

Erken Yaş Koroner Kalp Hastalığı Tanısı Olan Hastalarda LDL Oksidasyon Duyarlılık Tespiti ve Genetik Yatkınlık

Dr. Elife Özkan • Prof. Dr. Pınar Tuncel

 ÖZGÜR
YAYINLARI

Erken Yaş Koroner Kalp Hastalığı Tanısı Olan Hastalarda LDL Oksidasyon Duyarlılık Tespiti ve Genetik Yatkınlık

Dr. Elife Özkan

Biyokimya Uzmanı – Tire Devlet Hastanesi

Prof. Dr. Pınar Tuncel

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya

Anabilim Dalı – İzmir



Published by

Özgür Yayın-Dağıtım Co. Ltd.

Certificate Number: 45503

15 Temmuz Mah. 148136. Sk. No: 9 Şehitkamil/Gaziantep

+90.850 260 09 97

+90.532 289 82 15

www.ozgur yayinlari.com

info@ozgur yayinlari.com

Erken Yaş Koroner Kalp Hastalığı Tanısı Olan Hastalarda LDL Oksidasyon Duyarlılık Tespiti ve Genetik Yatkınlık

Dr. Elife Özkan • Prof. Dr. Pınar Tuncel

Language: Turkish

Publication Date: 2025

Cover paint by Mehmet Çakır

Cover design and image licensed under CC BY-NC 4.0

Print and digital versions typeset by Çizgi Medya Co. Ltd.

ISBN (PDF): 978-625-5958-80-8

DOI: <https://doi.org/10.58830/ozgur.pub714>

OPEN ACCESS



This work is licensed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0). To view a copy of this license, visit <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

This license allows for copying any part of the work for personal use, not commercial use, providing author attribution is clearly stated.

Suggested citation:

Özkan, E., Tuncel, P., (2025). *Erken Yaş Koroner Kalp Hastalığı Tanısı Olan Hastalarda LDL Oksidasyon Duyarlılık Tespiti ve Genetik Yatkınlık*. Özgür Publications.

DOI: <https://doi.org/10.58830/ozgur.pub714>. License: CC-BY-NC 4.0

The full text of this book has been peer-reviewed to ensure high academic standards. For full review policies, see <https://www.ozgur yayinlari.com/>



İçindekiler

1. Giriş ve Amaç	1
2. Genel Bilgiler	5
2.1. Lipoprotein Metabolizması	5
2.1.1. Şilomikron	6
2.1.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein (VLDL)	7
2.1.4. Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)	8
2.1.5. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)	9
2.2. Apolipoproteinler ve Görevleri	11
2.2.1. Apo B	11
2.2.2. Apo AI, A-II, A-IV	11
2.2.3. Apo E	12
2.2.4. Apo C	12
2.2.5. Apo D	13
2.3. Lipoprotein (a)	13
2.4. Koroner Kalp Hastalığı	15
2.4.1. Tanımı	15
2.4.2 Fiziyojisi	16
2.5 SERBEST RADİKALLER VE LİPİD PEROKSİDASYONU	20
2.5.1 Serbest Radikal Kavramı	20
2.5.2 Lipid Peroksidasyonu	22

2.6 ANTİOKSİDAN MEKANİZMALAR	25
2.6.1 İNTRASELLÜLER ANTİOKSİDANLAR	26
2.6.2 MEMBRANA YERLEŞİKLİ ANTİOKSİDANLAR	28
2.6.3 EKSTRASELLÜLER ANTİOKSİDANLAR	28
2.6.4 E VİTAMİNİ	29
2.8 HOMOSİSTEİN	30
2.8.1 HOMOSİSTEİN VE ATEROSKLEROZ	31
2.8.2 TOTAL HOMOSİSTEİN ÖLÇÜMÜ	32
3.3 OLGU SEÇİMİ	33
3.4 KİMYASAL ANALİZLER	34
3.4.1 LDL'nin Oksidasyona Duyarlılığının Ölçülmesi	34
3.4.2 Protein Tayini	37
3.4.3 FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay)	40
3.4.4 HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)	42
3.4.5 Diğer Analizler	48
3.5 İstatistiksel Analizler	49
4. Tartışma ve Sonuç	53
Kaynaklar	61

1. Giriş ve Amaç

Gelişmiş ülkelerde koroner kalp hastalığı (KKH), birincil sağlık sorunu olarak kabul edilmektedir. Bazı ülkelerde KKH, tüm ölümlerin büyük bir bölümünü oluşturmakta (tüm kalp hastalıklarının üçte ikisi, toplam ölümlerin ise üçte biri) ve bu vakaların büyük çoğunluğunda hastalığın temel nedeni aterosklerozdur.

Koroner kalp hastalıkları, toplum sağlığını olumsuz etkilediği kadar ülke ekonomisine de büyük bir yük getirmektedir. Bu nedenle, hastalığa neden olan risk faktörleri üzerinde daha fazla durulmakta ve araştırmalar yoğunlaşmaktadır. Ancak, aterosklerozun patogeneğinde rol oynayan birçok etiyolojik neden ve risk faktörü bulunmaktadır. Bu çeşitlilik nedeniyle özellikle önlenabilir risk faktörleri üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır.

Günümüzde bu hasta grubu için tanı ve tedavi yöntemlerinin sürekli gelişmesi ve güncellenmesi, hastalığın mortalitesini azaltmaktadır. Vücudumuzda, endojen ve eksojen mekanizmalar sonucu oluşan reaktif

ürünlere karşı gelişmiş antioksidan savunma sistemleri bulunmaktadır. Yapılan pek çok epidemiyolojik çalışmada, aterosklerozun plazma lipoproteinleri ve yağ asitleri ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Doymamış yağ asitleri oksidasyona daha yatkın olduğundan, LDL ve VLDL gibi lipoproteinlerin yapısında yer alan bu yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda lipoproteinler yapısal olarak değişime uğramakta; bu değişime uğramış lipoproteinler ise aterosklerotik sürecin başlamasında primer rol oynamaktadır. Bu durum, hem in vivo hem de in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Sulu ortamda ve LDL ile VLDL yapısında bulunan antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması durumunda, serbest radikaller kimyasal değişikliklere yol açmakta ve bu süreç aterosklerotik lezyon oluşumunda temel bir rol oynamaktadır (1, 2, 3).

Radikal oluşumu mekanizmalarıyla açıklanabilen yüksek homosistein düzeylerinin etkisi de, birçok çalışmada gösterilmiş olup ateroskleroza neden olabilen majör, bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında, primer hasta grubu olarak koroner anjiyografi ile aterosklerotik damarsal lezyon saptanmış ve erken yaşta koroner kalp hastalığı tanısı konmuş bireyler seçilmiştir. Genetik ve cinsiyete bağlı yatkınlık da dikkate alınarak, LDL oksidasyonuna ve ateroskleroza yatkınlığa neden olan tüm parametreler bu hasta grubunda değerlendirilmiştir (1, 4, 5, 6, 7).

İkinci grup olarak, bu hastaların 18–35 yaş aralığındaki birinci derece erkek akrabaları (erkek kardeşleri veya oğulları) belirlenmiştir. Kontrol grubu ise yine 18–35 yaş arasında, sağlıklı erkeklerden oluşturulmuştur.

Çalışmanın amacı; erken yaşta KKH gelişmiş bireyler ile bu kişilerin KKH gelişme riski yüksek olan birinci derece akrabalarında, aterosklerotik lezyon oluşumuna neden olan risk faktörlerinden Apo B içeren lipoproteinlerin (LDL, VLDL) oksidasyona duyarlılığının; bu lipoproteinlerin yapısında bulunan antioksidan A ve E vitamini konsantrasyonlarının; ayrıca ateroskleroz için majör bağımsız risk faktörü olarak kabul edilen plazma homosistein düzeylerinin değerlendirilmesidir (8, 9).

2. Genel Bilgiler

2.1. Lipoprotein Metabolizması

Lipoproteinler, hidrofobik lipidleri (trigliserid ve kolesterol esterleri) içeren nonpolar bir çekirdek ile protein, serbest kolesterol ve fosfolipidlerden oluşan polar bir yüzey tabakasının çevrelediği küresel yapılardır. Lipoproteinlerin temel fonksiyonu, suda çözünmeyen trigliserid, kolesterol ve kolesterol esterleri gibi kompleks lipidleri plazma içerisinde suda çözünür bir makromolekül formunda taşımaktır. Bu yapılar, lipid ve protein bileşenlerinin oranlarına göre oldukça dinamik özellik gösteren moleküllerdir. Lipoproteinlerin yüzeyinde bulunan özgül apolipoproteinler, bu moleküllerin metabolizmasını belirlemektedir. Günümüzde yaklaşık on farklı lipoprotein yapısı tanımlanmıştır (10,11).

2.1.1. Şilomikron

Özellikleri:

Şilomikronlar, plazmadaki lipoproteinlerin en büyük olanlarıdır. Plazma ultrasantrifüjü ile kolaylıkla ayrıştırılabilirler. Yapılarının %98–99'u lipitlerden, %1–2'si ise proteinlerden oluşur. Yemek sonrasında düzeyleri belirgin şekilde artar ve dolaşımdaki şilomikronlar çeşitli apolipoproteinler içerir. Bu partiküllerdeki en belirgin apolipoprotein molekülü ApoB-48 olup, moleküler ağırlık açısından ApoB-100'ün yaklaşık yarısına denk gelir.

Kaynağı:

Şilomikronlar, ince bağırsak (duodenum ve proksimal jejunum) epitel hücrelerinde sentezlenir. Bu hücreler tarafından emilen serbest yağ asitleri ve monogliseridler, apikal bölgede bulunan düz endoplazmik retikulumda yeniden trigliseride dönüştürülür. Bu süreçte fosfolipidler ve kolesterol de kullanılarak büyük şilomikron partikülleri oluşturulur.

Apolipoproteinlerin son karbonhidrat modifikasyonları Golgi aygıtında gerçekleştirilir. Daha sonra şilomikronlar enterositlerin lateral yüzeyinden lenfatik sisteme salınır ve torasik lenf yoluyla vena kava superiora geçer.

Metabolizmadaki Sonu:

Dolaşıma katıldıktan sonra, lipoprotein lipaz enzimi ApoC-II ile aktive edilir ve şilomikronların içeriğindeki trigliseridler hidrolize edilir. Bu işlem sonrası partikül boyutları küçülür ve yoğunlukları artar. Ortaya çıkan

şilomikron kalıntıları karaciğer tarafından dolaşımdan temizlenir (10,11).

2.1.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein (VLDL)

Özellikleri: < 1.006 g / mL ‘ yoğunluğuna sahip lipoproteinlerin trigliserit %, Çapı 300–700 Å arasında olan bu lipoproteinlerin dansitesi <1.006 g/mL’dir ve plazmadan ultrasesantrifügasyon ile izole edilebilirler. Yapılarının %85–90’ı lipidlerden oluşur (%55’i trigliserid, %20’si kolesterol, %15’i fosfolipid). VLDL’nin en önemli apolipoproteini ApoB-100’dür. Bunun yanında ApoC ve ApoE’yi de içerir. VLDL, elektroforezde pre-beta ve alfa-2 devinimi gösterir.

Kaynağı:

Karaciğer tarafından sentezlenir. Sentez, hepatositlere artan miktarda serbest yağ asidi taşınmasıyla uyarılabilir. Trigliserid ve fosfolipidler, granüllü ve düz endoplazmik retikulumda sentezlenir. Yeni sentezlenmiş VLDL’nin temel protein bileşenleri ApoB-100, ApoE ve az miktarda ApoC’dir. Dolaşımda VLDL, HDL’den ApoC ve ApoE’yi alır.

Metabolizmadaki Sonu:

VLDL içeriğindeki trigliseridler, lipoprotein lipaz (LPL) ve daha az ölçüde hepatik lipaz (HL) tarafından hidrolize edilir. Bu süreçte VLDL partikülleri kolesterol açısından zenginleşir. VLDL’nin katabolizma ürünleri, orta dansiteli lipoproteinler (IDL) olarak adlandırılır. IDL, hepatik lipazın etkisiyle düşük dansiteli lipoproteine (LDL) dönüşür. VLDL’nin yaklaşık %50’si LDL’ye çevrilirken, geri kalan %50’si küçük VLDL ve IDL olarak

doğrudan karaciğer tarafından dolaşımdan temizlenir (10,11,12).

2.1.4. Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)

Özellikleri: LDL'ler (dansite: 1.019–1.063 g/mL), plazmadaki başlıca kolesterol taşıyıcı lipoproteinlerdir. Plazmadaki toplam kolesterolün yaklaşık %70'i LDL'de bulunur. Çapları yaklaşık 200 Å'dır. Yapılarının %75'i lipitlerden oluşur (%35 ester kolesterol, %10 serbest kolesterol, %10 trigliserid ve %20 fosfolipid) ve %25'i proteindir. Az miktarda ApoE içermekle birlikte, LDL partiküllerinin karakteristik apolipoproteini ApoB-100'dür. LDL'ler beta elektroforetik mobiliteye sahiptir ve bu nedenle β -lipoproteinler olarak adlandırılırlar (10,11,12).

Kaynağı: trigliserid partikülleri LDL, lipaz aracılığıyla VLDL'nin hidrolize edilmesi sonucu oluşan nihai üründür. Büyük VLDL partiküllerinin trigliserid açısından zengin çekirdeği hidrolize edildiğinde, fazla yüzey bileşenleri HDL'ye aktarılır. Bu süreç sonucunda, ApoB-100 dışında apolipoprotein içermeyen, kolesterolden zengin küçük bir partikül olan LDL oluşur.

Metabolizmadaki Sonu:

LDL'nin yaklaşık %75'i karaciğer parankim hücreleri tarafından alınır. Diğer birçok doku da küçük miktarlarda LDL alabilir. Bu alımın yaklaşık üçte ikisi LDL reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Geri kalan kısmı, henüz tam olarak tanımlanmamış ve reseptör aracılığıyla olmayan yollarla hücrelere alınır.

Kandaki LDL Düzeyini Artıran Faktörler:

1. VLDL biyosentezinin artması

- Serbest yağ asitlerinin karaciğere girişinin artması
- Diyetle alınan yağ miktarının artması ve bu yağların karaciğere taşınması

2. LDL katabolizmasının azalması

- Karaciğer ve diğer dokularda LDL reseptörlerinin sayısının azalması (*Hücreler, metabolik ihtiyaçlarını karşılayacak düzeyde kolesterol aldığıında LDL reseptör sentezini azaltarak denge sağlar.*)
- ApoB-100 ile normal şekilde etkileşemeyen kusurlu LDL reseptörleri
- LDL reseptörleriyle normal etkileşim kuramayan kusurlu ApoB-100 (10,11)

2.1.5. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)

Özellikleri:

HDL, diğer lipoproteinlere göre daha küçük bir partiküldür. Çapı 70–120 Å, dansitesi ise 1.063–1.125 g/mL'dir. Yapılarının yaklaşık %50'si lipit (%25'i fosfolipid, %15'i ester kolesterol, %5'i serbest kolesterol, %5'i trigliserid), %50'si ise proteinden oluşur. HDL'nin başlıca apolipoproteinleri şunlardır: ApoA-I (%65), ApoA-II (%25) ve daha az miktarda ApoC ile ApoE. Yapısında taşıdığı apolipoproteinlere göre alt sınıflara ayrılır. Elektroforezde α -elektroforetik hareketlilik gösterir (10,11,12).

Kaynağı:

HDL sentezi üç ana kaynaktan gerçekleşir:

1. Karaciğer, “olgunlaşmamış HDL” olarak adlandırılan ApoA-I içeren fosfolipid diskler salgılar.
2. İnce bağırsak da küçük ApoA-I içeren HDL partiküllerini doğrudan sentezleyebilir.
3. Şilomikronlar ve VLDL’lerin lipoprotein lipaz (LPL) tarafından hidrolizi sonucu ortaya çıkan fosfolipid ve serbest kolesterolden oluşan yüzey bileşenleri, ApoA-I ile birleşerek küçük HDL disklerini oluşturur. Bu disk, diğer hücrelerden ve lipoproteinlerden lipid — özellikle serbest kolesterol — alır. Lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) enzimi aracılığıyla kolesterol esterleştirilir (10,12,13).

HDL, lipitlerin lipoproteinler ve hücreler arasında yeniden dağıtılmasında görev alır. Bu süreç “ters kolesterol taşınması” olarak adlandırılır. HDL, kolesterolü hücrelerden alıp, ya atılmak üzere karaciğere ya da kolesterole ihtiyaç duyan diğer hücrelere taşır.

Metabolizmadaki Sonu:

HDL’nin katabolizması tam olarak aydınlatılamamıştır. HDL partiküllerinin büyük kısmı plazmayı değişmeden terk etmez. Esterleşmiş kolesterol, bu partikülden “seçici alım” olarak adlandırılan bir mekanizma ile alınarak karaciğer, adrenal bezler ve over gibi dokulara gönderilir.

HDL Düzeyini Etkileyen Faktörler:

- Düzenli egzersiz ve orta derecede alkol tüketimi HDL düzeylerini artırır.
- Sigara kullanımı HDL düzeylerini düşürür (14).

2.2. Apolipoproteinler ve Görevleri

2.2.1. Apo B

Apo B iki şekilde bulunur:

- **ApoB-48:** Çubuklar Barsaklarda sentezlenir; şilomikronlar ve şilomikron kalıntılarının yapısında yer alır.
- **ApoB-100:** Karaciğerde sentezlenir; VLDL, IDL ve LDL'nin yapısal taşıyıcı proteinidir. Molekül ağırlığı 523.000 dalton, aminoasit sayısı 4536'dır. ApoB-100, aynı zamanda LDL reseptörü için ligandır.

ApoB-48'in molekül ağırlığı 264.000 daltondur ve 2152 aminoasitten oluşur. Şilomikronların sentezi ve salınımı için gereklidir. ApoB-100 ve ApoB-48, aynı genin ürünüdür.

2.2.2. Apo AI, A-II, A-IV

HDL'nin başlıca proteinleri olan Apo A-I, Apo A-II ve Apo A-IV, bağırsak ve karaciğer tarafından sentezlenir ve şilomikronlar da dâhil olmak üzere çeşitli lipoproteinlerin yapı taşıdır.

Molekül ağırlıkları:

- **Apo AI :** 28.000 dalton
- **Apo A-II :** 17.000 dalton

- **Apo A-IV** : 45.000 dalton

Bu üç apolipoprotein, HDL yapısında yer alır ve Apo A-I ile Apo A-II, lipid bağlama yeteneklerini artırır. Apo A-I, lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) enzimini aktive eden bir kofaktör olarak görev yapar. Şilomikronların lipolizi sırasında Apo A-I, bu partiküllerin yüzeyinden ayrılır ve HDL'ye transfer edilir.

Apo A-I, karaciğer ve böbreklerde katabolize olur. Apo A-II, LCAT enziminin inhibitörü ve hepatik lipazın aktivatörü olarak işlev görür; Apo A-I ile benzer hızda yıkılır. Apo A-IV ise yapısal ve fonksiyonel olarak A-I ve A-II'ye benzerlik gösterir (10,11,13).

2.2.3. Apo E

Karaciğer başta olmak üzere vücudun çeşitli bölgelerinde sentezlenen, molekül ağırlığı yaklaşık 34.000 dalton olan bir proteindir. Apo E'nin temel görevi, LDL reseptörüne ve varsayılan şilomikron artığı reseptörüne bağlanarak lipoproteinlerin tanınmasını sağlamaktır. Şilomikronların yüzeyinde yer alan Apo E, şilomikron kalıntılarının plazmadan temizlenmesinde önemlidir. Apo E'nin yapısal bir kusuru, bu kalıntıların uzaklaştırılmasını belirgin şekilde bozabilir. Ayrıca, kolesterol ester transfer proteininin (CETP) lipoproteinlere olan bağlanma yeteneğini artırarak, ters kolesterol taşınımında ve ester kolesterolden zengin HDL partiküllerinin dolaşımdan temizlenmesinde görev alır.

2.2.4. Apo C

Apo C grubu, düşük molekül ağırlıklı proteinlerden oluşur:

- **Apo C-I:** Molekül ağırlığı 6.600 daltondur. Apo E'nin şilomikron kalıntı reseptörüne bağlanmasına engel olarak kalıntıların alınmasını düzenler.
- **Apo C-III:** Molekül ağırlığı 8.800 daltondur. Kalıntıların reseptörlere bağlanmasının düzenlenmesinde benzer işlev görür.
- **Apo C-II:** Molekül ağırlığı 8.900 daltondur ve lipoprotein lipaz enziminin kofaktörü olarak görev yapar (10,11).

2.2.5. Apo D

Karaciğerde sentezlenen ve fizyolojik açıdan önemli bir apolipoprotein olan Apo D, HDL yapısında bulunur. Kolesterol esterlerinin, HDL'den diğer lipoproteinlere ve katabolizma için karaciğere taşınmasında görev alır (10,11).

2.3. Lipoprotein (a)

Yapısı ilk kez 1987 yılında tanımlanmıştır. Lipoprotein (a) [Lp(a)], ApoB-100 içeren bir LDL partikülüdür. Buna ek olarak apolipoprotein (a) adı verilen büyük bir protein de içerir. Esas sentez yeri karaciğerdir; az miktarda da beyinde sentezlenir. Apolipoprotein (a), fibrinolitik sistemin bir bileşeni olan plazminojen ile belirgin bir yapısal benzerlik gösterse de işlevsel olarak aynı değildir. Plazminojen, "kringle" olarak adlandırılan beş benzer yapısal üniteden ve bir proteaz alanından oluşur. Buna karşılık apolipoprotein (a), sadece kringle IV ve V tipi halka tipi iki kringle yapısı ve inaktif (psödoproteaz) bir proteaz alanı içerir. Apo(a), ApoB-100'e disülfid bağı ile bağlanır. Lp(a) oldukça heterojen yapıdadır; 20'den fazla izoformu tanımlanmıştır.

Lp(a) Düzeyleri ve Önemi

Lp(a) düzeyleri immünoanaliz yöntemleriyle saptanabilir ve 0–100 mg/dL arasında değişiklik gösterebilir. Vakaların yaklaşık %50'sinde bu değer 0–10 mg/dL arasında ölçülmektedir. Lp(a) düzeyi, vücut ağırlığı, diyet ya da lipid düşürücü ilaçlardan etkilenmez. Cinsiyet ve yaş da genel olarak belirleyici değildir. Yalnızca menopoza sonrası kadınlarda artış eğilimi gösterir. Östrojen tedavisi alan erkeklerde Lp(a) düzeyleri anlamlı şekilde düşüktür.

Lp(a) düzeyinin:

- Miyokard enfarktüsü sonrası 3 aya kadar yüksek kaldığı,
- Akut stres durumlarında arttığı,
- Kontrolsüz diyabet hastalarında da yüksek olduğu bilinmektedir.

Lp(a) düzeyini düşürebilen bilinen faktörler yalnızca:

- Ciddi karaciğer hastalıkları
- Nikotinik asit tedavisi olarak rapor edilmiştir.

Apo(a)'nın Plazminojen ile İlişkisi ve Aterojen Etkisi

Yapı bakımından plazminojene benzeyen Apo(a), işlevsel olarak fibrinoliz sistemine katkı sağlamaz. Endotel hücrelerinde plazminojen reseptörü tanımlanmıştır. İlginç bir şekilde, Lp(a) ve izole Apo(a) da bu reseptöre bağlanabilir. Bu bağlanma, plazminojen ile rekabet oluşturarak plazmin üretimini engelleyebilir. Böylece, plazminin endotel yüzeyinde oluşturduğu fibrinolitik etki

baskı baskılanır ve trombogenez için elverişli bir ortam oluşur.

Aterogenezdaki Rolü

Lp(a)'nın aterogenezdaki işlevini düşündüren bir diğer kanıt da, aterosklerotik lezyonlarda yüksek düzeyde Lp(a) tespit edilmiş olmasıdır. LDL'ye olan yapısal benzerliği sebebiyle kolesterolden zengin bir lipoproteindir. Bu nedenle, LDL'nin ateroskleroza neden olduğu mekanizmalarla benzer şekilde aterojenik olabilir. Tam mekanizması kesin olarak açıklanamamış olsa da, yüksek Lp(a) düzeylerinin erken yaşta koroner kalp hastalığı (KKH) için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve aterojenik lipoprotein niteliği taşıdığı kabul edilmektedir.

2.4. Koroner Kalp Hastalığı

2.4.1. Tanımı

Koroner kalp hastalığı, aortadan epikardiyal koroner arterlere kadar çeşitli büyüklükteki arterlerde intimal hasar sonucu gelişen bir hastalıktır. Temel patoloji, koroner arter lümeninin kolesterol birikimiyle daralmasıdır. Bu daralma, kalp kasını besleyen kan akışını azaltır, doku oksijenlenmesi bozulur ve hastalığın bilinen semptomları ortaya çıkar (4).

Koroner kalp hastalığının en yaygın nedeni olan ateroskleroz, damar duvarına karşı gelişen çeşitli etkenler sonucu oluşan spesifik, koruyucu, yangısal ve fibroproliferatif bir yanıttır.

İntimal Hasara Neden Olan Etkenler:

- Mekanik zedelenme

- Okside LDL
- Homosistein
- İmmünolojik ajanlar
- Toksinler
- Virüsler (14,15,16,17,18,19)

2.4.2 Fizyolojisi

2.4.2.1 Normal Arter Duvarının Yapısı

Intima: Endotel hücrelerinden oluşan kesintisiz bir tabaka ile bu hücrelerin hemen altında yer alan, matriks açısından zengin dar bir bölgeden oluşur. (Bu bölge, arter duvarında aterosklerotik lezyonların başladığı yerdir.)

Media: Arter duvarının en geniş bölümüdür ve düz kas hücrelerinden oluşur. Intima ve media, “iç elastik membran” adı verilen kesintili bir elastin bant ile birbirinden ayrılır.

Adventisya: Damarların dış yüzeyini çevreleyen gevşek bağ dokusundan oluşur ve arter duvarını besleyen küçük damarları (vasa vasorum) içerir.

2.4.2.2 Aterosklerozun Gelişiminde Rol Alan Yapılar

- **Endotel:** Tüm arterlerin iç yüzeyini kaplayan sıkı bir tabakadır. Kan hücrelerinin arter duvarına girişini kontrol eder ve trombozu önler. Endotel hücreleri, arter duvarındaki diğer hücreleri etkileyen çeşitli faktör ve sitokinler salgılar.
- **Düz kas hücreleri:** Arter duvarının kontraktil hücreleridir ve duvarın esas kütesini oluştururlar. Hücrelerarası matriksi sentezler ve kolesterol biriktirerek

köpük hücrelerine dönüşebilirler. Ayrıca büyüme faktörleri ve sitokinler üretebilirler.

- **Kan hücreleri:** Monositler, dolaşımdan arter duvarına girerek burada makrofajlara dönüşür. Makrofajlar kolesterol biriktiren başlıca hücre tipidir ve büyüme faktörleri ile sitokinler üretirler. Lenfositler de arter duvarına girerek düz kas hücresi gelişimini ve makrofaj fonksiyonlarını düzenleyen çeşitli faktörler üretir.
- **Matriks:** Arter duvarındaki hücrelere destek olan temel yapıdır. Kollajen, elastin ve proteoglikan içerir. Aterosklerozun başlamasında, kolesterolden zengin lipoproteinlerin matriksin bazı bileşenlerine bağlanması önemli bir etkidir.

2.4.2.3 Koroner Aterosklerozun Patolojisi

Koroner aterosklerozun gelişimi uzun süren bir süreçtir ve üç evreye ayrılabilir:

- **Yağ birikintileri:** Arter iç yüzeyinde gözlenen sarımsı düz yapılardır ve aterosklerozun öncülü kabul edilir. Bu evrede monositler endotelyuma yapışır ve intima'ya göç eder. Burada makrofajlara dönüşerek kolesterol biriktirip köpük hücrelerini oluştururlar. Lipid yüklü makrofajlar ve bazı düz kas hücreleri ile birlikte “yağ birikintileri” meydana gelir.
- **Proliferatif lezyon:** Bu evrede daha fazla lipid yüklü makrofaj birikir. Düz kas hücreleri mediadan intima'ya göç eder ve çoğalmaya başlar. Hücre içi lipid biriktirir ve matriks sentezler. Endotel, düz kas hücreleri ve makrofajlardan salınan mediatörlerle dinamik bir hücresel etkileşim gelişir. Arter lümeninin daralması bu evrede başlar.

- **Aterom (kompleks lezyon):** Kolesterol; makrofaj, düz kas hücresi ve ekstrasellüler matrikste birikmeye devam eder. Bu lipitler toksik etkilerle hücre ölümüne neden olur. Hücre artıkları yeni makrofajları bölgeye çeker. Bu kısır döngü lezyonun genişlemesine yol açar. Endotel kaybı ve hücre artıklarının dolaşıma açık hale gelmesi lezyonun ülserleşmesine, trombosit adezyonu ve fibrin birikimiyle trombüs oluşumuna neden olur. Komplike lezyonlarda kalsifikasyon, hemoraji, ülserasyon, rüptür ve trombüs gelişebilir. Trombüsten kopan bir parça (emboli) uzak bir damarı tıkararak miyokard infarktüsüne neden olabilir.

Semptomlar genellikle 2. ve 3. evrelerde ortaya çıkar.

2.4.2.4 Aterosklerozun Patogenezinin İlişkin Hipotezleri

Zedelenmeye Yanıt Hipotezi

En çok kabul gören bu hipoteze göre aterogenez, doku hasarına karşı gelişen inflamatuvar bir yanıtı taklit eder. Arterin cevabı, lipid birikimini sınırlamak ve kontrol etmektir. Bu yanıt yeterince kontrol edilemezse klinik hastalık ortaya çıkar.

Başlıca mekanizmalar şunlardır:

1. Makrofajların Rolü ve Diğer İnflamatuvar Mekanizmalar:

- o Monositlerin endotele yapışmasını artıran etkenler:
 - Okside LDL
 - Matriks protein fragmanları
 - Endotel kaynaklı inflamatuvar sitokinler (MCP-1, M-CSF)

- o Makrofajlar okside LDL'yi reseptör aracılığıyla alır.
- o Salgıladıkları başlıca bileşikler:
 - IL-1, TNF- α
 - Süperoksit anyonu gibi toksik oksijen ürünleri
 - PDGF (düz kas proliferasyonu ve matriks üretimini uyarır)

2. Düz Kas Hücrelerinin Proliferasyonu:

- o Mediadaki düz kas hücreleri, makrofajlar ve endotel kaynaklı mitojenler (PDGF, IL-1, TGF- α) ile intimaya göç eder.
- o Hücreler kolesterol ve esterlerini alarak köpük hücre oluşumuna katkıda bulunur.

3. Hiperlipideminin Rolü:

- o Yüksek LDL düzeyi, endotelde permeabilityi artırarak lipoproteinlerin intimaya geçişini kolaylaştırır.
- o LDL, VLDL kalıntıları ve IDL subendotelyal alanda tutulur ve modifiye edilerek makrofajlar tarafından alınır.
- o Okside LDL'nin etkileri:
 - Monosit göçünü artırır
 - Monositin makrofaja dönüşümü uyarır
 - Makrofajların hapsolmasına neden olur
 - Hücrelere toksik etki yapar

4. Trombozun Rolü:

- o Tromboz, geç dönem aterosklerozun komplikasyonudur.
- o Fibrinojen, antitrombin III, PAI-1, Lp(a), antifosfolipid antikolar gibi hemostatik faktörler aterosklerozla ilişkilidir.
- o Fibrinojen hem trombozun öncülüdür hem de kanın viskozitesini artırarak akımı bozar.

Monoklonal Hipotez

Bu hipotez, lezyondaki tüm hücrelerin tek bir düz kas hücresinden köken aldığına dayanır. Bu hücrenin virüsler, toksinler veya mutajenler tarafından transformasyona uğramış olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu hipotezi destekleyen yeterli kanıt bulunmamaktadır.

2.5 SERBEST RADİKALLER VE LİPİD PEROKSİDASYONU

2.5.1 Serbest Radikal Kavramı

Atom yapısı, pozitif yüklü protonlar ve yüksüz nötronlardan oluşmuş bir çekirdek ile çevresinde bulunan negatif yüklü elektronlardan meydana gelir. Birçok molekülün en dış orbitalinde bulunan ve ters spinli elektron çifti, moleküle kararlı bir konfigürasyon kazandırarak, diğer bileşiklerle değerlik ve kovalent bağ kurallarına uygun şekilde reaksiyonlara girmesini sağlar.

Serbest radikaller, “bir veya daha fazla eşleşmemiş (tek sayıda) elektron içeren, yüksek reaktiviteye sahip ve bu nedenle diğer moleküllerle hızla reaksiyona girme eğiliminde olan kısa ömürlü kimyasal türlerdir.” Aerobik

canlılar için yaşamsal öneme sahip oksijenin toksik etki gösterebilme nedeni, eşleşmemiş elektronlarıyla diradikal özelliğe sahip olmasıdır. Bu nedenle, iki orbitalinde eşleşmemiş elektron bulunan moleküler oksijene elektronların tek tek eklenmesiyle reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur.

Fizyolojik süreçler sırasında organizmada farklı miktarlarda reaktif oksijen türleri ve serbest radikaller açığa çıkar. Bunların kaynakları endojen ve eksojen olarak iki grupta incelenebilir.

2.5.1.1 Endojen Kaynaklar

- Mitokondriyal ve endoplazmik retikulumdaki elektron transport zinciri (ETZ)
- Nötrofil fagositoz sistemi (NADPH oksidaz)
- Ksantin oksidaz enzim sistemi
- Arakidonik asit metabolizması
- Enzimatik olmayan oksidatif reaksiyonlar (tiyol bileşikler, kinonlar, flavinler gibi biyolojik moleküllerin moleküler oksijenle reaksiyonu)

2.5.1.2 Eksojen Kaynaklar

- İyonizan radyasyon
- Sigara dumanı
- Hava kirliliği
- Ksenobiyotikler
- Kemoterapötikler
- Hepatotoksik maddeler

2.5.2 Lipid Peroksidasyonu

Endojen ve eksojen kökenli radikallerin etkisiyle, plazma ve organel zarları, vasküler hücre membranları gibi pek çok yapıda lipid peroksidasyonu başlar. Radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizmasıyla ilerleyen bu süreç, doymamış yağ asitlerinin zincirlerinde yeniden düzenlemeye yol açar. Lipid peroksidasyonu üç aşamadan oluşur:

- Başlangıç (Initiation)
- İlerleme (Propagation)
- Sonlanma (Termination)

2.5.2.1 Oksidasyon ve Tetikleyici Mekanizmalar

LDL ve VLDL'nin oksidasyonu genellikle arter duvarında antioksidanların sınırlı olduğu intima tabakasında gerçekleşir. Bu oksidasyonu tetikleyen başlıca mekanizmalar şunlardır:

- En iyi bilinen yol, aktif makrofajlardan salınan membrana bağlı NADPH oksidazdır.
- Lipooksijenaz enzimi, doymamış yağ asitlerini hidroperoksitlere dönüştürerek oksidasyonu başlatır.
- Myeloperoksidaz enzimi, aktive fagositlerden salınarak oksidasyonda katalizör görevi görür.
- Peroksinitrit ve nitrik oksit, endotel hücrelerinden ve makrofajlardan salınarak sürece katkıda bulunur.

LDL, arter duvarındaki endotel hücreleri, düz kas hücreleri veya makrofajlarla inkübe edildiğinde okside olabilir. Ayrıca in vitro koşullarda Cu^{2+} gibi ağır metallerle oksidasyonu da sağlanabilir. İnkübasyon süresi uzadıkça,

LDL büyük ölçüde yapısal değişikliğe uğrayarak makrofajlar tarafından kolayca alınabilen forma dönüşür.

Özellikle poli-doymamış yağ asitleri, örneğin linoleat (C18:2), oksidasyona oldukça duyarlıdır. Bu süreçte keton, aldehit ve alkol gibi reaktif yağ asidi türevleri oluşur. Bu reaktif bileşikler, LDL'nin Apo B proteininde yer alan lizin kalıntılarıyla kovalent bağ oluşturarak yapıyı modifiye eder ve asetil-LDL reseptörü tarafından tanınır hale getirir.

LDL'nin in vivo oksidasyonunda 15-lipoksijenaz enziminin makrofajlardan salındığı düşünülmektedir.

2.5.2.2 LDL Oksidasyonu ve Ateroskleroz Gelişim Mekanizması

Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), laboratuvarda asetilasyon, asetoasetilasyon gibi kimyasal işlemlerle modifiye edilebilir. Bu değişiklikler, Apo B üzerindeki lizin kalıntıları ile kovalent bağ oluşturarak LDL'nin klasik reseptörüyle etkileşmesini engeller. Ancak, bu değişim, asetil-LDL reseptörü olarak bilinen “scavenger” (avcı) reseptörler aracılığıyla makrofajlar tarafından alınmasını kolaylaştırır.

Asetil-LDL Reseptörü (Scavenger Receptor): Makrofajlarda yer alır ve 220 kDa'lık bir trimer yapıdadır. Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki formu tanımlanmıştır. Kollajen benzeri bölgede yer alan lizin kalıntılarının değişmesi, modifiye lipoproteinlerin bağlanmasında kritik rol oynar. LDL'nin in vitro oluşturulan modifiye formları, in vivo karşılıklarını temsil edebilir.

2.5.2.3 LDL/VLDL Oksidasyonu Ölçüm Yöntemleri

Modifiye LDL'nin ateroskleroz gelişiminde önemli bir role sahip olması nedeniyle, LDL'nin oksidatif modifikasyonunun değerlendirilmesi ve antioksidan kapasitenin ölçülmesi büyük önem taşır.

Bu amaçla kullanılan in vitro yöntemler:

- TBARS artışı
- Toplam lipid hidroperoksit ölçümü
- Hidroksi ve hidroperoksi yağ asitleri tayini
- Konjuge dien ölçümü
- Oksisterol ölçümleri
- Aldehit tayini
- Endojen antioksidan düzeyleri
- Poli-doymamış yağ asitleri tayini
- Oksijen tüketimi ölçümü
- Apo B proteinindeki oksidatif değişikliklerin takibi
- LDL partikül yüzey yük ölçümü
- Apo B'deki modifikasyonların ELISA gibi immüno-lojik yöntemlerle tayini
- Lipid-protein etkileşimlerinin izlenmesi

2.5.2.4 Konjuge Dien (CD) Yöntemi ile Oksidasyon Kinetiği

LDL oksidasyonunun in vitro takibinde en sık kullanılan iki yöntem TBARS ve konjuge dien düzeylerinin ölçümüdür. Konjuge dien ölçümü, uygulama kolaylığı ve hızı nedeniyle yaygın tercih edilmektedir.

Yöntem, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu UV 234 nm’de zamana bağlı olarak izler. Oksidasyon genellikle Cu^{2+} ile indüklenir. Albümin, yapısındaki bağlayıcı bölgeler aracılığıyla Cu^{2+} ’yi bağlar; bu nedenle oksidasyon için kullanılan Cu^{2+} miktarı kritik önemdedir.

Konjuge dien eğrisi üç fazdan oluşur:

1. **Lag Fazı:** Antioksidanların koruyucu etkisiyle minimal oksidasyon gerçekleşir. Süresi, kullanılan Cu^{2+} miktarı, LDL’deki yağ asidi içeriği, örnek ısısı, albümin ve SH gruplarına bağlıdır.
2. **İlerleme Fazı:** Antioksidanlar tükendikten sonra lipid peroksidasyonu hızla artar. Konjuge dien üretiminin maksimum olduğu bu fazda LDL’deki yağ asitlerinin %70-80’i oksidasyona uğrar.
3. **Sonlanma Fazı:** Oksidasyonun azaldığı ve sonlandığı fazdır. Karbon bağları yıkıma uğrar, fakat aldehit yapıdaki ürünler daha fazla üretilmez.

2.6 ANTİOKSİDAN MEKANİZMALAR

Normal metabolik reaksiyonlar sırasında oluşan serbest radikallerin neden olabileceği doku hasarından korunmak için tüm aerobik organizmalar antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Antioksidanlar, okside edilebilir substratlara göre çok düşük konsantrasyonlarda bile substratların oksidasyonunu geciktiren veya engelleyen maddelerdir. Fizyolojik koşullarda oksidan ve antioksidan mekanizmalar bir denge halindedir (26).

Antioksidanların, oksidatif sürecin farklı aşamalarında çeşitli mekanizmalarla etkili olduğu öne sürülmektedir. Bu mekanizmalar aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

- Lokal O₂ konsantrasyonunu azaltmak
- O₂, •OH gibi radikalleri ortadan kaldırmak
- Katalitik metal iyonlarını bağlayarak radikal oluşumunu engellemek
- Peroksitleri parçalayarak zincir reaksiyonu başlatan radikallere dönüşümünü engellemek
- Başlamış olan radikal zincir reaksiyonunu kırmak
- Singlet oksijeni yakalayarak etkisiz hale getirmek

İlk iki mekanizmada etkili olan bileşikler, birincil savunma hattını oluşturur. Enzim yapısındadırlar ve bu nedenle görevlerini tamamladıktan sonra yapıları bozulmadan ortamda kalırlar. Diğerleri ise ikincil savunma hattını oluşturur ve görevleri sırasında tüketilirler. Antioksidanlar, işlevlerine, yapılarına ve hidrofilik/hidrofobik özelliklerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Ancak iskemi-reperfüzyon sürecinde serbest radikaller öncelikle oksijenin metabolize olduğu hücre içinde olduğundan, antioksidanlar genellikle hücrel yerleşimlerine göre sınıflandırılır.

2.6.1 İNTRASELLÜLER ANTİOKSİDANLAR

Hücreler, normal koşullarda oksidatif hasara karşı koruyucu yanıt geliştirir. Oksijen hücre içinde metabolize edilirken, ortaya çıkan indirgenmiş oksijen metabolitleri hızlı ve spesifik olarak enzimatik antioksidanlara maruz kalır. Birincil savunma hattını oluşturan antioksidan enzimlerin büyük çoğunluğu intrasellüler yerleşimlidir. Moleküler oksijenden türeyen reaktif radikal türlerinin oluşumunu ve yayılımını doğrudan engelleyen bu enzimlerin fonksiyonları, aktif bölgelerinde yer alan Mn, Cu, Zn ve Se gibi iz elementler sayesinde gerçekleşir.

Enzimatik savunma genellikle birkaç enzimin birlikte çalışmasıyla sağlanır.

Süperoksit Dismutaz (SOD): İlk olarak 1969 yılında tanımlanmıştır. Memelilerde %90 oranında intrasellüler, %10 oranında ekstrasellüler yerleşimlidir. Hücre içinde iki formda bulunur:

- Cu/Zn-SOD (sitozolik)
- Mn-SOD (mitokondriyal)

Her iki form da normalde yavaş ilerleyen $O_2^{\bullet-}$ 'in dismutasyonunu hızlandırarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijen oluşumunu sağlar. Çinko, enzimin katalitik aktivitesine katılmaz ancak yapısal kararlılığını destekler.

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px): Molekül ağırlığı 76.000–100.000 Dalton arasında değişen bir selenoenzimdir. Her molekülü yaklaşık 4 selenyum atomu içerir. GSH-Px, indirgenmiş glutasyonu (GSH) okside glutasyon (GSSG)'a dönüştürerek H_2O_2 'yi ortamdan uzaklaştırır. GSSG, glutasyon redüktaz aracılığıyla tekrar GSH'ye çevrilir. Başlangıçta yalnızca H_2O_2 'yi etkisizleştirdiği düşünülse de 1968 yılında lipid hidroperoksitlerin indirgenmesinde de rol oynadığı gösterilmiştir.

Katalaz: Hücre içinde oluşan veya SOD tarafından oluşturulan H_2O_2 'yi su ve oksijene dönüştürür: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Katalaz, dört alt birimli bir enzim olup her alt birimde bir hem grubu (Fe^{2+}) bulunur. Her aktif bölge, bir molekül NADPH ile stabilize edilmiştir.

2.6.2 MEMBRANA YERLEŞİKLİ ANTİOKSİDANLAR

İntrasellüler enzimlerin oluşturduğu birincil savunma hattını aşabilen reaktif oksijen türleri, membran düzeyindeki ikincil antioksidan savunma sistemi ile etkisiz hale getirilir. Membranların lipofilik ortamında oluşan radikallerin temizlenmesi, farklı tipte lipofilik antioksidanlar gerektirir. Bu grup şu şekilde sıralanabilir:

- Vitamin E (α -tokoferol)
- β -Karoten
- Koenzim Q
- Membran yapısal organizasyonu

Vitamin E, yağda çözünen güçlü bir antioksidandır. LDL partikül yapısında en baskın lipid çözünür antioksidandır. β -Karoten ise özellikle singlet oksijenin etkisini baskılayarak koruyucu etki gösterir. Membran stabilitesi, fosfolipid/kolesterol oranı ve yağ içeriği ile doğrudan ilişkilidir (21,22,26).

2.6.3 EKSTRASELLÜLER ANTİOKSİDANLAR

Ekstrasellüler sıvılar, genellikle enzimatik antioksidan içermez. Ancak SOD ve GSH-Px'in ekstrasellüler izoformları bulunur. Vücut, ekstrasellüler ortamda oluşabilecek H_2O_2 , süperoksit gibi reaktif türlerin zararlı etkilerini çeşitli proteinler aracılığıyla sınırlandırır:

- Transferrin
- Laktoferrin
- Haptoglobin
- Hemopeksin

- Albumin
- Seruloplazmin
- Bilirubin
- Glukoz
- Ürat

Bu proteinlerin çoğu metal iyonlarını bağlayarak lipid peroksidasyonunu önler. Örneğin:

- **Haptogloblin, hemopeksin:** Hemoglobini ve hem demirini bağlar
- **Seruloplazmin:** Bakır bağlayan, ferrokسيداز aktivitesi olan bir plazma proteindir. Bu özellikleriyle demirin ferrik forma dönüşmesini katalize eder ve serbest radikal oluşumunu azaltır.

Plazmada bulunan düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar arasında ürik asit, askorbik asit, bilirubin ve tiyol grupları öne çıkar.

2.6.4 E VİTAMİNİ

İzopren türevi, lipofilik ve yağda çözünebilen bir vitamindir. Vücutta sentezlenemez; diyetle alınır. En fazla α -tokoferol (α -TOH) formu biyolojik olarak aktiftir. Lipoproteinler (özellikle LDL) ve özel taşıyıcı proteinler yardımıyla taşınır. En çok bitkisel yağlarda, karaciğer ve yumurtada bulunur. Yağ emilim bozuklukları E vitamini eksikliğine yol açabilir.

E vitamini antioksidan mekanizması: Lipid peroksil radikallerinin ($\text{LOO}\bullet$) zincir reaksiyonlarını durdurarak α -tokoferoksil radikaline ($\alpha\text{-TO}\bullet$) dönüştür. Bu radikal daha sonra başka radikallerle birleşerek non-

radikal ürünlerin oluşmasına neden olur. Görevini tamamladıktan sonra glukuronik asit ile konjuge edilerek safraya atılır. Tekrar kullanılamaz, bu nedenle dışarıdan alınması gerekir.

Bazı çalışmalarda yüksek oksidan/LDL oranında α -TOH'un peroksidasyon başlatıcı olabileceği belirtilmiştir. Ancak Esterbauer ve arkadaşları, E vitamini kullanımında lipid peroksidasyonunun en düşük seviyede gerçekleştiğini göstermiştir (23,27,28).

2.8 HOMOSİSTEİN

Homosistein, esansiyel bir aminoasit olan metiyoninin metabolik bir ürünüdür. Metiyonin, öncelikle protein sentezinde kullanılır ve sistein sentezi için gerekli kükürt kaynağını sağlar. Vücuttaki en önemli metil vericisi olan metiyonin, besinlerle alındıktan sonra ATP kullanılarak S-adenozilmetiyonin (SAM)'e dönüşür. SAM yapısındaki metil grubu, özel metil transferazlar aracılığıyla uygun alıcılara aktarılırken, homosistein ve adenezine hidroliz olan S-adenozilhomosistein meydana gelir. Homosistein, kolinin oksidasyonu sonucu oluşan betain gibi bileşiklerden metil grubu alarak tekrar metiyonine dönüşebilir.

Kanda toplam homosisteinin %70-75'i albümine bağlı olarak bulunur. Homosistein metabolizmasında B6, B12 ve folat gibi vitaminler rol oynar (6,7,8). Folat ve B12 varlığında homosistein remetile olarak metiyonin üretimine (rejenerasyon) katkı sağlar. Homosisteinden sistein oluşumu için ise serin ve B6 vitamini gereklidir (transülfürasyon). Homosistein düzeyleri genetik ve nutrisyonel faktörlerle açıklanabilir. Normalde idrarda bulunmaz. Ancak üç farklı enzimatik

basamaktaki defektler homosistinemi ve homosistinüriye neden olabilir. Homosistein metabolizmasında görevli vitaminlerin (B6, B12, folik asit) eksiklikleri de hiperhomosisteinemi ile ilişkilidir. Bu durum genellikle çocukluk çağında kalıtsal metabolik hastalıkların bir belirtisi olarak ortaya çıkar.

Hiperhomosisteinemi üç tipe ayrılmıştır:

- **Tip I (Klasik homosistinemi):** Enzim eksikliği otozomal resesif geçişlidir. Göz bulguları ön plandadır. Ayrıca zeka geriliği, kemik deformiteleri ve tromboembolik olaylar görülebilir.
- **Tip II homosistinemi:** 5-metiltetrahidrofolat metiltansferaz enziminin kofaktörü olan B12 vitamininin eksikliği sonucu oluşur. Bu enzim homosisteinin tekrar metiyonine dönüşümünü katalizlediği için eksikliği durumunda homosistinemi gelişir.
- **Tip III homosistinemi:** 5-metiltetrahidrofolat'ın yapımı için gerekli olan 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzim eksikliğiyle ilişkilidir. Konjenital enzim eksikliklerine ek olarak, bu enzimlerin aktivitesi için gerekli olan B6 ve B12 eksiklikleri de erişkinlerde homosistein artışına neden olabilir.

2.8.1 HOMOSİSTEİN VE ATEROSKLEROZ

Hiperhomosisteinemi, vasküler hastalıklar için bağımsız bir risk faktörüdür. Ateroskleroza neden olan homosistein artışının mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olsa da, yüksek homosistein düzeylerinin oksidatif stres aracılığıyla endotelial disfonksiyona yol açtığı ve bunun da ateroskleroz sürecini başlattığı düşünülmektedir. Homosistein; trombosit fonksiyonları ve koagülasyon faktörlerini etkileyerek endotelial hasara

neden olabilir. Yapılan in vitro çalışmalar, homosisteinin endotel yanıtını nitrik oksidin antikoagülan, antiplatelet ve vazodilatör etkisini baskılayarak ortaya çıkardığını göstermektedir (6,8,9).

2.8.2 TOTAL HOMOSİSTEİN ÖLÇÜMÜ

Aterosklerozda ve B12, folat eksikliklerinde total homosistein ölçümü önemli bir biyokimyasal parametredir. Bu ölçüm, sadece tanı koymak amacıyla değil, hastalığın takibi açısından da önem taşır. Genellikle total homosistein düzeyi tercih edilir. Bunun nedeni, homosisteinin yaklaşık %75'inin albümine bağlı olmasıdır. Serbest formu ise, oda sıcaklığında birkaç saat veya -20°C'de bir hafta beklediğinde albümine bağlanarak homosistein düzeylerinde değişikliğe yol açar.

Kan alındıktan sonra, kan hücreleri plazmaya homosistein salmaya devam eder ve bu da her saat %10'luk yalancı artışa neden olur. Bu nedenle kan alındıktan hemen sonra buzda soğutulmalı ve 1 saat içinde plazmadan ayrılmalıdır. Ayrıca, plazmaya 4 g/L sodyum florür eklenirse, kan hücrelerinden homosistein salınımı engellenebilir (9,10).

Ölçümde aminoasit kromatografisi, HPLC, gaz kromatografisi gibi çeşitli yöntemler kullanılabilir. En yaygın yöntem HPLC olmakla birlikte, son yıllarda floresan polarizasyon immünoanalizi (FPIA) gibi ön işlem gerektirmeyen, avantajlı teknikler de yaygınlaşmaktadır. Homosistein düzeyleri yaşla birlikte değişiklik gösterebilir.

- **70 yaş altı bireylerde:** 5–15 $\mu\text{mol/L}$
- **70 yaş üstü bireylerde:** 5–20 $\mu\text{mol/L}$ normal kabul edilmektedir (29,30).

3.3 OLGU SEÇİMİ

Çalışmada üç grup tanımlanmıştır:

1. **Babalar Grubu (n=20):** Dokuz Eylül Üniversitesi Kardiyoloji Kliniği'nde koroner anjiyografi sırasında iki ve/veya daha fazla damarda %50'den fazla tıkanıklık saptanmış, yaşı 40–55 arasında değişen bireylerden oluşturulmuştur.
2. **Oğullar Grubu (n=20):** İlk gruptaki hastaların 18–35 yaş arası birinci derece erkek akrabaları (oğulları veya erkek kardeşleri) bu grubu oluşturmuştur.
3. **Kontrol Grubu (n=18):** 18–35 yaş arası sağlıklı erkekler arasından seçilmiştir.

Tüm gruplarda; diyabet, hipertansiyon, hiperlipidemi, kronik böbrek yetmezliği gibi hastalıkları olan bireyler; sigara içenler; antioksidan veya lipid düşürücü ilaç kullananlar çalışma dışı bırakılmıştır.

3.4 KİMYASAL ANALİZLER

3.4.1 LDL'nin Oksidasyona Duyarlılığının Ölçülmesi

3.4.1.1 Kan Örneklerinin Alınması

- Hastalardan 12 saatlik açlık sonrası venöz yolla alınan kan örnekleri, final konsantrasyonu 5 mmol/L olacak şekilde EDTA içeren cam tüplere 5 mL olarak eklendi. (EDTA hem antioksidan hem de antikoagülan olarak kullanıldı.)
- Örnekler, 800 x g'de ve +4 °C'de 15 dakika santrifüj edilerek çalışma materyali olan plazma elde edildi ve aynı gün analiz edildi.

3.4.1.2 VLDL ve LDL'nin Çöktürülmesi

Apo B içeren lipoproteinleri izole etmek için klasik bir yöntem uygulandı (25):

- 500 μ L plazma üzerine, 45 g/L sodyum fosfotungstat (pH 7.6) çözeltisinden 50 μ L ve 2 mol/L $MgCl_2$ çözeltisinden 12.5 μ L eklendi, ardından karışım vortexlendi.
- Örnekler 2000 x g'de 15 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı ve çökelek üç kez distile su ile yıkandı.
- Son santrifüj sonrası Apo B taşıyan lipoproteinleri içeren çökelek, 37 °C'de 1 mL 10 mmol/L sodyum fosfat ve 1 mol/L NaCl içeren tampon (pH 7.4) ile çözüldü.
- Elde edilen 1 mL hacmindeki çözelti, Apo B taşıyan lipoproteinleri içeren çalışma örneği olarak kullanıldı.

3.4.1.3 LDL'nin Oksidasyona Duyarlılığının Konjuge Dien Ölçümü ile Saptanması

- Oksidasyon öncesinde örneklerde protein miktarı Lowry yöntemi ile ölçüldü ve protein konsantrasyonu 0.1 mg/mL olacak şekilde dilüe edildi (32).
- Spektrofotometrenin sıfır ayarı örnek körü ile yapıldı.
- 500 μ L örneğe, final konsantrasyonu 50 μ mol/L olacak şekilde $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ eklendi.
- Örneğin absorbans değişimi 234 nm dalga boyunda 200 dakika boyunca takip edildi.
- Her örnek için x-ekseninde zaman (dk), y-ekseninde absorbans olacak şekilde oksidasyon eğrisi çizildi. Eğri üzerinde lag faz, ilerleme fazı ve sonlanma fazı belirlendi.

3.4.1.4 Oksidasyon Fazlarının Belirlenmesi ve Oksidasyon Parametrelerinin Hesaplanması

Lag faz süresi: Oksidasyon eğrisinde başlangıç noktasından itibaren oksidasyonun ivme kazandığı noktaya kadar olan bölgedir. Bu sürenin belirlenmesi için başlangıçtan ivme noktasına kadar en çok noktadan geçen bir doğru çizilir (a).

İlerleme fazı: Oksidasyonun ivme kazandığı noktadan, eğrinin plato çizdiği noktaya kadar olan bölgedir. Bu bölgeye teğet bir doğru daha çizilir (b).

Sonlanma fazı: Eğrinin düzleştiği noktalar birleştirilerek sonlanma fazı belirlenir ve bir doğru (c) çizilir.

Maksimum oksidasyon oranı hesaplama: Maksimum oksidasyon oranı (μ mol/mg LDL protein\

$$\text{cdotpdk}) = \Delta \text{Abs} \Delta t \times 33.8 \div 0.1 \text{ \text{Maksimum oksidasyon oranı} } (\mu\text{mol/mg LDL protein}\cdot\text{dk}) \} = \frac{\Delta \text{Abs}}{\Delta t} \times 33.8 \div 0.1 \text{Maksimum oksidasyon oranı} (\mu\text{mol/mg LDL protein}\cdot\text{dk}) = \Delta t \Delta \text{Abs} \times 33.8 \div 0.1$$
 Burada:

- $\Delta \text{Abs} \Delta t$, b ve c doğrularının kesişim noktasındaki absorbans değeri ile a ve b doğrularının kesişim noktası arasındaki farkı temsil eder
- Δt , bu iki nokta arasındaki zaman farkıdır
- 0.1, kullanılan protein miktarını (mg) temsil eder

Maksimum konjuge dien (CD) konsantrasyonu hesaplama: Maksimum CD (nmol/mL) = Maksimum absorbans – İlk absorbans $\frac{\text{Maksimum absorbans} - \text{İlk absorbans}}{28000}$ Maksimum CD (nmol/mL) = 28000 Maksimum absorbans – İlk absorbans

Buradaki değerler, 500 μL örnek hacmine göre hesaplanarak nmol/mL cinsine çevrildi.

Kullanılan Reaktifler:

B Reaktifi: %10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS)

C Reaktifi: 1M NaOH Her biri 100 mL bidistile suda çözülerek hazırlanmıştır.

Çalışma çözeltisinin hazırlanışı:

- 3 hacim A reaktifi
- 1 hacim B reaktifi

- 1 hacim C reaktifi Karıştırılarak çalışma çözeltisi elde edilmiştir.

Folin-Ciocalteu Çözeltisi ve Protein Standartları

Folin çözeltisi:

- 2N Folin çözeltisinden 10 mL alınarak 100 mL'ye tamamlanmıştır.

Protein standartlarının hazırlanışı:

- Bovin serum albümini (BSA) ile 2 mg/mL konsantrasyonunda stok solüsyon hazırlandı. Bu stoktan şu konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlandı:
- 0.1 mg/mL
- 0.25 mg/mL
- 0.5 mg/mL
- 1.0 mg/mL
- 2.0 mg/mL

3.4.2 Protein Tayini

3.4.2.1 Prensibi

İki değerlikli bakırın alkali ortamda proteinlerle (özellikle aromatik aminoasitler olan tirozin ve triptofan) etkileşimi sonucu oluşan bakır-kompleksleri, Folin-Ciocalteu reaktifi içerisindeki fosfomolibdik ve fosfotungstik asitleri indirger. Bu indirgeme sonucunda heteropolimolibdenyum bileşiği meydana gelir ve mavi renkli bir kompleks oluşur. Oluşan rengin yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülerek protein miktarı tayin edilir (31,32).

3.4.2.2 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

A Reaktifi:

- 0.24 M Sodyum karbonat (Na_2CO_3)
- 1.6 mM Bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 0.7 mM Sodyum-potasyum tartarat

Bu üç kimyasal madde tartıldıktan sonra sırasıyla 260 mL, 20 mL ve 20 mL bidistile su ile çözülerek A reaktifi hazırlanır.

C Reaktifi:

- %10 sodyum dodesil sülfat (SDS)
- 1 M Sodyum hidroksit (NaOH)

Her biri 100 mL bidistile suda çözülerek ayrı ayrı hazırlanır. Daha sonra çalışma çözeltisi hazırlanmak üzere kullanılacaktır.

3.4.2.3 Çalışma Çözeltisinin Hazırlanışı

- 3 hacim A reaktifi
- 1 hacim B reaktifi
- 1 hacim C reaktifi karıştırılarak çalışma çözeltisi elde edilir.

3.4.2.4 Folin-Ciocalteu Çözeltisi

- 2N Folin çözeltisinden 10 mL alınarak 100 mL'ye tamamlanır.

3.4.2.5 Protein Standardının Hazırlanışı

Bovin serum albümini (BSA) kullanılarak 2 mg/mL konsantrasyonunda stok çözelti hazırlanır. Bu

stoktan aşğıdaki konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanır:

- 0.1 mg/mL
- 0.25 mg/mL
- 0.5 mg/mL
- 1.0 mg/mL
- 2.0 mg/mL

3.4.2.6 Uygulama Basamakları

- Örnek ve standart tüplere 20 μ L örnek veya standart çözeltilisi eklenir.
- Her tüpteki hacim bidistile su ile 800 μ L'ye tamamlanır.
- Ardından 800 μ L çalışma reaktifi eklenir ve 15 dakika bekletilir.
- Kör örnek de aynı şekilde hazırlanır.
- Her tüpe 200 μ L Folin reaktifi eklenir.
- Tüpler oda sıcaklığında 45 dakika bekletilir.
- Oluşan mavi rengin absorbansı 750 nm dalga boyunda, kör örneğe karşı spektrofotometrede okunur.
- Standart eğri yardımıyla örneklerin protein konsantrasyonları hesaplanır.
- Her bir örnek ve standart tüpe 20 μ L örnek eklendi.
- Hacim bidistile su ile 800 μ L'ye tamamlandı.
- Üzerine 800 μ L çalışma reaktifi eklendi ve 15 dakika bekletildi.
- Kör örnek de aynı şekilde hazırlandı.

- 200 μ L Folin reaktifi eklendi ve oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi.
- Oluşan rengin absorbansı, 750 nm dalga boyunda, kör örneğe karşı ölçüldü.
- Standart eğrisi yardımıyla örneklerin protein değerleri hesaplandı.

3.4.3 FPIA (Fluorescence Polarization Immunoassay)

Işık, elektriksel ve manyetik dalgalardan oluşur ve belirli bir düzlemde titreşim gösteren polarize ışık, bu yöntemin temelini oluşturur. FPIA tekniği, analit konsantrasyonunu iki temel teknoloji ile belirler:

1. Kompetitif protein bağlama
2. Floresan polarizasyon

3.4.3.1 FPIA Prensibi

- Ortamda, florofor ile işaretlenmiş ligand ve bu liganda karşı oluşmuş spesifik antikorlar bulunur.
- Antikorlar, hem işaretli hem de örnekteki işaretli analiti bağlayabilir.
- Örnekteki analit konsantrasyonu arttıkça, işaretli analitin antikora bağlanması azalır.
- Moleküller sıvı ortamda hareket eder ve bu hareket molekül büyüklüğüne bağlıdır. Serbest analit, kompleks olanlara göre daha hızlı döner.
- Polarize ışık sadece belirli düzlemde ilerler, bu nedenle ölçülebilir.

- Büyük moleküller (analit-antikor kompleksi), daha yavaş döndüğü için vertikal düzlemde ışık yayar ve dedektör tarafından ölçülür.

3.4.3.2 FPLA Reaktanları

- Analite spesifik antikorlar
- Floresan işaretli analit
- Hasta serumundaki işaretli analiz

3.4.3.3 FPLA Reaksiyon Süreci

- Örnekte yüksek analit konsantrasyonu varsa: Analit, antikora bağlanarak floresan işaretli analiti serbest bırakır.
- Düşük analit konsantrasyonunda, antikorlar esas olarak floresan işaretli analit ile bağlanır.

Polarize ışığın şiddetindeki değişim, örnekteki analit konsantrasyonu ile ters orantılıdır:

- Yüksek analit: Daha çok serbest floresan → daha az polarize ışık
- Düşük analit: Daha fazla kompleks → daha fazla polarize ışık

3.4.3.4 FPLA Optik Sistemi

- Işık kaynağı olarak tungsten halojen lamba kullanılır.
- Uyarma filtresi 485 nm (mavi ışık) seçer, bu floroforu uyarır.
- Florofor temel seviyeye dönerken 525–550 nm (yeşil ışık) yayar.
- Bu ışık, photomultiplier tüp ile ölçülür.

- Elde edilen polarizasyon değerleri, kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak örnek analit konsantrasyonu belirlenir.

3.4.3.5 Örneklerin Hazırlanışı

- FPIA yöntemi için K₃-EDTA içeren tüplere kan alındı.
- Örnekler santrifüj aşamasına kadar buzda saklandı.
- +4 °C'de, 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi.
- Plazma -70 °C'de analiz edilene kadar saklandı.
- Analizlerde Abbott 83-7772/R1 model cihaz kullanıldı.

3.4.4 HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

3.4.4.1 Kromatografi Tanımı

Kromatografi, bir karışımdaki iki veya daha fazla bileşeni, bu bileşenlerin birbirine karışmayan iki faz arasındaki farklı dağılımlarından yararlanarak ayırma yöntemidir (33).

Temel bileşenler:

- **Mobil faz (hareketli faz):** Analitin taşındığı çözücü ortam
- **Sabit faz (stasyoner faz):** Ayırmanın gerçekleştiği sabit kolon ortamı

3.4.4.2 Kromatografik Analizlerin Ayırım Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması

Kromatografi teknikleri, maddelerin ayırımında kullanılan temel mekanizmalara göre şu şekilde sınıflandırılır:

- İyon Değişim Kromatografisi (Ion-Exchange): Ayırma, bileşiklerin iyonik yüklerinin türüne (+/-) ve sayısına göre gerçekleşir.
- Sterik Dışlama Kromatografisi (Steric-Exclusion): Moleküllerin büyüklük farkına göre ayırma yapılır.
- Afinit Kromatografisi (Affinity): Spesifik biyokimyasal etkileşimlere (enzim-substrat, antijen-antikor, hormon-reseptör gibi) dayanır. Özellikle büyük moleküller ve proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır.
- Adsorpsiyon Kromatografisi: Moleküllerin katı destek materyali (adsorban) ile elektrostatik ve hidrojen bağı gibi etkileşimleri temel alınır.
- Partisyon Kromatografisi: Çözünen moleküllerin mobil ve sabit fazlar arasında farklı çözünürlüklerine dayalı bir ayırım sağlar.

3.4.4.3 Kromatografi Türlerine Göre Sınıflandırma

1. Planar (Yüzey) Kromatografisi:

- Kağıt kromatografisi
- İnce tabaka kromatografisi (TLC)

2. Kolon Kromatografisi:

- HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

3.4.4.4 HPLC Prensibi ve Kullanım Alanı

HPLC, özellikle büyük moleküllü bileşiklerin ayrımı ve kantitasyonunun sağlandığı, biyolojik örnek analizlerinde yaygın kullanılan, yüksek başarımlı bir tekniktir (33). “High Performance” (yüksek performans) ifadesi, cihaz ve kolon teknolojisindeki gelişmişliğe işaret eder. HPLC, yüksek hız ve hassasiyetle kompleks bileşiklerin ayrımını sağlayarak, diğer tekniklere göre üstün rezolüsyon sunar.

Farklı kolon materyalleri kullanılarak çeşitli kromatografik mekanizmalarla analiz yapılabilir. HPLC sisteminde analiz, sürekli akış halinde olan mobil fazın kolondaki sabit faz (stasyoner faz) ile etkileşimi üzerinden yürütülür.

HPLC Cihazının Bileşenleri

1. **Solvent Rezervuarı:** Mobil fazın bulunduğu cam kaptır.
2. **Pompa:** Mobil fazı rezervuardan alarak kolona ve dedektöre iletir. Gelişmiş pompalar, sabit ve pulsasyonsuz akış sağlayarak dedektör hassasiyetini artırır.
 - o **İzokratik Ayırım:** Mobil faz bileşimi sabittir.
 - o **Gradient Ayırımı:** Mobil faz bileşimi işlem süresince değişir. Birden fazla pompa ile sağlanır.
3. **Enjektör:** Örnek sisteme enjekte edilir. En sık kullanılan “loop” enjektörlerdir.
4. **Kolon:** Çelikten yapılmış analitik kolonlar kullanılır. Çapları genellikle 2–5 mm, uzunlukları 50–300

mm'dir. Kolonlar, mikropartikül boyutundaki silika bazlı dolgu materyalleri ile doldurulur.

5. **Dedektör:** Elüe olan bileşenleri tespit eder. En sık UV-Vis dedektörler kullanılır. Optik sinyaller voltaj değişimlerine dönüştürülerek kromatogram oluşturulur.

Kolon Teknolojisi ve Ayırım Mekanizması

Örnek enjektörle sisteme verildikten sonra mobil fazla birlikte kolondan geçirilir. Kolon içindeki sabit faza kimyasal olarak bağlanmış fonksiyonel gruplar ile örnek bileşenleri arasında hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşimleri ve elektrostatik kuvvetlerle ayırım sağlanır. Kolondan elüe olan bileşenler dedektör tarafından tespit edilir.

Dedektör Tipleri ve Özellikleri

- **UV-Vis Dedektör:** 190–750 nm aralığında çalışır. Protein, enzim (katalaz, üreaz, peroksidaz), hemoglobin, aminoasitler, fosfolipidler, steroid hormonlar ve bu çalışmada kullanılan tokoferol ile A vitamini tayininde uygundur.
- **Floresan Dedektör:** Örnek bileşeni, UV ışığını absorbe ettikten sonra emisyon yayar. Emisyon şiddeti photomultiplier tüp ile ölçülür. Optik dedektöre göre daha özgül ve seçicidir.
- **Refraktif İndeks Dedektörü:** Örnek ve referans hücreler arasındaki refraktif indeks farkını ölçer.
- **Elektrokimyasal Dedektör:** Redoks reaksiyonlarına dayalı ölçüm yapar.

Kromatografik Verilerin Değerlendirilmesi

- **Retansiyon Zamanı:** Örneğin enjeksiyonundan pik maksimumuna kadar geçen süredir.
- **Rezolüsyon:** Ayırma derecesi olarak tanımlanır. Retansiyon farklarının ortalama bant genişliğine oranı ile hesaplanır.
- **Kapasite Faktörü (k'):** Durağan fazdaki solüt kütlesinin, mobil fazdakine oranıdır. Optimal değer: 2–6
- **Selektivite Faktörü (α):** İki bileşenin kapasite faktörleri oranı ile belirlenir. Pik ayırımının göreceli ölçüsüdür.
- **Kolon Performansını Etkileyen Faktörler:**
 - o Dolgu materyalinin partikül çapı
 - o Mobil faz akış hızı
 - o Kolon sıcaklığı
 - o Solventin viskozitesi

Örnekler ve Analiz Özellikleri

Apo B içeren lipoproteinlerin yapısında bulunan E ve A vitamini konsantrasyonlarının analizinde HPLC yöntemi kullanılmıştır. Analizler Shimadzu LC-6A model HPLC cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Kullanılan analiz parametreleri ve koşullar aşağıdaki gibidir:

- **Mobil faz bileşimi:**
 - o %70 asetonitril
 - o %20 diklorometan

- o %10 metanol
- **Mobil faz akış hızı:**
 - o E vitamini için: **1 mL/dk**
 - o A vitamini için: **0.5 mL/dk**
- **Kolon özellikleri:**
 - o Uzunluk: 15 cm
 - o Çap: 4.6 mm
 - o Kolon tipi: C18
- **Dalga boyları:**
 - o α -tokoferol için: 291 nm
 - o β -karoten için: 325 nm
- **Standart çözeltiler:**
 - o A vitamini: 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$
 - o E vitamini: 0.875, 1.75, 3.5, 7.0 $\mu\text{mol/L}$

Ekstraksiyon Basamakları:

1. 200 μL örnek üzerine 200 μL etanol eklenip 5 saniye karıştırıldı.
2. Karışıma 500 μL n-heksan eklenip 2 dakika vortex ile karıştırıldı.
3. 3000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Süpernatın alındı ve yeni tüpe aktarıldı.

5. Azot gazı altında heksan uçuruldu ve çökelek elde edildi.
6. Çökelek içeren tüpe 200 μ L etanol eklenerek örnek çözüldü ve çalışma materyali hazırlandı.

3.4.5 Diğer Analizler

3.4.5.1 Triglisericid Ölçüm Yöntemi

Triglisericid tayini, Hitachi 747-200 (Boehringer Mannheim Co., Mannheim, Almanya) otoanalizörü ve Sigma (St.Louis, ABD) kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Triglisericidlerin lipoprotein lipaz ile gliserol ve yağ asidine dönüştürülmesini izleyen, gliserol kinaz, gliserol fosfat oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlarla ölçüm enzimatik olarak yapılmıştır.

3.4.5.2 Kolesterol Ölçüm Yöntemi

Toplam kolesterol tayini yine Hitachi 747-200 otoanalizöründe, Sigma kiti ile gerçekleştirilmiştir. Ölçüm; kolesterol esteraz, kolesterol oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlara dayalı enzimatik yöntemle yapılmıştır.

3.4.5.3 HDL-K Ölçüm Yöntemi

HDL kolesterol düzeyi, Beta-lipoprotein antikorları kullanılarak LDL kolesterol ve şilomikronlarla kompleks oluştuktan sonra süpernatanda kalan HDL kolesterolün belirlenmesiyle ölçülmüştür. Kolesterol esteraz (CHE), kolesterol oksidaz (CO) ve peroksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar kullanılmıştır. Ölçümler Hitachi 747-200 otoanalizöründe Sigma kiti ile yapılmıştır.

3.4.5.4 LDL-K Ölçüm Yöntemi

LDL kolesterol düzeyi **Friedewald formülü** ile hesaplanmıştır:

$$\text{LDL kolesterol} = \text{Toplam kolesterol} - (\text{HDL kolesterol}) - \frac{\text{Trigliserid}}{5}$$

3.4.5.5 Apo A1, Apo B, Lp(a) Ölçüm Yöntemi

Apolipoprotein A1, Apo B ve Lp(a) düzeyleri, Beckman Array Protein System (Beckman Instruments, Galway, İrlanda) nefelometrik analiz cihazı ve Beckman kitleri kullanılarak ölçülmüştür.

Nefelometrik Yöntemin Prensipleri

Süspansiyon ve emülsiyonlar, tek yönlü ışık kaynağından gelen ışın demetini dağıtır. Dağılım miktarı; koloidal taneciklerin konsantrasyonu, çapı ve molekül ağırlığı ile **doğru**, kullanılan dalga boyu ile **ters** orantılıdır. Dalga boyu azaldıkça saçılan ışık miktarı dördüncü kuvvetle artar.

Yüksek duyarlılığa sahip olan bu yöntemde, örnekteki partiküllerin saçtığı ışık miktarı, geliş eksenine dik olarak yerleştirilen fotosel yardımıyla ölçülür (34).

3.5 İstatistiksel Analizler

Seçilen gruplar arasında farklı istatistiksel testler uygulanmıştır:

- **Babalar ve oğullar grubu** arasında karşılaştırmalar için eşleştirilmiş örnekler t-testi (paired samples t-test),
- **Kontrol ve oğullar grubu** arasında karşılaştırmalar için bağımsız örneklem t-testi (independent samples t-test) uygulanmıştır.

Analizler, SPSS for MS Windows 6.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

Baba, Oğullar ve Kontrol Gruplarının Bulgularının Karşılaştırılması

Homosistein Değerlerinin Karşılaştırılması

Oğullar ve babaların homosistein düzeyleri karşılaştırıldığında, babaların homosistein düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p = 0.000$).

Oğullar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında ise homosistein düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.689$).

Lag Faz Sürelerinin Değerlendirilmesi

Babalar ve oğullar grubu arasında lag faz süreleri karşılaştırıldığında, oğulların lag faz süresinin daha uzun olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p = 0.005$).

Oğullar ve kontrol grubu arasındaki lag faz sürelerinde ise anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p = 0.145$).

Maksimum Oksidasyon Oranlarının Karşılaştırılması

Babalar ve oğullar grubu arasında dakikadaki maksimum oksidasyon oranları karşılaştırıldığında, babaların değerlerinin oğullardan anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür ($p = 0.026$). Oğulların maksimum oksidasyon değerleri, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında da oğullar lehine anlamlı yükseklik tespit edilmiştir ($p = 0.017$).

Maksimum CD Konsantrasyon Değerlerinin Karşılaştırılması

Babalar ve oğullar grubu arasında maksimum konjuge dien (CD) konsantrasyonları karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.607$).

Ancak, oğullar ve kontrol grubu arasında yapılan değerlendirmede, oğulların maksimum CD konsantrasyonlarının anlamlı şekilde yüksek olduğu belirlenmiştir ($p = 0.023$).

Gruplar Arası LDL E Vitamini İçeriğinin Karşılaştırılması

Babalar ve oğullar grubu arasında LDL E vitamini içerikleri karşılaştırıldığında, anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p = 0.618$).

Benzer şekilde, oğullar ve kontrol grubu arasında da LDL E vitamini içeriği açısından anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p = 0.244$).

Gruplar Arası LDL A Vitamini İçeriğinin Karşılaştırılması

Babalar ve oğullar grubu arasında LDL A vitamini içerikleri açısından yapılan karşılaştırmada, anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p = 0.500$).

Oğullar ile kontrol grubu arasında da anlamlı fark bulunmamıştır, ancak değerler sınırda anlamlılığa yaklaşmıştır ($p = 0.058$).

4. Tartışma ve Sonuç

Oksijen, yaşamsal öneme sahip bir molekül olmasına karşın, yapısında eşleşmemiş elektron taşıması nedeniyle diradikal özelliği gösterir. Bu özellik, bazıları serbest radikal niteliği taşıyan reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olmaktadır. Oluşan bu radikaller, hücre organellerinde lipid peroksidasyonuna yol açarak hücre sel yapılarında ve fonksiyonlarda bozulmalara neden olur. Organizmada hem endojen hem de eksojen kaynaklı olarak oluşan serbest radikallere karşı, çeşitli antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Fizyolojik koşullarda oksidan ve antioksidan sistemler arasında bir denge söz konusudur. Bu dengenin bozulması, özellikle koroner kalp hastalığına (KKH) neden olan ateroskleroz gibi kronik hastalıkların gelişimini kolaylaştırır. Aterosklerozun temel nedenlerinden biri, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu, radikal aracılı bir zincir reaksiyon mekanizmasıdır. Bu süreç, doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu ile üç temel aşamada (başlatma, ilerleme ve sonlanma) ilerler ve

sitotoksik bileşiklerin ortaya çıkmasına neden olur. Malondialdehit (MDA) gibi lipid peroksidasyon ürünleri biyolojik membranlarda yaygın hale geldiğinde, hücre bütünlüğü ve fonksiyonları bozulur (1). Serbest radikallerin bu etkisi LDL partikülleri üzerinde de gözlenir. LDL'nin yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, benzer şekilde oksidasyona uğrar. Okside LDL'nin ateroskleroz gelişiminde önemli rol oynadığı, hem klinik hem de deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (1,3,4).

Aterosklerozun erken evrelerinde, köpük hücre oluşumu ve yağlı çizgilerin gelişimi sürecine dair yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda ortak görüş birliğine ulaşılmıştır (26). Daniel Steinberg ve arkadaşları, bu süreçte meydana gelen olayları sırasıyla şu şekilde tanımlamışlardır: hücre büyümesi, ekstraselüler matriks değişiklikleri, hücre migrasyonu, hücre ölümü ve nekroz. Bu patolojik süreçler sonunda oluşan kompleks yapı, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleriyle çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımına neden olur. Bu olaylar zincirini tetikleyen temel unsur, native LDL'nin oksidatif modifikasyona uğramasıdır. Okside LDL, makrofajlarda bulunan spesifik reseptörlere (scavenger reseptörler) bağlanarak hücre içine alınır. Bu süreçte, hücre içi LDL, lizozomlarda parçalanarak serbest kolesterol formuna dönüşür ve kolesterol esteri halinde hücre içerisinde birikerek köpük hücre formasyonuna neden olur. Normal koşullarda, asetil-KoA asetil transferaz (ACAT) enzimi, kolesterolün esterleşerek hücrede depolanmasını sağlar. Patolojik durumlarda ise bu enzim, özellikle aterosklerotik lezyonlardaki makrofaj kökenli köpük hücrelerde kolesterol birikimini artırır. Yapılan immunokimyasal çalışmalar, insan aterosklerotik

lezyonlarında ACAT ekspresyonunun belirgin biçimde arttığını göstermiştir (8,13).

Makrofaj yüzeyinde okside LDL'yi tanıyan spesifik reseptörlerin varlığı gösterilmiş ve bu reseptörler “scavenger” ya da “asetil LDL reseptörleri” olarak adlandırılmıştır. Okside LDL'nin damar duvarında artması, kolesterol birikimini ve makrofaj infiltrasyonunu artırarak aterosklerotik süreçte belirgin bir ilerlemeye neden olmaktadır. Dolayısıyla LDL kolesterol ile köpük hücre oluşumu arasındaki ilişki netleşmiş; endotel ve makrofaj kaynaklı sitokinler ile bu sürecin hızlandığı ortaya konmuştur (35,36).

Steinberg ve arkadaşları, deneysel modellerde *in vivo* LDL oksidasyonuna dair üç temel kanıt öne sürmüşlerdir:

- Aterosklerotik lezyonlarda okside LDL varlığının gösterilmesi,
- İmmunohistokimyasal yöntemlerle okside LDL'ye karşı gelişen antikorların gösterilmesi,
- Dolaşımda okside LDL antikorlarının tespiti.

Bu *in vivo* ve *in vitro* veriler, aterosklerozun—ve dolayısıyla KKH'nin—oluşumuna ışık tutan önemli kanıtlardır (4,8,15,20).

American College of Cardiology, 1995 yılında gerçekleştirdiği toplantıda, yüksek riskli bireylerde kardiyovasküler risk düzeylerine göre tedavi planlamasına dayanan bir strateji oluşturmuştur. Bu kapsamda, değiştirilmesi mümkün olmayan risk faktörleri arasında yer alan erken yaşta KKH öyküsü bulunan bireyler, çalışmamızın hedef grubunu oluşturmuştur (16).

Ailevi kalp hastalığı öyküsü, 55 yaş altı baba veya birinci derece erkek akrabada, ya da 65 yaş altı anne veya birinci derece kadın akrabada miyokard enfarktüsü ya da ani kardiyak ölüm varlığı olarak tanımlanmıştır. Bu tanım doğrultusunda oluşturulan babalar grubu, koroner anjiyografi ile KKH tanısı almış bireylerden seçilmiştir. Oğullar grubu, bu hastaların birinci derece erkek akrabalarından oluşurken; kontrol grubu, oğullar grubu ile benzer yaş aralığındaki sağlıklı erkek bireylerden oluşturulmuştur (37).

Günümüze kadar koroner kalp hastalığı (KKH) olan hasta gruplarında LDL oksidasyonu ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar, farklı LDL oksidasyon ölçüm yöntemlerinin geliştirilmesine katkı sağlamıştır (8,15,20). LDL oksidasyonu sırasında lipoprotein partiküllerinin hücre dışı kompozisyonu sürekli değişim halindedir. Bu nedenle, oksidasyon sürecinin kinetiğini değerlendirmek için sürekli izlemeli (kinetik) ölçümler veya farklı zaman aralıklarında yapılan analizler gereklidir. Esterbauer ve arkadaşları, LDL oksidasyonunu değerlendiren in vitro yöntemler arasında konjuge dien (CD) ölçüm yönteminin, oksidasyona duyarlılığı yansıtmaya açısından in vivo koşullara en uygun ve uygulanması en pratik yöntem olduğunu belirtmiştir (23,25). CD oluşumu, oksidasyon sürecinin kinetik değişimlerini değerlendirmede ve antioksidanların koruyucu etkilerini belirlemede değerli bilgiler sunar.

Bu çalışmada, LDL'nin oksidasyona duyarlılığının değerlendirilmesi amacıyla apo B içeren lipoproteinler izole edilmiş; in vitro koşullarda bakır sülfat ($50 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4) ile inkübe edilerek konjuge dien oluşumu takip edilmiştir. Literatürde, apo B içeren lipoproteinlerle

yapılan çalışmaların saf LDL fraksiyonlarıyla karşılaştırıldığında, oksidasyon paternlerinin oldukça benzer olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, yöntem süresi ve laboratuvar koşullarına uygunluğu açısından bu yaklaşım tercih edilmiştir.

Çalışmamızda, LDL'nin oksidasyona duyarlılığını değerlendiren lag faz süresi, maksimum oksidasyon oranı ve maksimum CD konsantrasyonu parametreleri incelenmiştir. KKH olan bireylerde bu parametreler açısından farklı sonuçların elde edildiği çalışmalar mevcuttur. Bunun olası nedenleri arasında çalışma gruplarının heterojenliği ve yöntem farklılıkları sayılabilir.

Bu çalışmada babalar grubu ile oğullar grubu karşılaştırıldığında, babalarda lag faz süresi daha kısa, maksimum oksidasyon oranı daha yüksek bulunmuştur. Maksimum CD konsantrasyonu açısından ise anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu bulgular, yaş ortalaması yüksek ve belirgin koroner hastalığı bulunan babalar grubunda LDL'nin oksidasyona duyarlılığının arttığını göstermektedir. Erken yaşta miyokard infarktüsü geçirmiş 35 birey üzerinde yapılan bir çalışmada da benzer şekilde, koroner ateroskleroz derecesi ile lag faz süresi arasında ve yaş ile lag faz süresi arasında negatif korelasyon saptanmıştır. Ancak Karmansky ve arkadaşlarının çalışmasında, benzer hasta grubunda kontrol grubuna göre bu parametrelerde anlamlı fark bulunmamıştır (1). Bu çelişki, çalışma gruplarının heterojenliği, ilaç kullanımının kontrol edilmemesi ve metodolojik farklılıklarla açıklanabilir.

Çalışmamızda benzersiz olarak incelenen grup, erken yaşta KKH riski taşıyan bireylerin birinci derece

erkek akrabalarıdır. Oğullar grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, lag faz süreleri benzer, ancak maksimum oksidasyon oranı ve maksimum CD konsantrasyonu oğullarda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu durum, bu bireylerde LDL'nin oksidasyona karşı daha duyarlı olduğunu düşündürmektedir. Her iki grupta da LDL'nin E vitamini içeriği açısından anlamlı fark saptanmamıştır. Bu bulgu, E vitamininin LDL'deki konsantrasyonunun diğer yağda çözünen vitaminlere göre oldukça yüksek olmasından kaynaklanabilir (yaklaşık 6:1 oranında). E vitamini, A vitamini ve ubikinon ile birlikte lag fazın oluşumunda önemli rol oynar, radikalleri temizleyerek LDL'nin okside olmasını geciktirir. Ancak lag faz sonunda bu antioksidanlar tüketildiğinde, ilerleme fazı başlar ve LDL hızla okside olur (23,27,28).

The Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS) adlı geniş ölçekli bir çalışmada, anjiyografi ile KKH tanısı almış 2000'den fazla hastaya 400–800 IU/gün E vitamini verilmiş ve nonfatal miyokard infarktüsü oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Ancak bu çalışmada, LDL içerisindeki E vitamini düzeyinin koruyucu faktör olarak önemli olduğu, fakat tek başına yeterli olmadığı ve antioksidan etkinin bireyler arasında değişkenlik gösterebileceği vurgulanmıştır. 36 kişilik bir alt grupta, bazal LDL E vitamini düzeyleri ile lag faz süreleri arasındaki korelasyon katsayısı düşük ($r = 0.145$) bulunmuştur. Aynı bireylerde vitamin E replasmanından sonra bu korelasyon katsayısı $r = 0.51$ 'e yükselmiş, A vitamini ile birlikte verildiğinde $r = 0.60$ düzeyine ulaşmıştır (23).

Çalışmamızda oğullar ile kontrol grubu arasında LDL'nin E vitamini ve A vitamini içerikleri açısından

anlamlı fark bulunmamıştır. Bu, lag faz sürelerinin benzerliğini açıklayabilir. Ayrıca her iki grupta Apo B/LDL-K oranları da benzer bulunmuştur; bu da LDL partikül büyüklüğünün benzer olduğunu düşündürmektedir. Ancak, lag faz sonrası dönemde oğullar grubunda LDL daha hızlı okside olmakta ve CD düzeyleri kontrol grubuna göre belirgin şekilde daha yüksek saptanmaktadır.

LDL'nin oksidasyona duyarlılığını etkileyen faktörler hâlen netlik kazanmamıştır. Her ne kadar E vitamini LDL içindeki temel antioksidan olarak bilinse de, bazı çalışmalarda lag faz süresi ile E vitamini düzeyi arasında korelasyon gösterilememesi, başka biyokimyasal ve yapısal faktörlerin de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bunlar arasında:

- LDL'nin yağ asidi içeriği ve kompozisyonu,
- Apo B proteinindeki yapısal ve konformasyonel varyasyonlar,
- Apo B üzerindeki Cu^{2+} bağlayıcı alanların sayısı ve afinitesi gibi özellikler sayılabilir. Bu bağlayıcı bölgelerdeki genetik farklılıklar, LDL'nin oksidasyona yatkınlığını artırabilir.

Son yıllarda aterosklerozun gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olarak homosistein de yoğun şekilde araştırılmıştır. Homosisteinin, nitrik oksit ($\text{NO}\bullet$) yapısını bozarak arteriyel tonusun düzenlenmesini engellediği, antikoagülan ve antiplatelet etkileri azalttığı ve bu yolla endotel hasarına neden olduğu ileri sürülmektedir. Bu durum, trombosit agregasyonu ve damar duvarı bütünlüğünün bozulması ile sonuçlanır. Ayrıca homosistein düzeyindeki artışın yaşa bağlı

olarak da yükseldiği göz önünde bulundurularak, değerlendirmelerin yaş uyumlu yapılması gerektiği belirtilmektedir (5,7,19).

Çalışmamızda üç grup arasında plazma homosistein düzeyleri karşılaştırıldığında, babalar grubunda anlamlı şekilde yüksek düzeyler saptanmıştır. Oğullar ile kontrol grubu arasında ise anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durum, aterosklerotik süreçte ek olarak, homosistein düzeyindeki artışın yaşla ilişkili olabileceğini de göstermektedir (7,19).

Sonuç

Erken yaşta koroner kalp hastalığı öyküsü bulunan bireylerin oluşturduğu yüksek risk grubunda yapılan bu çalışmada; maksimum oksidasyon oranı ve maksimum konjuge dien konsantrasyonu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu bulgular, bu bireylerde LDL'nin oksidasyona karşı artmış duyarlılığına işaret etmektedir.

Bu bireyler, genel popülasyona göre daha yüksek KKH riski taşımaktadır. Bu nedenle, bu bireylerin erken yaşta taranması, yaşam tarzı değişiklikleri ve koruyucu önlemlerle izlenmesi; koroner arter hastalığının ilerlemesini yavaşlatabilir, hatta önlenebilir. Bu yaklaşım, hem birey sağlığı hem de sağlık sistemine olan ekonomik yükün azaltılması açısından önemlidir.

Kaynaklar

1. Karmansky I, Shnader H, Palant A, Gruener N. Plasma lipid oxidation susceptibility of low-density lipoproteins in male patients with stable coronary artery disease. *Clinical Biochemistry*. 1996;29:573–579.
2. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, et al. Atherosclerosis: basic mechanisms—oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation*. 1995;91:2488–2496.
3. Ahotupa M, Ruut M, Mäntylä E. Simple methods of quantifying oxidation products and antioxidant potential of low-density lipoproteins. *Clinical Biochemistry*. 1996;29:139–144.
4. Conner LA. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation*.
5. Bostom AG, Selhub J. Homocysteine and arteriosclerosis. *Circulation*. 1999;99:2361–2363.
6. Chambers JC, McGregor A, Jeff JM, Obeid OA, Kooner JS. Rapid-onset vascular endothelial dysfunction after hyperhomocysteinemia: an effect reversible with vitamin C therapy. *Circulation*. 1999;99:1156–1160.
7. Chao CL, Kuo TL, Lee YT. Effects of methionine-induced hyperhomocysteinemia on endothelium-dependent vasodilation and oxidative status in healthy adults. *Circulation*. 2000;10:485–490.

8. Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet*. 1994;344:793–796.
9. Keaney JF, Simon DI, Freedman JE. Vitamin E and vascular homeostasis: implications for atherosclerosis. *EASEB J*. 1999;13:965–976.
10. Lipoproteins and lipoprotein metabolism: a dynamic evaluation of the plasma fat transport. *Klin Wochenschr*. 1983;61(3):119–132. doi:10.1007/BF01486366.
11. Corvilain B. Lipoprotein metabolism. *Rev Med Brux*. 1997;18(1):3–9.
12. Mahley WR, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res*. 1984;25(12):1277–1294.
13. Miyazaki A, Sakasthita N, Lee O, Takahashi K, Horiuchi S, Hakamata H, et al. Expression of ACAT-1 protein in human atherosclerosis.
14. Salonen JT, Korpela H, Nyssönen K, Porkkala E, Tuomainen TP, Belcher JD, et al. Lowering of body iron stores by blood letting and oxidation resistance of serum lipoproteins: a randomized cross-over trial in male smokers. *Free Radic Biol Med*. 1995;237:161–168.
15. Clark IA. Tissue damage caused by free oxygen radicals. *Pathology*. 1986;18:181–186.
16. Austin MA, King MC, Vranizan KM. Atherogenic lipoprotein phenotype: a proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation*. 1990;82:495–506.
17. Anderson WAD, Scotti TM. Cardiovascular system. In: Anderson WAD, Scotti TM, eds. *Synopsis of Pathology*. 13th ed. 1986:330–333.
18. Mackness MI, Abbott C, Arrol S, Durrington PN. The role of high-density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Science*. 1986;232:34–47.

19. Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Knapp HR, Haynes WG. Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocysteinemia in humans. *Circulation*. 1999;100:1161–1168.
20. Kovanen PT. Atheroma formation: defective control in the intimal round-trip of cholesterol. *Eur Heart J*. 1996;238–246.
21. Mahley RW. Atherogenic hyperlipoproteinemia: the cellular and molecular biology of plasma lipoproteins altered by dietary fat and cholesterol.
22. Spranger T, Finch B, Fingerhut R, Kohlschütter A, Beisiegel U, Kontush A. How different constituents of human plasma and low-density lipoprotein determine plasma oxidizability by copper. *Chem Phys Lipids*. 1998;91:39–52.
23. Rotheneder M, Puhl H, Waeg G, Striegl G, Esterbauer H. Effect of oral supplementation with D- α -tocopherol on the vitamin E content of human low-density lipoproteins and resistance to oxidation. *J Lipid Res*. 1991;32:1325–1332.
24. Kontush A, Beisiegel U. Measurement of oxidizability of blood plasma. In: *Methods in Enzymology*. 1999;299:34–49.
25. Puhl H, Waeg G, Esterbauer H. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. In: *Methods in Enzymology*. 1994;233:425–442.
26. Liu WJ, Yi-Yi XZ, Lu-Yan L. Correlation between susceptibility of LDL subfractions to in vitro and in vivo oxidized LDL. *Clinical Biochemistry*. 2000;33:343–356.
27. Witting PK, Mohr D, Stocker R. Assessment of prooxidant activity of vitamin E in human low-density lipoprotein and plasma. *Methods in Enzymology*. 1999;299:362–377.

28. Kinlay S, Fang JC, Hikita H, Ho I, Delegrange DM, et al. Plasma α -tocopherol and coronary endothelium-dependent vasodilator function. *Circulation*. 1999;100:219–221.
29. Weber G. Rotational Brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions. *Adv Protein Chem*. 1953;8:415–459.
30. Dandliker WB, Saussure VA. Fluorescence polarization in immunochemistry. *Immunochemistry*. 1970;7:799–828.
31. Stoscheck CM. Quantitation of protein. In: Deutscher MP, ed. *Guide to Protein Purification*. Academic Press; 1990:50–68.
32. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193:265–275.
33. Ullman MD, Bowers LD, Burtis CA. Chromatography/mass spectrometry. In: Burtis CA, Ashwood ER, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia: WB Saunders Company; 1999:184–187.
34. Pesce AJ, Frings CS, Gauldie J. Spectral techniques: nephelometry and turbidity. In: Kaplan LA, Pesce AJ, Kazmierczak SC, eds. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*.
35. Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low-density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res*. 1983;24:1070–1076.
36. Salonen JT, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, Butler S, Korpela H, et al. Autoantibodies against oxidized LDL and progression of atherosclerosis. *Lancet*. 1992;339:883–887.
37. Regnström J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet*. 1992;339:1183–1186.

Erken Yaş Koroner Kalp Hastalığı Tanısı Olan Hastalarda LDL Oksidasyon Duyarlılık Tespiti ve Genetik Yatkınlık

Dr. Elife Özkan

Prof. Dr. Pınar Tuncel

 **ÖZGÜR**
YAYINLARI

