagen in the kidney in congenital nephrosis. *Kidney. Int.* 27:662-6, 1985.
22. Cooperstone B.G., Friedman A., Kaplan B.S. Galloway-Mowats syndrome of abnormal gyral patterns and glomerulopathy. *Am. J. Med. Genetic;* 47,250-4, 1993.
23. Harkerston I.D.K. The National Medical Series for Independent Study. *Biochemistry* 2th ed., pp:127-46, 1994.
24. Kamoun P.P. Denaturation of globular proteins by urea; breakdown of hydrogen or hydrofobic bonds?. *Trends Biochem Sci.* 13;424-425, 1985.
25. Murrey R.K, Granner D.K, Mayes P.A, Rodweel V.W. Harper's Biochemistry. Twenty-fourth ed. Appleton, Lange, Stamford, Connecticut, 1998.
26. Mamp R.M. Biyokimya lisansüstü yaz okulu. Protein saflaştırılması ve karakterizasyonu (bölüm 17). Technische Fachhoch Schule Berlin, Studien Biotechnologie, 1987.

27. Scheraga H. Protein Structure. In: "Molecular Biology Vol. I" (Ed. Kaplan, N. O. And Scheraga, H. A.), Academic Press, New York. 1961.
28. Creighton T.E. Proteins: Structures and Molecular Properties. 2nd Edition. W. H. Freeman and Company, New York. 1993.
29. Sjöholm I., Ljungstedt I. Studies on the tryptophan and drug-binding properties of human serum albumin fragments by affinity chromatography and circular dichroism measurements. *J. Biol. Chem.* 248; 8434-8441, 1973.
30. Carter D. C., He X.M., Munson S.H., Twigg P.D., Gernert K.M., Broom M.B., Miller T.Y. Three-dimensional structure of human serum albumin. *Science* 244; 1195-1198, 1989.
31. Peters, T., 1999. Serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 37; 161-245, 1985.
32. Khen M.Y. Direct evidence for the involvement of domain III in the N-F transition of bovine serum albumin. *Biochem. J.* 236;307-310, 1986.
33. Geisow M.J., Beaven G.H. Physical and binding properties of large fragments of human serum albumin. *Biochem. J.* 163; 477-484, 1977.
34. Mogielnicki R.P., Waldman T.A., Straber W. J. Renal handling of low m.w proteins. *J. Clin. Invest.* 50; 901-909, 1971.
35. Rathschild M.A., Oratz M., Schreiber S.S. Albumin synthesis. *Int. Rev. Physiol.* 21;249-74, 1980.
36. Kalle E. Bennhold's analbuminemia: A follow-up study of the first two cases. *J. Lab. Clin. Med.* ;127:470-480, 1995.
37. Barbaree J.M., Decler W.J. Studies on a fast-migrating bisalbumin. *Biochem. Med* 5;181-187, 1971.
38. Lalloz M.R., Byfield P.G., Himsworth R.L. A new and distinctive albumin variant with increased affinities for both triiodothyronines and causing hyperthyroxinaemia. *Clin Endocrinol.* 22:521-9, 1985.
39. Lyon A.W. Influence of methodology on the detection and diagnosis of congenital analbuminemia. *Clin. Chem.* 44:2365-7, 1998.
40. Amico G. Lipid change in the nephrotic syndrome: new insights into pathomechanism and treatment. *Klinische Wochenschrift.* 69:618-22, 1991.
41. Kaysen G.A. Hyperlipidemia of the nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 39:8-15, 1991.

42. Van der Velden M.G., Reijngoud D.J., Kaysen G.A., Gadella M.M. Increased VLDL in nephrotic patient result from a decreased catabolism while increased LDL results from increased synthesis. *Kidney Int.* 53;994-1001, 1998.
43. Gomikawa S, Inagaki O, Mori H, Inoue S, Takamitsu Y, Fujita Y. Lipid metabolism in daunomycin-induced nephrotic rats. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 35(3):239-46, 1993.
44. Warnick G.L., Pachard C.J. Lipoprotein metabolism in the nephrotic syndrome. *Nephrology Dial. Trans.* 8;385-96, 1993.
45. Milton S. Effects of experimentally induced nephrosis on protein synthesis in rat liver. *Nephrology* 38:254-9, 1993.
46. İç hastalıkları. Editör Prof. Dr. Aydoğan Öbek, 1987.
47. Kaysen G.A., Gambertoglio J., Felts J. Albumin synthesis, albuminuria and hiperlipiemia in nephrotic patients. *Biocem.J.* 217:213-19, 1991.
48. Mougeais C., Braschi S., Ouguerram K., Maugeais P. Lipoprotein kinetics in patient with analbuminemia. Evidence for the role of serum in controlling lipoprotein metabolism. *Artrioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 17;1369-75, 1997.
49. Al-Shurbaji A., Humble E., Rudling M., Lindesthal B. Hepatic cholesterol metabolism in experimental nephrotic syndrome. *Lipids.* 33:165-9, 1998.
50. Morisaki N., Matsuoka N., Satio Y. Lipid metabolism in nephrotic rats induced by daunomycin injection. *Metabolism.* 33;405-10, 1984.
51. Wheeler D.C. Hiperlipidemia in nephrotic syndrome. *Am. J. Nephrol.* 9;78-84, 1991.
52. Strapnans I., Garon S.J. Characterization of glycosaminoglikan in urine from patients with nephrotic syndrome and control subjects and their effects on LPL. *Biochim. Biophys. Acta* 678; 414-22, 1981.
53. Joles J.A., Willekes N., Scheek L.M. Lipoprotein phospholipid composition and LCAT activity in nephrotic and analbuminemic rats. *Kidney Int.* 46; 97-104, 1994.
54. Vuong T.D., Stroes E.S., Rabelink T.J. Hypoalbuminemia increases lysophosphatidylcholine in low-density lipoprotein of normocholesterolemic subjects. *Kidney Int.* 55;1005-10, 1999.
55. Sestak T.L., Alavi N., Subbala P.V. Plasma lipids and acyltransferase activities in experimental nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 36; 240-8, 1989.

56. Cohen S.L., Caramps D.G., Lewis A.D. The mechanism of low albumin and LCAT reaction. *Clin. Chim. Acta.* 104;393-400, 1980.
57. Kashyap H.L., Ooi B., Gluek C.J. Sequestration and excretion of HDL by kidney in human nephrotic syndrome. *Artery* 6;108-21, 1979.
58. Marsh J.B. Lipoprotein metabolism in experimental nephrosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 23;178-86, 1996.
59. Joven J., Villabano C., Vilella E. Abnormalities of lipoprotein metabolism in patient with the nephrotic syndrome. *N. Eng. J. Med.* 323; 579-84, 1990.
60. Joven J., Rubies-Prat J., Espinel E., Ras M.R. High density lipoproteins in untreated nephrotic syndrome without renal failure. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2;149-53, 1987.
61. Gherardi E., Rota E., Calandra S., Genova R., Tamborino A. Relationship among the concentrations of serum lipoproteins and changes in their chemical composition in patients with untreated nephrotic syndrome. *Eur. J. Clin. Invest.* 7;563-70, 1977.
62. Oetliker O.H., Mordasini R., Lutschig L. Lipoprotein metabolism in nephrotic syndrome of childhood. *Pediatric Res.* 14; 64-6, 1980.
63. Kaysen G.A. Hiperlipiemia of the nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 39;8-15, 1991.
64. Bachorik P.S., Levy R.I., Rifkind B.M. Lipids and dislipoproteinemia. In: *Clinical Diagnosis Management by Laboratory Methods*, 18th Ed., edited by Henry J.B. WB Saunders Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo, 188-192, 1991.
65. Short C.D., Durrings P.N., Mallick N.P., Bhatnager D. Serum lipoprotein (a) in men with proteinuria due to idiopathic membranous nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 7;109-13, 1992.
66. Sonnenwirth A.C., Jaret L. *Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis.* Vol-1, chapter 14. Part II Clinical Chemistry, Lipids and Lipoproteins. 288-291 8th ed., 1980.
67. Bartlett G.R. Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol-Chem.* 234;466-8, 1959.
68. Breier C., Lisch H.J., Drexel H., Braunsteiner H. Lipoproteins, apolipoproteins, LL, hepatic triglycerid lipase and LCAT in patients with nephrotic syndrome. *Schweiz Med. Wochenschr.* 113;909-13, 1983.

69. Gomikawa S., Suzuki K., Takamitu Y. High density lipoprotein catabolism in primary cultured hepatocytes from daunomycin-induced nephrotic rats. *Am.J. Nephrol.*:19(6):702-8, 1999.
70. Kashyap M.L., Srivastava L.S., Hynd B.A., Brandy D., Perisutti G., Glueck C.J., Gartside P.S. Apolipoprotein C-II and lipoprotein lipase in human nephrotic syndrome. *Atheroscl.* 35:29-40, 1980.
71. Kaysen G.A., Hoye E., Jones H.Jr. Apolipoprotein A-I levels are increased in part as a consequence of reduced catabolism in nephrotic rats. *Am J. Physiol.* 268(3pt 2):F532-40, 1995.
72. Bauche F., Sabourault D., Giudicelli Y., Nordmann J., Nordmann R. Loss of the lipoprotein lipase activating ability of rat serum after administration of some fatty liver induced drugs. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 86:363-75, 1978.
73. Shelness G.S., Thornburg J.T. Role of intra molecular disulfide bond formation in the assembly and secretion of apolipoprotein B-100 containing lipoproteins. *J. Lipid. Res.* 37:408-19, 1996.
74. Ingram M.F., Shelness G.S. Folding of the amino-terminal domain of apolipoprotein B initiates microsomal triglyceride transfer protein-dependent lipid transfer to nascent very low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 272:10279-86, 1997.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ KÜTÜPHANESİ