

Paraoksonazın Biyolojik Varyasyonu ve HDL-Kolesterol İle İlişkisi

Biological Variation of Paraoxonase and Its Relation with HDL-Cholesterol

Pınar Tuncel

Murat Örmen

Ali Rıza Şişman

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir,

ÖZET

Amaç: HDL anti-aterojenik bir partiküldür ve bu etkisini ters kolesterol taşınımı ve yapısında bulunan paraoksonaz (PON1) ve platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz enzimleri aracılığı ile gösterir. Biyolojik varyasyon verileri ile bir yöntemin analitik kalite hedefleri, referans değerlerinin kullanımın uygun olup olmayacağı ve ardışık sonuçlardaki değişikliklerin klinik olarak anlamlı olup olmadığı bilgileri elde edilebilir. Bu bilgiler ışığında bu çalışmada paraoksonazın ve HDL-kolesterolün biyolojik varyasyonunun saptanması, HDL-K biyolojik varyasyonunun paraoksonazın biyolojik varyasyonu üzerine etkisinin olup olmadığının araştırılması ve elde edilen biyolojik varyasyon verilerinden yola çıkarak yöntemlerin kalite gerekliliklerinin belirlenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Toplam 17 sağlıklı kişiden 0, 1, 2, 7, 14, 21 ve 28. günlerde venöz kan alındı. Analizler sonrasında nested ANOVA analizleri ile birey-içi, bireyler-arası biyolojik varyasyon, bireysellik indeksi ve kalite gereklilikleri saptandı.

Bulgular: Paraoksonazın birey-içi ve bireyler-arası varyasyonu sırası ile %11.45 ve %70.83 olarak bulundu. HDL-K için aynı parametreler %6.24 ve %28.73 olarak saptandı. Her iki parametre için de bireysellik indeksi <0.6 olarak hesaplandı. Paraoksonaz için kalite gereklilikleri- kesinlikten sapma %5.73, doğruluktan sapma %17.71 ve toplam kabul edilebilir hata %27.16 olarak bulundu.

Sonuç: Paraoksonazın bireyler-arası varyasyonu yüksektir ve temel nedeni genetik faktörlerdir. Ancak lipid metabolizması ile ilgili etkenler, sigara kullanımı, yaş ve diyet de farklılıkta etkindir. HDL-K'ün gerek birey-içi gerekse de bireyler-arası varyasyonu paraoksonaza göre düşük olduğundan PON varyasyonunda temel belirleyici faktör değildir. Her iki parametre için de bireysellik indeksi <0.6'dır ve bu nedenle test sonuçlarının referans değerler yerine kişinin kendi sonuçlarına göre değerlendirilmesi daha uygundur.

Anahtar Sözcükler: Paraoksonaz, biyolojik varyasyon, bireysellik indeksi, kalite gereklilikleri

ABSTRACT

Objective: HDL is considered as anti-atherogenic and it exerts this effect with reverse cholesterol transport and with the contribution of enzymes such as paraoxonase and platelet activating factor acetylhydrolase. Data on biological variation can be used to determine the quality specifications of a method, the utility of the reference values for the method and the magnitude of change that is significant and related to disease. In the light of this information, the aim of the study was to

determine the biological variations of paraoxonase and HDL-cholesterol, the influence of biological variation of HDL-C on paraoxonase and with the obtained data to determine the quality specifications of the methods.

Materials and Methods: Blood was obtained from 17 subjects on days 0, 1, 2, 7, 14, 21 and 28. After all the analyses were completed intra-individual and inter-individual biological variations, index of individuality and quality specifications were computed.

Results: Intra-individual, inter-individual biological variations for paraoxonase and HDL-C were 11.45%, 70.83% and 6.24%, 28.73%, respectively. For both of the analytes the index of individuality was <0.6. Quality specifications for paraoxonase were as follows: imprecision < 5.73%, bias <17.71% and total allowable error <27.16%.

Conclusion: Inter-individual biological variation of paraoxonase was high and the genetic factors are the main determinants of this variation. Meanwhile parameters of lipid metabolism, smoking, aging and diet also contribute to this variation. Since biological variation of HDL-C was relatively low, its effect on biological variation of paraoxonase was limited. Due to low index of individuality it seems more relevant to interpret the results of both parameters according to the previous results of the individual instead of the population based reference values.

Key Words: Paraoxonase, biological variation, index of individuality, quality specifications

GİRİŞ

Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) anti-trombotik, anti-inflamatuvar, anti-aterojenik etki gösteren bir partiküldür. Anti-aterojenik etkisini ters kolesterol taşınımı ve yapısında bulunan paraoksonaz (PON1) ve platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz enzimleri aracılığı ile gösterir (1).

PON1 (arildialkilfosfataz (EC 3.1.8.1)), karaciğerde sentezlenen, molekül ağırlığı 43-45 kDalton olan bir moleküldür. 354 amino asitten meydana gelir ve glikoprotein yapıdadır. İlk olarak organik fosfor bileşiklerini detoksifiye edici etkisi ortaya çıkarılmış (2), daha sonra insan vücudunda HDL'in yapısında taşındığı ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) yapısında bulunan fosfolipidlerdeki okside yağ asitlerini hidrolize ederek anti-aterojenik etki gösterdiği ortaya konmuştur (3,4,5). Ayrıca, HDL'nin yapısında bulunan fosfolipidlerin oksidasyonuna da engel olarak HDL üzerine de koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (6).

Bir testin sonuçlarının doğru olarak yorumlanabilmesinde önemli faktörlerden birisi de biyolojik varyasyondur. Biyolojik varyasyon analizlerde meydana gelebilecek total varyasyonun bir komponentidir. Birey-içi (BV_I) ve bireyler-arası (BV_G) olarak ele alınır ve var-

yasyon katsayısı ile ifade edilir (CV_I, CV_G). Biyolojik varyasyon verilerinden bir yöntemin analitik kalite hedefleri, referans değerlerinin kullanımının uygun olup olmayacağı ve ardışık sonuçlardaki değişikliklerin klinik olarak anlamlı olup olmadığı öğrenilebilir (7).

Bu çalışmada PON1'un ve HDL-kolesterolün biyolojik varyasyonunun saptanması, HDL-K biyolojik varyasyonunun PON1 biyolojik varyasyonu üzerine etkisinin olup olmadığını araştırılması ve elde edilen biyolojik varyasyon verilerinden yola çıkarak yöntemlerin kalite gerekliliklerinin belirlenmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya 9'u kadın, 8'i erkek toplam 17 sağlıklı laboratuvar çalışanı gönüllü olarak katıldı. Yaşları 27-50 arasında idi ve herhangi bir kronik hastalıkları ve düzenli kullandıkları bir ilaç yoktu. Gönüllülere, Dünya Hekimler Birliği Helsinki Bildirgesi'ne uygun olarak çalışma ile ilgili bilgi verildi ve yazılı onamları alındı.

Gönüllülerden 0, 1, 2, 7, 14, 21 ve 28. günlerde venöz kan alındı. Preanalitik evre ile ilgili değişimleri ortadan kaldırabilmek için özen gösterildi. Kanlar, 10-12 saat açlık sonrası sabah saat 08-09 arasında, kişiler 10 dakika oturup dinlendikten sonra alındı.

Tüm kanlar aynı kişi tarafından ve aynı lot numaralı düz tüplere (Becton Dickinson, ABD) alındı. Kanlar alındıktan sonra 1 saat içinde 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve alikotlanarak -70°C'de saklandı. Gönüllülerden son örnek alındıktan sonra tüm serumlar aynı çalışma içinde rastlantısal olarak yerleştirilerek çift olarak çalışıldı. PON1, Hitachi DP Modular Systems (Roche Diagnostics) analizöründe Juretic ve ark.nın yöntemi ile (8), HDL-K ise aynı analizörde firmaya ait kendi kitleri ile çalışıldı.

Biyolojik varyasyon ile ilgili bulgular varyasyon katsayısı (CV) ile ifade edildi ve hesaplamalarda $CV = \text{Standart sapma (SD)}/\text{ortalama} \times 100$ formülü kullanıldı. Birey-içi ve bireyler-arası sonuçlar içinde uç değer olup olmadığı Cochran ve Reed testleri uygulanarak araştırıldı. Tüm işlemler için Excel (Microsoft) kullanıldı. İşlemler hem tüm grup için hem de kadınlar ve erkekler için ayrı ayrı gerçekleştirildi. İstatistiksel değerlendirme SPSS 11.0 kullanılarak ANOVA testi ile yapıldı.

Analitik varyasyon (CV_A) hesaplamaları için çift çalışılan örneklerin sonuçları arasındaki varyans kullanıldı. Örnek çiftleri arasındaki farkın karesi alınarak 2'ye bölündü ve tümü toplanarak ortalaması alındı. Karekökü alınarak SD hesaplandı. Formüldeki ortalama için tüm sonuçların genel ortalaması kullanıldı (7).

Birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I) için kişilerin kendi sonuçları arasındaki varyans hesaplandı. Bunun için örnek çiftlerinin sonuçlarının ortalaması alındı. Bir kişiye ait sonuçlar arasındaki varyans saptandı. Karekökü aynı kişiye ait ortalama aktivite/konsantrasyona bölünerek CV_{TI} (birey-içi total varyans) hesaplandı. CV_{TI} , CV_A 'yı da içerdiği için aşağıdaki formül kullanılarak CV_I hesaplandı:

$$CV_I = (CV_{TI}^2 - CV_A^2)^{1/2}$$

Bireyler-arası varyasyon için tüm kişilerin tüm sonuçları kullanıldı. Tüm sonuçlar arası

varyans saptandı. Tüm sonuçların genel ortalamasına bölünerek total varyasyon (CV_T) bulundu. Aşağıdaki formül ile CV_G hesaplandı:

$$CV_G = (CV_T^2 - CV_I^2 - CV_A^2)^{1/2}$$

Yöntemin bireysellik indeksi (Index of Individuality) (InI) sonuçların referans değerlere göre değerlendirilmesinin uygun olup olmadığını ifade eder ve CV_I / CV_G formülü ile hesaplanır (9).

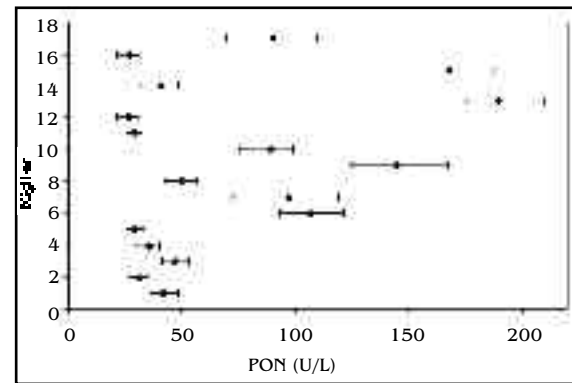
Yöntemin kalite gereklilikleri (spesifikasyonları) olarak kesinlikten sapma (imprecision) $I < 0.5 CV_I$; doğruluktan sapma (bias) $B < 0.25 (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$ ve toplam kabul edilebilir hata $TEa < 1.65I + B$ formülleri kullanılarak hesaplandı (10).

BULGULAR

PON1 ve HDL-K sonuçları her gönüllü için Şekil 1 ve Şekil 2'de gösterilmiştir.

PON1 ve HDL-K için hesaplanan CV_A , CV_I , CV_G , InI sonuçları ve yöntemin kalite gereklilikleri Tablo 1'de belirtilmiştir.

Kadınlarda ortalama PON1 aktivitesi 64.89 ± 41.17 U/L (ortalama \pm SD) iken erkeklerde 82.38 ± 65.04 U/L idi ve aralarında anlamlı fark yoktu. HDL-K ise kadınlarda 61.32 ± 13.25 mg/dL, erkeklerde 42.39 ± 11.58 mg/dL olarak bulundu ve iki sonuç arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0.007$).

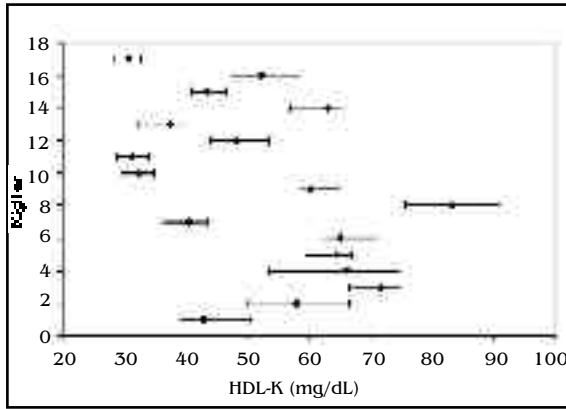


Şekil 1. Kişilerin ortalama, en düşük ve en yüksek PON1 değerleri.
İlk 9 kişi kadın, 10-18. kişiler erkektir.

Tablo 1. PON ve HDL-K'ün biyolojik varyasyon ve kalite gereklilikleri.

	PON			HDL-K		
	Tüm Grup	Kadınlar	Erkekler	Tüm Grup	Kadınlar	Erkekler
Ortalama aktivite (U/L)/ konsantrasyon (mg/dL)*	73.12±52.71	64.89±41.17	82.38±65.04	52.41±15.53	61.32±13.25	42.39±11.58
Analitik varyasyon (CV _A) %	1.38	1.38	1.38	1.09	1.09	1.09
Birey-içi (CV _I) %	11.45	11.26	11.67	6.24	6.45	6.01
Bireyler-arası (CV _G) %	70.83	61.02	75.15	28.73	20.50	25.74
Bireysellik indeksi (CV _I /CV _G)	0.16	0.18	0.16	0.22	0.31	0.23
Kalite Gereklilikleri						
Kesinlikten Sapma (%)	5.73	5.63	5.84	3.12	3.23	3.00
Doğrulukta Sapma (%)	17.71	15.51	19.01	7.35	5.37	6.61
Toplam Kabul edilebilir Hata (TEa) (%)	27.16	24.80	28.65	12.50	10.70	11.56

* Sonuçlar ortalama ± SD olarak verilmiştir.



Şekil 2. Kişilerin ortalama, en düşük ve en yüksek HDL-K değerleri.

İlk 9 kişi kadın, 10–18. kişiler erkektir.

TARTIŞMA

Son yıllarda PON1 ve PON1'in LDL ile HDL üzerine koruyucu etkisi ile ilgili çok sayıda çalışma vardır. PON1'un genetik varyasyonları en sık çalışılmış konular iken, biyolojik varyasyonu ile ilgili sadece tek bir çalışma vardır. Oysa biyolojik varyasyon verileri ile elde edilen bilgiler test sonuçlarının daha doğru yorumlanmasına yardımcı olabilir. PON1'un biyolojik varyasyonu ile ilgili literatürdeki tek çalışma Browne ve ark. tarafından yapılmış, CV_A, CV_I ve CV_G sırasıyla %9.17, %13.4 ve %84.0 olarak bulunmuştur (11).

Çalışmamızda CV_A, Browne ve ark.'nın sonucuna göre oldukça düşük bulunmuştur. PON1 yöntemleri henüz standardize yöntemler değildir. Ayrıca çalışma sırasında paraokson'un substrat olarak kullanıldığı reaktifte zamanla non-enzimatik ve PON1 ile ilişkili olmayan hidroliz meydana geldiği ve "kör" absorban-sının yükseldiği gözlemlendi. Bu nedenle çift ölçümlerde tüm örneklerin ilk analizleri bitirildikten sonra bir kör okuma yapılarak ikinci analizlere geçildi. Bu işlem ölçümler arası varyansın daha düşük olmasını ve dola yısıyla daha düşük CVA saptamış olmamızı sağlamış olabilir.

PON1'in birey-içi biyolojik varyasyonu yüksek değildir. Çalışmamızda ve Browne ve ark. çalışması ile benzer sonuçlar saptanmıştır. Ancak her iki çalışmada da bireyler-arası varyasyon oldukça yüksek bulunmuştur. Bireyler-arası farklılıkta genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır. Genetik faktörlerin total fenotipik varyasyonun %65 ile 92'sinden sorumlu olduğu, genetik faktörler den sonra lipoprotein metabolizması ile ilgili etkenlerin de ikinci sırada yer aldığını bildirilmiştir (12). Ayrıca sigara kullanımının, yaş ve yağdan zengin beslenmenin PON1 aktivitesini düşürdüğü rapor edilmiştir (13,14).

PON1'in plazmada tamamen HDL'nin yapısında bulunması ve lipid parametrelerinin

PON1 biyolojik varyasyonunda etkili olduğunun bildirilmesi nedeniyle HDL-K'ün biyolojik varyasyonu da çalışma kapsamına alındı ve saptanan PON1 biyolojik varyasyonunda HDL-K'ün ne kadar etkili olduğu değerlendirilmeye çalışıldı.

HDL-K'ün CV_G'ni %6.24, CV_G'ni ise %28.75 olarak bulundu. Bu değerler Ricos ve ark.nın çeşitli çalışmalardan derleyerek oluşturdukları ve Westgard QC web sayfasında da yer alan veriler (15) ile benzerdir. Bizim saptadığımız CV_G daha yüksektir. Bu fark verinin alındığı kaynakta çalışmanın sadece kadın gönüllüler ile yapılmasından olabilir (16). Kadınlar ve erkeklerin HDL-K değerleri birbirinden farklıdır. Bu çalışmada da HDL-K düzeyi kadınlarda 61.32 mg/dL, erkeklerde ise 42.39 mg/dL olarak saptandı ve ortalamaları anlamlı olarak farklı bulundu. Daha geniş bir aralığa yayılan değerler arasındaki farkın karşılaştırılması nedeniyle daha büyük kişiler-arası fark elde edilmiş olması doğaldır. HDL-K'ün gerek birey-içi gerekse de bireyler-arası varyasyonu PON1 varyasyonu ile karşılaştırıldığında görece olarak düşük olduğundan PON1 varyasyonunda temel belirleyici faktör olmadığı düşünüldü.

Bireysellik indeksi, test sonuçlarının referans aralık ile karşılaştırılarak değerlendirilmesinin uygunluğu hakkında bilgi veren bir parametredir. İndeks sonucu küçüldükçe bireysellik artar. Eğer InI <0.6 ise bireysellik yüksektir ve sonuçların mümkün olduğunca kişinin kendi eski sonuçlarına göre değerlendirilmesi uygundur. InI >1.4 ise sonuçların referans değerlere göre ele alınması uygun kabul edilir (9). Hem PON1 hem de HDL-K için InI <0.6 olarak saptandı. Bu yukarıda belirtilen çalışmalardaki sonuçlar ile aynıdır. Gerek PON1 gerekse de HDL-K için düşük değerler saptanması, kişiler arası farkın büyük olduğunu ve bu nedenle referans değerler yerine kişinin önceki sonuçlarına göre değerlendirmenin değişimlerdeki anlamlılığı saptamada klinik olarak daha yararlı olacağını göstermektedir.

Biyolojik varyasyon verilerinden elde edilebilecek bir diğer sonuç da yöntemin kalite hedeflerinin veya standartların belirlenmesidir (17). Test sonuçlarının doğruluğu hasta tanı, tedavi ve takibinde büyük önem taşır. Klinik karar aşamasında doğru sonuçların hastaya yararına kullanılması yöntemin analitik kalitesi ile de ilgilidir. Bu nedenle analitik kalite hedeflerinin belirlenmesi özellikle yeni bir yöntemin laboratuvarlar tarafından kullanıma konması sırasında yol gösterici olur. Son yıllarda kalite spesifikasyonları-gereklilikleri olarak isimlendirilen kesinlikten sapma, doğruluktan sapma ve toplam kabul edilebilir hata, PON1 ve HDL-K için hesaplandı. HDL-K için saptadığımız sonuçlar Ricos ve ark. tarafından bildirilen değerler (I< %3.6; B< %5.2 ve TEa <% 11.1) ile benzerdir. "National Cholesterol Education Program" total kolesterol, LDL-K, HDL-K ve trigliserid ölçümleri için kalite gerekliliklerini 1995 yılında belirlemiş ve 2002 yılındaki güncellemesinde (Adult Treatment Panel III -ATPIII) bu değerleri aynen kabul etmiştir (18,19). NCEP tarafından kabul edilen ve tüm standardize laboratuvarlar tarafından uyulması istenen kalite gereklilikleri I <% 4; B <%5 ve TEa <% 13'dür. Laboratuvarımızda kullanılan yöntem HDL-K için kesinlikten sapma ve TEa için belirlenen gereklilikleri karşılarken doğruluktan sapma için hedefi karşılamamaktadır. Ricos ve ark tarafından bildirilen değerler de aynı özellikleri taşımaktadır. Hedeflerin bulunduğu 1995 yılından günümüze dek 18 yıl geçmiş olmasına rağmen halen kullanılmakta olan HDL-K yöntem ve kitleri henüz arzulanan doğruluk kriterine ulaşmış değildir.

Sonuç olarak, PON1 düşük birey-içi ve yüksek bireyler-arası varyasyona sahiptir. HDL-K'ün ise her iki biyolojik varyasyon komponenti de göreceli olarak daha düşüktür ve bu nedenle PON1'in yüksek varyasyonunda HDL-K'ün katkısı azdır. Ancak her ki parametrenin de InI değerleri düşük olduğundan sonuçlarının referans değer aralığı yerine

hastanın önceki sonuçlarına göre değerlendirilmesi daha uygundur.

KAYNAKLAR

1. Negre-Salvayre A, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radic Biol Med* 2006; 41(7): 1031-40.
2. Costa LG, Li WF, Richter RJ, Shih DM, Lusic A, Furlong CE. The role of paraoxonase (PON1) in the detoxication of organophosphates and its human polymorphism. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120: 429-38.
3. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286: 152-4;
4. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 2005; 16: 393-9.
5. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-80.
6. Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE. Functional genomics of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med* 2003; 54: 371-92.
7. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989; 27: 409-37.
8. Juretic D, Tadijanovic M, Rekić B, Simeon-Rudolf V, Reiner E, Baricic M. Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Croat Med J* 2001; 42(2): 146-50.
9. Petersen PH, Fraser CG, Sandberg S, Goldschmidt H. The index of individuality is often a misinterpreted quantity characteristic. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37(6): 655-61.
10. Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Ricos C, Haecckel R. Proposed quality specifications for the imprecision and inaccuracy of analytical systems for clinical chemistry. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30: 311-7.
11. Browne RW, Koury ST, Marion S, Willding G, Muti P, Trevisan M. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase I activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assays. *Clin Chem* 2007; 53: 310-7.
12. Rainwater DL, Rutherford S, Dyer TD, Rainwater ED, Cole SA, Vandenberg JL, Almasy L, Blangero J, Maccluer JW, Mahaney MC. Determinants of Variation in Human Serum Paraoxonase Activity. *Heredity* 2009; 102(2): 147-54.
13. Soran H, Younis NN, Charlton-Menys V, Durrington P. Variation in paraoxonase-I activity and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2009; 20(4): 265-74.
14. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochem Pharmacol* 2005; 69(4): 541-50.
15. <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M. "Current databases on biologic variation: pros, cons and progress." *Scand J Clin Lab Invest* 1999; 59: 491-500. Desirable Specifications for Total Error, Imprecision, and Bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation.
16. Gallagher SK, Johnson AK, Milne DB. Short and long term variability of selected indices related to nutritional status. II. Vitamins, lipids, and protein indices. *Clin Chem* 1992; 38: 1449-53.
17. CG Fraser and PH Petersen. Desirable standards for laboratory tests if they are to fulfill medical needs. *Clin Chem* 1993; 39: 1447-53.
18. GR Warnick and PD Wood. National Cholesterol Education Program recommendations for measurement of high-density lipoprotein cholesterol: executive summary. The National Cholesterol Education Program Working Group on Lipoprotein Measurement. *Clin Chem* 1995; 41: 1427-33.
19. National Cholesterol Education Program. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. NIH Publication; 2002; pp: III-7.

Yazışma adresi:

Dr. Pınar Tuncel
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir
E-posta : ptuncel@deu.edu.tr
