

TEŞEKKÜR

Çalıőmamın her anında bana destek olan, hoőgörsünü ve güler yüzünü hiç esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr. Ediz Demirpençe'ye, çalıőmamızı ortak yürüttüğümüz Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof.Dr.Lale Tokgözođlu'na, Dr. Ali Deniz'e, Dr. Bünyamin Yavuz'a, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'ndan Dr. Tuncay Hazırolan'a ve hep yanımda olduklarını bildiğim eőim ve aileme teőekkürü borç bilirim.

ÖZET

Düzgünçınar Ö. Plazma myeloperoksidaz düzeylerinin koroner arter hastalığı yaygınlığı ile ilişkisinin incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Uzmanlık Tezi. Ankara 2007. Nötrofillerden köken alan bir enzim olan myeloperoksidazın (MPO) ateroskleroz patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir. MPO bu etkisini apolipoproteinleri oksitleyip yüksek yoğunluklu lipoproteini (HDL) proaterojenik hale getirerek göstermektedir. Son yıllardaki çalışmalar, MPO'nun HDL'nin ana apolipoproteini olan Apo-A1'i nitratladığını ve bu olayın HDL'yi proaterojenik hale getirdiğini göstermiştir. MPO düzeyleri ile koroner arter hastalığı (KAH) gelişme riski arasında da bir korelasyon olabileceği önerilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, koroner anjiyografi ve koroner kalsiyum skorlaması ile belirlenmiş ateroskleroz yaygınlığı ile sistemik MPO düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelemektir. Koroner arterleri değişik derecelerde tıkalı olan 48 kişi (KAH grubu) ve 30 kişilik koroner damarları normal olan kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Ateroskleroz yaygınlığı Gensini skorlama sistemi ile belirlenmiştir. Tüm denekler plazma MPO düzeyleri, kardiyovasküler risk faktörleri ve serum lipid profili bakımından değerlendirilmiştir. Bu 78 denekten rasgele seçilen 30'unda koroner kalsiyum skorlaması yapılmıştır.

KAH ve kontrol grubunda demografik özellikler benzer olarak bulunmuştur. MPO düzeyleri ise KAH grubunda (4,27 [1,60-42,43] ng/ml), kontrol grubuna göre (2,93 [1-9,25] ng/ml) anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,002$). MPO düzeyleri ve Gensini skorları arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır ($p=0,044$, $r=0,228$). KAH olan bireylerde koroner kalsiyum skorunun (21 [0-639]), koroner arterleri normal olanlara göre (1 [0-41]) anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,034$). Koroner kalsiyum skorları ve MPO düzeyleri arasında da anlamlı bir korelasyon bulunmaktadır ($r=0,433$, $p=0,017$). KAH grubunda kontrol grubuna göre HDL düzeyi daha düşük, total kolesterol/HDL oranı da daha yüksek bulunmuştur. Ancak her iki parametre de aterosklerozun derecesi ve yaygınlığıyla ilişkili bulunmamıştır.

Bu sonuçlar ışığında MPO düzeyinin sadece KAH varlığı açısından değil, aynı zamanda aterosklerozun yaygınlığını göstermek açısından da önemli bir belirteç olabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışma TÜBİTAK SBAG-AYD-486 ve Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi 05-D02-101-008 projeleriyle desteklenmiştir.

ABSTRACT

Düzgünçınar Ö. Investigation of the relationship between plasma myeloperoxidase levels and the extension of the coronary artery disease. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Biochemistry. Ankara 2007.

Neutrophil myeloperoxidase (MPO) is involved in the pathogenesis of atherosclerosis. MPO oxidizes apolipoproteins and renders high density lipoprotein (HDL) proatherogenic. Recent studies indicate that MPO nitrates Apo-A1, the main apolipoprotein of HDL resulting in the formation of proatherogenic HDL. A possible correlation between systemic MPO levels and coronary artery disease (CAD) risk was suggested.

The aim of this study is to investigate a possible relationship between systemic MPO levels and the extent of atherosclerosis assessed by both coronary angiography and coronary calcium scoring. Forty eight subjects with coronary lesions (CAD group) and 30 subjects with normal coronary arteries (control group) were enrolled in the study. The extent of atherosclerosis was evaluated using Gensini scoring system after angiography. Cardiovascular risk factors, serum lipid profile and plasma MPO level were assessed in all subjects. Coronary calcium scoring was performed on 30 patients.

Demographic data were similar in CAD and control groups. Plasma MPO level was significantly higher in the CAD group (4,27 [1,60-42,43] ng/ml) than the control group (2,93 [1-9,25] ng/ml, $p=0,002$). There was a positive correlation between MPO levels and Gensini scores ($p=0,044$, $r=0,228$). Coronary calcium score was significantly higher in the CAD group (21 [0-639]) than the control group (1 [0-41]) ($p=0,034$). A positive correlation was also found between MPO levels and coronary calcium score ($r=0,433$, $p=0,017$). In the CAD group, serum HDL level was lower and total cholesterol/HDL ratio was higher than the control group. However both parameters were not correlated with the extent and severity of atherosclerosis.

In conclusion, we suggest that systemic MPO levels might be evaluated as a marker not only to indicate the presence of the cardiovascular disease but also to indicate the extent and severity of the atherosclerosis.

This study was supported by TÜBİTAK SBAG-AYD-486 and Hacettepe University Scientific Research Unit 05-D02-101-008 grants.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Ateroskleroz	2
2.1.1. Aterosklerozun oluşum mekanizması	2
2.2. HDL	5
2.2.1. HDL'nin yapısı ve görevleri	5
2.2.2. HDL'nin aterosklerozdan koruyucu etkisi	7
2.2.3. HDL'nin oksidasyonu ve sonuçları	10
2.3. Myeloperoksidaz	12
2.3.1. MPO enzimi ve katalitik özellikleri	12
2.3.2. MPO'nun ateroskleroz oluşumundaki rolü	16
3. GEREÇLER ve YÖNTEMLER	17
3.1. Kitler ve aletler	
3.2. Yöntemler	17
3.2.1. Denek grubu	17
3.2.2. Çalışma materyali	18

3.3.3. HDL ve total kolesterol düzeyleri ölçümü	18
3.3.4. MPO ve nitrotirozin düzeyleri ölçümü	19
3.3.5. Ateroskleroz yaygınlığının değerlendirilmesi	20
3.3.6. İstatistik	21
4. BULGULAR	22
4.1. Hastaların gruplara göre dağılımı	22
4.2. Plazma MPO düzeyleri ve ateroskleroz yaygınlığı ile ilişkisi	23
4.3. Plazma nitrotirozin düzeyleri	24
4.4. Koroner kalsiyum skorları ve MPO düzeyleri ile ilişkisi	25
4.5. Serum HDL düzeyleri ve total kolesterol/HDL oranı ile ateroskleroz yaygınlığının ilişkisi	25
5. TARTIŞMA	27
6. SONUÇ	33
7. KAYNAKLAR	35

KISALTMALAR

ABCA-1: ATP bağlayan kaset taşıyıcı

Apo-A1: Apolipoprotein A-1

bFGF: Bazik fibroblast büyüme faktörü

BNP: B tipi natriüretik peptid

CAM: Hücre adezyon molekülü

CRP: C reaktif protein

EGF: Epidermal büyüme faktörü

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

H₂O₂: Hidrojen peroksit

ICAM-1: Hücreler arası adezyon molekülü-1

KAH: Koroner arter hastalığı

KKS: Koroner kalsiyum skoru

LCAT: Lesitin:kolesterol açıl transferaz

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

MAPK: Mitojenlerle aktifleşen protein kinaz

MCP-1: Monosit kemotaktik protein 1

MI: Miyokard infarktüsü

MM-LDL: Minimal okside düşük yoğunluklu lipoprotein

MMP: Matriks metalloproteinazı

MPO: Myeloperoksidaz

NO₂Tyr: Nitrotirozin

NO: Nitrik oksit

O₂⁻ : Süperoksit

PAF: Platelet aktive edici faktör

PAF-AH: Platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz

PDGF: Platelet kökenli büyüme faktörü

PEG: Polietilenglikol

PGI₂: Prostosiklin

PON: Paroksanaz

PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri

sPLA₂: Sekretuar fosfolipaz A2

SVEF: Sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonundan

TNF- α : Tümör nekroz faktörü α

tPA: Doku tipi plasminojen aktivatörü

VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Ateroskleroz mekanizması ve rol alan yapılar.

Şekil 2. MPO için önerilen kinetik model.

Şekil 3. MPO tarafından katalizlenen NO_2^- oksidasyonu.

Şekil 4. MPO aracılı nitrasyon mekanizması.

Şekil 5. MPO standard grafiği.

Şekil 6. Kontrol ve koroner arter hastalığı (KAH) gruplarında MPO düzeylerinin dağılımı.

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. HDL'nin antiaterojenik etkileri.

Tablo 2. Hastaların yaş ve biyokimyasal parametrelerinin koroner arter hastalığı ve kontrol gruplarına göre dağılımı.

Tablo 3. Biyokimyasal parametrelerin ateroskleroz yaygınlığını gösteren Gensini ve koroner kalsiyum skorları ile korelasyonları ve anlamlılık dereceleri.

1. GİRİŞ

Kalp ve beyin gibi yaşamsal organları besleyen damarların tıkanması ile gelişen kardiyovasküler hastalıklar, gelişmiş ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak görülen ve ölüm sebepleri arasında ilk sırayı alan bir hastalık grubudur. Hastalık erken çocuklukta başlar ve on yıllara yayılmış yavaş bir gelişim gösterir. Hastalığın oluşumunda etkili olan risk faktörlerinin tanımlanması, ağır sonuçları ortaya çıkmadan erken dönemde önlem alınmasını sağlayabilir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ateroskleroz patogenezinde oksidasyonun ve oksidasyon sürecinde de myeloperoksidazın (MPO) önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Aterosklerozdan koruyucu bir molekül olduğu bilinen HDL'nin en önemli lipoproteini olan Apo-A1'in MPO tarafından nitratlanması sonucu HDL'nin proaterojenik hale geldiği gösterilmiştir.

Literatürde MPO'nun kardiyak hastalıklarla ilişkisini gösteren birçok çalışma vardır. Bu çalışmanın amacı MPO düzeyleri ve ateroskleroz yaygınlığı arasındaki ilişkiyi incelemek ve MPO'yu ateroskleroz derecesi ve yaygınlığını gösteren bir belirteç olarak değerlendirmektir. Bu amaçla Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Polikliniğine başvuran ve anjiyografi yapılan 78 birey çalışmamıza dahil edilmiştir. Bunlardan 48'inde anjiyografik olarak ateroskleroz tesbit edilmiş ve koroner damarları tamamen açık olan 30 kişi de kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarında plazma MPO düzeyleri ölçülmüş, ateroskleroz yaygınlığı ise Gensini skorumla sistemi ile değerlendirilmiştir. Bu 78 hastadan 30'unda ayrıca koroner kalsiyum skorlaması yapılmış ve MPO düzeyleriyle ilişkisi incelenmiştir. Bu çalışma, koroner kalsiyum skorları ve MPO düzeylerinin ilişkisini inceleyen literatürdeki ilk çalışma olma özelliğini göstermektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Yunanca'da lapa ya da çorba anlamına gelen 'ateza' sözcüğünden türemiş olan ateroskleroz, sıklıkla intima yerleşimli, orta kısmında pıhtı içeren, yağlı fibröz plaklarla karakterizedir. Temelde, lümeneye doğru gelişen, altındaki media tabakasını zayıflatan ve üzerinde gelişebilecek trombozise zemin hazırlayan ve aterom denilen intima plaklarıyla tanınır. Koroner ateroskleroz iskemik kalp hastalığına yol açar ve arteriyel lezyonlar trombozise komplikasyonu da içeriyorsa iskemik kalp hastalığının en ciddi biçimi olan ve gelişmiş ülkelerde ölümlerin %20-25'inden sorumlu olan miyokard infarktüsüne (MI) yol açar (1).

2.1.1. Aterosklerozun oluşum mekanizması:

Aterosklerozun önemi, onun nedenini araştırmaya yönelik birçok çalışmanın yapılmasına yol açmıştır. Günümüzde en çok kabul göreni zedelenmeye yanıt hipotezidir. Bu hipotezin basamakları ana hatları ile şu şekilde sıralanabilir (1):

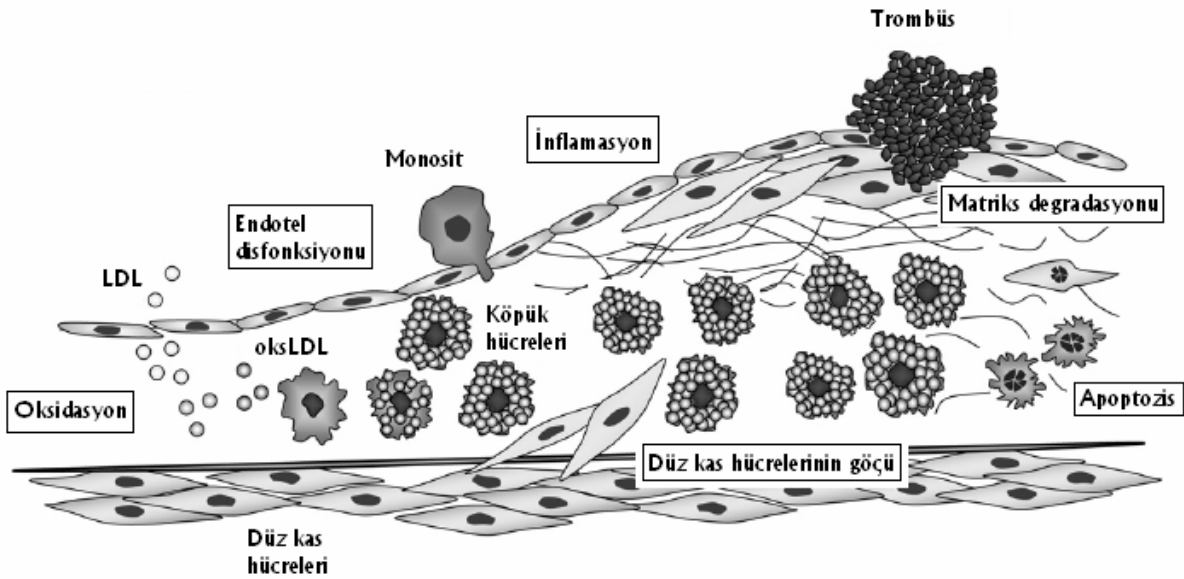
i) Endotelde geçirgenlik artışı, endotel fonksiyon bozukluklarına yol açan fokal zedelenme alanlarının ortaya çıkması.

ii) İntimaya VLDL, LDL ya da modifiye LDL sızması.

iii) Bu zedelenme alanlarında intima ya da media kökenli endotel hücreleri, monosit/makrofajlar, T lenfositler ve düz kas hücrelerini içeren etkileşimler.

iv) Çoğalan düz kas hücrelerinin intimada bağ dokusu oluşturmaları.

Kronik ya da yinelenen endotel zedelenmesi, zedelenmeye yanıt hipotezinin en önemli noktasıdır. Lipid ve proteinlerde meydana gelen oksidasyonlar hem fonksiyonel bozukluklara yol açmakta, hem de immün mekanizmaları harekete geçirerek oksidatif hasara uğramış yapıları (molekül ya da hücre bileşeni) immün sistemin hedefi haline getirmektedir.



Şekil 1. Ateroskleroz mekanizması ve rol alan yapılar. (Fortunato G, Di Taranto MD. Polymorphisms and the expression of genes encoding enzymes involved in cardiovascular diseases. Clinica Chimica Acta . 2007; 381: 21–25)

Aterosklerozun başlangıç evresinde LDL partikülleri endotel hücrelerinin arasından subendotelyal alana (intima) geçerek yağ birikimine sebep olurlar. *In vitro* olarak LDL'nin aterojenik olduğu gösterilememiş, bu da aterojenik etki için LDL'nin bir şekilde modifiye olması gerektiğini düşündürmüştür. LDL'nin oksidatif modifikasyonu, aterogenezin önemli bir boyutudur. LDL'nin oksidasyonu arter duvarı için zarar vericidir. LDL'nin aterojenik olarak sunulabilmesi için öncelikle okside olması veya kimyasal olarak modifiye edilmesi gerekir (2).

LDL'nin çekirdeği yaklaşık 1600 molekül kolesterol esteri ve 170 molekül trigliserit içerir. Bu çekirdek, tek bir tabaka halinde primer olarak lesitin, az miktarda sfingomyelin ve lizolesitinden oluşan 700 fosfolipid molekülüyle çevrilidir (3). LDL'deki yağ asitlerinin yaklaşık yarısı çoklu doymamış yağ asitleridir (PUFA). Ana olarak linoleik asit ve daha küçük miktarlarda araşidonik asit ve dokosaheksaenoik asitten oluşur. Bu PUFA'lar serbest radikal saldırıları ve oksidasyondan antioksidanlar

sayesinde korunur. Bu antioksidanlardan en önemlisi α -tokoferoldür. Eser miktarda γ -tokoferol, karotenoid, kriptoksantin ve ubikitinol-10 da bulunur (4). Antioksidan miktarı kişiden kişiye değişir.

LDL; metal iyonları, lipooksijenazlar, MPO ve reaktif nitrojen türleri tarafından oksitlenebilir. LDL'nin oksidatif modifikasyonunun ateroskleroz oluşumuna etkileri değişik şekillerde olmaktadır. Okside LDL endotel hücrelerini uyararak adezyon moleküllerinin salınımına ve kemotaktik proteinlerin ekspresyonunda artışa sebep olur. Başlıca ateroskleroz mediatörleri olan bu moleküller, monositlerin endotel hücrelerine yanaşmasına ve subendotelyal alana göç etmelerine yol açar. Burada monositler makrofajlara diferansiyel olur, makrofajlar uygun reseptörleri ile okside LDL partiküllerini tanıyarak fagosite ederler ve böylece köpük hücreler oluşur (5). Modifiye LDL'nin çöpçü reseptörlerle etkileşimi hızlı ve kontrolsüz alımını, dolayısıyla kolesterol birikimini indükler (6). Okside LDL'nin CD36 (B sınıfı çöpçü reseptör)'ya afinitesi, saf LDL'den 3 kat fazladır (7). Fare makrosiyalini ya da onun insan homologu CD68 sadece makrofaj ve dendrit hücrelerinde üretilen bir okside LDL reseptörüdür (8). Okside LDL makrosiyalin ve diğer çöpçü reseptörlerin üretimini artırmaktadır.

Makrofajların arter duvarına adezyon ve infiltrasyonu yağlı çizgilerin oluşumuna yol açar. Yağlı çizgilerin oluşumundaki tetikleyici faktör, LDL'nin minimal okside LDL (MM-LDL) halinde oksitlenmesi ve birikimidir. MM-LDL, endotelin monositler için adezyon molekülleri olan hücreler arası adezyon molekülü-1 (ICAM-1) üretimini indükler (9). MM-LDL sekretuar fosfolipaz A_2 (sPLA₂)'nin monositlerden ve makrofajlardan üretimini artırır (10). Transgenik farelerde sPLA₂ tarafından salınan çoklu doymamış yağ asitlerinin, LDL ve HDL'den, okside fosfolipid oluşumunu artırarak monosit-endotel etkileşimlerini ve ateroskleroza uyardığı gösterilmiştir (11).

Okside LDL endotelden monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1) salınımını uyarır. MCP-1 monositlerin subendotelyal alana infiltre olmasını indükler (12). Okside LDL makrofaj hareketliliğinin de potent bir inhibitörüdür. Bu sebepten makrofajların arter duvarında birikimini artırır.

Aterogenez sırasında düz kas hücreleri, intimadan mediaya göç ederek proliferasyon olup, büyüme faktörü, ekstrasellüler matriks glikoproteini ve metalloproteinler salgılamaya başlarlar (13,14). Bu olay fibröz plak oluşumuna yol açar. Okside LDL, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) üretimini artırarak düz kas hücrelerinin göçünü indükler (15-17). Ayrıca bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) salınımını artırarak fibroblast proliferasyonunu da indüklemektedir (18).

Okside LDL, nitrik oksit (NO) üretimini azaltarak ve endotelin üretimini uyararak, vazokonstriksiyonu indükleyebilir (19). NO'nun ve prostasiklinin (PGI₂) endotel tarafından üretimini azaltarak platelet adezyonunu ve agregasyonunu da uyarır (20,21). Okside LDL, doku faktörü (TF) salınımını indükleyerek endotelin prokoagülan aktivitesini artırır ve trombomodulin transkripsiyonunu azaltarak koagülasyonu uyarır. Ayrıca protein C aktivasyonunu baskılar ve doku faktörü yolunu modüle ederek koagülasyonu artırır (22-24). Okside LDL doku tipi plasminojen aktivatörünün (tPA) sekresyonunu da azaltır.

Endotel ve düz kas hücrelerindeki apoptozis, plak yırtılmasına sebep olur (25). Okside LDL'nin apoptotik etkisi endotel hücreleri üzerindeki fosfatidilkolinin oksidasyon ürünlerine ya da oksisterollere atfedilebilir (26).

2.2. HDL

2.2.1. HDL yapısı ve görevi

İnsan HDL'si heterojen bir grup lipoproteindir. Yüksek yoğunluklu (1,063-1,210 g/ml) ve küçük çaplıdır (5-17 µm). Genç HDL partikülleri disk şeklinde, çift katlı

fosfatidilkolinden oluşan bir yapı, hidrofobik yapıda bir uç ve onu sulu ortamdan ayıran protein yapıda bir dış kaplamadan oluşur. Dolaşımdaki HDL, lipidden oluşan çift tabakanın içinde depo edeceği kolesterolü toplar. Kolesterol toplama işleminin verimliliğinin artması lesitin:kolesterol açıl transferazın (LCAT) aktivasyonu ile sağlanır. Bu enzim çift tabakalı yapıda depolanan amfipatik kolesterolü hidrofobik kısımda depolanan kolesterol esterlerine dönüştürür. Esterleşme sonucunda HDL, disk yapısından küresel bir yapıya geçer. Küre şeklindeki bu yapıda, kolesterol esterlerinden oluşan hidrofobik çekirdek, lipid ve protein bileşimi tarafından çevrelenmiş halde bulunur. Bu noktada kolesterol toplanması durur ve olgun HDL karaciğer tarafından tanınacak hale gelir.

Bir çok HDL, başlıca protein bileşen olarak apolipoprotein A1 (Apo-A1) içerir. Apolipoprotein A2, apo C'ler, minör apolipoproteinler, LCAT, paraoksonaz (PON), ve platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz (PAF-AH) gibi değişik proteinler HDL yapısında yer alırlar. Olgun HDL partikülleri, lipidden yoksun Apo-A1'den veya pre β -HDL'den meydana gelirler (27). Apo-A1 HDL'nin primer protein bileşenidir. Apo-A1, HDL'nin çözünürlüğünü artırır, kolesterolü periferdeki hücrelerden temizler, LCAT enzimini aktive eder ve kolesterol esterlerini karaciğere ulaştırır. HDL'nin fonksiyonlarını yerine getirmesi için temel unsurlardan biri olan Apo-A1'in lipid bağlı yapısı, bu bakımdan büyük önem arz eder. Başlıca karaciğer ve barsak hücrelerinin bazolateral yüzeyinde ve makrofajların zarında yer alan bir taşıyıcı protein kolesterol ve fosfolipidlerin Apo-A1'e aktarılmasında görev yapar (28). Bu protein, ATP bağlayan kaset taşıyıcı A1 (ABCA-1) olarak adlandırılır. ABCA-1, çoklu ilaç direncinde ve kistik fibrozis hastalığında rolü olan taşıyıcılarla aynı ailedendir. Apo-A1 önce hücre zarı ile daha sonra da ABCA-1 ile etkileşir. ABCA-1, Apo-A1 ile etkileşmeden önce lipid substratını bağlar, etkileşimden sonra ise ATP bağlar.

Muhtemelen ATP'nin hidrolizinden sonra lipid substrat dış yüze bırakılır ve Apo-A1'e tutunur (28):

2.2.2. HDL'nin aterosklerozdan koruyucu etkisi

HDL partiküllerinin ateroskleroza karşı koruyucu etkisi, primer olarak periferdeki fazla kolesterolü safra kesesinden salgılanmak üzere karaciğere götürmesi ile gerçekleşir (27). Yüksek ya da düşük HDL düzeyleri aterosklerotik damar hastalığı gelişmesinde anahtar faktörlerdir. Yapılan geniş tabanlı klinik araştırmalarda, LDL seviyesini düşürmenin, majör kardiyak bozuklukların önlenmesi açısından kayda değer etkileri olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte LDL azaltıcı tedavilere rağmen, %60-70 oranında kardiyak bozukluklar devam etmiştir. Koroner arter hastalıklarından korunma ve tedavi açısından bir sonraki adım, HDL ve onun apolipoproteinleri üzerinde odaklanmak olabilir (29).

HDL'nin majör fizyolojik işlevi ters kolesterol taşınmasıdır. Bu işlev serbest kolesterolün arter duvarından mobilizasyonunu, karaciğer ve steroidojenik dokulara taşınmasını kapsar (30). HDL arter duvarlarından kolesterol akışını artırarak plakların lipid içeriğini boşaltmış olur. Bu yolla yeni yağlı çizgiler oluşmasını potansiyel olarak inhibe eder ve ateroskleroz gelişmesini engeller (29). HDL aterosklerozu geriletmek dışında, plak zedelenmesini azaltması bakımından da hatırı sayılır bir öneme sahiptir. HDL plağın lipid içeriğini azaltır. Plak içindeki lipid oksidasyonunu dolayısıyla düz kas hücre ölümlerini azaltarak plağın fibröz başlığını kuvvetlendirir ve yırtılmayı önler (31-33). HDL'nin aterosklerozdan primer koruma mekanizmasının ters kolesterol transferi olduğu bilinse de, onun majör proteini olan Apo-A1'in LDL'den köken alan molekülleri temizlediği gösterilmiştir. Bu işlem, aterosklerozdaki inflamatuvar yanıtın sorumlusu olan LDL kaynaklı fosfolipidlerin oksidasyonunu yavaşlatır (33,34).

Apo-A1 ile muamele edilmiş LDL, hidrosiperoksit üretme yeteneğini büyük ölçüde kaybetmiştir. Yine Apo-A1 ile muamele edilmiş LDL insan arter duvarı kültürlerine eklendiğinde monosit yapışmasını ya da monosit kemotaktik aktivitesini artırmamaktadır (34).

Normal bireylerin serumlarından elde edilen LDL'de her zaman küçük oranlarda lipooksijenaz yolu ürünlerine rastlanmıştır (HPODE ve HPETE). Apo-A1'in LDL'den HPODE ve HPETE'yi temizleyebilme ve LDL'nin inflamatuvar özelliklerini insanda ve farede dramatik olarak azaltabilme yeteneği olduğu gösterilmiştir (35). HDL'nin, LDL oksidasyonunu inhibe edebilme özelliği ateroskleroza karşı koruyucu olmasını sağlamaktadır.

Nitrik oksit endotel kaynaklı, damarlarda gevşemeyi sağlayan bir sinyal molekülüdür. NO'daki azalma endotel disfonksiyonuna sebep olur. Endotel disfonksiyonu ateroskleroz oluşumun erken evrelerinde görülen anahtar gelişmedir. NO endotelial NO sentaz (eNOS) tarafından üretilir. Hücre kültüründeki endotel hücrelerinin HDL ile inkübe edilmesi eNOS'u aktive eder (36). HDL bu hücrelerde eNOS ekspresyonunu da artırmıştır. Plazma HDL konsantrasyonları ve NO'ya bağlı koroner vazodilatasyon arasında da pozitif korelasyon saptanmıştır (37,38).

Prostasiklin (PGI₂) endotel kaynaklı potent bir damar genişleticidir ve NO ile sinerjik olarak damar düz kaslarında gevşemeyi artırır. HDL'nin endotel hücre kültüründe PGI₂ salınımını artırdığı gözlenmiştir (39). PGI₂ üretiminde sorumlu enzim olan siklooksijenazın ekspresyonu da HDL tarafından artırılır (40).

Endotelin, potent bir vazokonstriktör peptiddir ve NO'ya zıt etki gösterir. Yapılan çalışmalar HDL'nin, endotelinin vazokonstriktör etkisini önleyici bir rolü olabileceğini göstermiştir (41).

Vasküler endotel hasarı, hücre adezyon moleküllerinin (CAM) üretimini artırır. İnsan umbilikal ven ve endotelial hücre kültürlerinde, HDL'nin CAM üretimini azalttığı gösterilmiştir (42).

Platelet aktive edici faktör (PAF), endotel hücre adezyonunu, platelet agregasyonunu ve düz kas kasılmasını stimüle eder. HDL'nin hücre kültüründe PAF üretimini inhibe ettiği bildirilmiştir (43).

Tablo 1. HDL'nin antiaterojenik etkileri

Koruyucu etki	Moleküler mekanizma	Aracılar
LDL oksidasyonuna karşı	-Geçiş metallerinin şelasyonu -Lipid hidroperoksitlerin taşınması -Oksitlenmiş lipidlerin yıkımı	Apo-A1, PON, PAFAH, lipofilik antioksidanlar
İnflamasyona karşı	-Endotelde adezyon molekülleri ve sitokin ekspresyonunun azalması -Serbest radikal oluşumunun engellenmesiyle NF κ B yolunun baskılanması -Sfingozin kinazın baskılanması -EGF sinyal yolunun ve buna bağlı MMP artışının baskılanması	Apo-A1, PON, PAFAH
Toksik sinyallere karşı	Mitokondri bütünlüğünün korunması, ve sitokrom C salınımının ve kaspaz aktivasyonunun baskılanması yoluyla apoptozisin engellenmesi	Apo-A1, Apo E, PON, PAFAH, lipofilik antioksidanlar
Hücre göçüne karşı	-Endotel hücre göçü ve sağkalımının uyarılması -Düz kas hücrelerinin göçünün baskılanması -Oksitlenmiş lipidlerin yıkımı ve makrofaj göçü -MMP üretiminin modülasyonu	Apo-A1

EGF: epidermal büyüme faktörü, MMP: matris metalloproteinazı

Endotel hücrelerinin tek katlı bozulmamış yapısı, damar duvarı yapısının devamlılığı için yaşamsaldır. Endotel bütünlüğü hücre yenilenmesi, travmatik hasar

ve patolojik durumlarda bozulabilir. Böyle durumlarda endotelin yenilenmesi için endotel hücre göçünün gerçekleşmesi önem arz eder. *In vivo* olarak HDL'nin endotel hücre göçünü artırdığı gözlenmiştir (44). Endotel hücrelerinin apoptozu hücre kaybına ve endotel bütünlüğünün bozulmasına yol açar. HDL'nin kültürdeki endotel hücrelerini TNF- α tarafından indüklenen apoptozdan koruduğu gösterilmiştir (45). HDL, sitokrom c salınımını ve kaspaz kaskatı aktivasyonunu inhibe ederek mitokondri bütünlüğünü korur ve endotel hücrelerinin apoptozisini önler (46). HDL ayrıca geçiş metallerini şelatlayarak LDL'nin oksidasyonunu önler.

HDL'nin platelet adezyonu, agregasyonu ve agregasyon üzerinde trombüs oluşumunu etkileyici yönde bir rolü olduğu sanılmaktadır. HDL bu etkisini NO ve PGI₂ üzerinden gerçekleştirebildiği gibi Von Willebrand faktörünün üretimini inhibe ederek te yapabilir (27).

2.2.3. HDL'nin oksidasyonu ve sonuçları

HDL'nin potansiyel anti-aterojenik etkileri olduğu kanıtlanmış olsa da, bu etkilerin gücü HDL partiküllerinin dolaşımdaki seviyelerinden çok niteliğiyle ilişkilidir. Aterosklerozdan koruyucu olduğu bilinen HDL'nin oksitlenerek bu özelliğini kaybettiği bildirilmektedir. HDL'nin ana proteini olan Apo-A1'in nitrasyonu HDL'nin proaterojenik forma gelmesindeki potansiyel mekanizmadır. Myeloperoksidaz (MPO) insan ateromundaki lipoproteini nitrasyon ya da klorinasyon için hedef seçer (47). Proteine bağlı nitrotirozin (NO₂Tyr), NO kaynaklı oksidanlar için spesifik bir post-translasyonel modifikasyondur ve hem insan aterom plağında, hem de koroner arter hastalığı olanların sistemik dolaşımlarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (47).

Aterosklerotik lezyonlarda LDL'nin yanısıra HDL partiküllerinin de bulunduğu ve bunların yaklaşık %20 oranında oksidatif modifikasyona uğramış oldukları

gösterilmiştir (46). Bu durumda HDL'nin koruyuculuğu ortadan kalkmakta ve oksidatif modifikasyona uğramış LDL ile beraber aterojen etkiye katılmaktadır.

Akut MI riski ile dolaşımdaki HDL seviyeleri arasındaki ters ilişki kayda değerdir (47). Van Lenten ve arkadaşları, akut faz yanıtının HDL'yi anti-inflamatuar durumdan, inflamatuvar hale getirdiğini rapor etmişlerdir (48). Bu çalışmada, elektif cerrahiden önce ve sonra hastalardan alınan HDL'ler karşılaştırılmıştır. Cerrahi operasyon öncesinde, hastalardan elde edilen HDL anti-inflamatuar niteliktedir (LDL oksidasyonunu ve LDL tarafından indüklenen monosit kemotaktik aktivitesini inhibe etmiştir). Buna karşılık, akut faz yanıtının zirve yaptığı dönem olan cerrahi operasyondan 3 gün sonra, aynı hastalardan elde edilen HDL'nin proinflamatuvar olduğu saptanmıştır. Cerrahiden bir hafta sonra ise HDL anti-inflamatuar duruma dönmüştür (48). HDL'deki bu değişimler klasik akut faz yanıtına ikincildir. Gabay ve Bushner (49) ise akut yanıtın kronikleşebileceğini vurgulamışlardır.

HDL ile birlikte bulunan PON'un yokluğunda, yüksek LDL oksidasyonu ve ateroskleroza yatkınlığın arttığı gözlenmiştir (50). İnsan ve tavşanlardaki akut faz yanıtının, HDL'nin PON aktivitesini azalttığına dikkat çekilmiştir (48).

Navab ve arkadaşları, 27 normolipidemik koroner arter hastasının ve 31 kontrol grubu bireyinin HDL'lerinin, inflamatuvar, anti-inflamatuar özelliklerini rapor etmişlerdir. Hasta grubu, sigara içmeyen, diyabeti olmayan, hipolipidemik tedavi almayan ve koroner arterlerinde en az %50 oranında daralma tesbit edilen bireylerden oluşturulmuştur. Hasta HDL'lerinin, kontrol HDL'lerinin tersine, insan arter duvarı kültüründe ve hücresiz deney ortamlarında proinflamatuvar olduğu saptanmıştır. Bu hastaların akut bir hastalığı ya da akut faz yanıtı olduğuna dair bir kanıt mevcut değildir (51). Bir diğer araştırmada, koroner arter hastalarının sağlıklı bireylerden

ayrılmasında, HDL inflamatuvar indeksinin HDL'nin kantitatif miktarına göre daha iyi bir belirteç olduğu öne sürülmüştür (52).

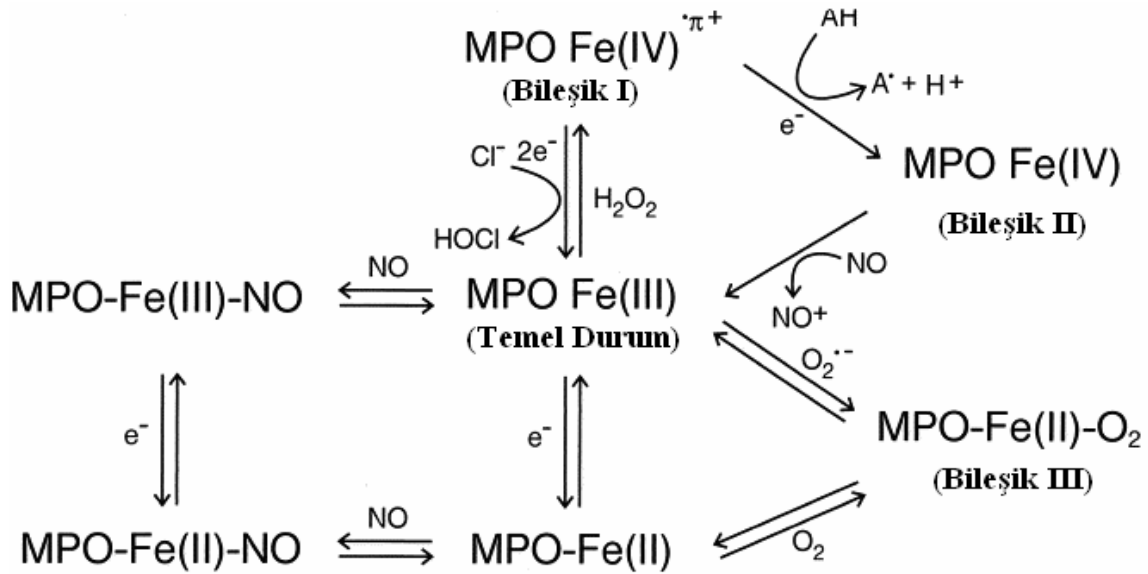
2.3. Myeloperoksidaz

2.3.1. Enzimin yapısı ve katalitik özellikleri

MPO (donör H_2O_2 , oksiredüktaz, EC 1.11.1.7) tetramerik, ağırlıkla glikozillenmiş, 150 kDa ağırlığında bir temel *hem* proteindir. Her biri 59-64 kDa büyüklüğünde iki ağır, 14 kDa büyüklüğünde iki hafif alt birimden oluşan, protoporfirin içeren, iki disülfid bağıyla bağlı protomerden oluşur. Ağır alt zincir *hem* ve %2-4 oranında karbonhidrat içerir (53). Bu *hem* grubu enzim için spesifik olan yeşil renkten sorumlu olup, MPO'nun spektrofotometrik olarak 430 nm dalga boyunda en yüksek absorbanı vermesini sağlayan bileşenidir (54). MPO sentezi kemik iliğindeki myeloid farklılaşma sırasında oluşur. Bu farklılaşma granülositlerin dolaşıma katılmasından hemen önce son bulur. Enzim nötrofil ve monositlerin primer granüllerinde bulunur. Nötrofil ve monositlerin kuru ağırlığının sırasıyla %5 ve %1-2'sini oluşturmaktadır (55). Bu *hem* proteini lökositlerin primer azurofilik granüllerinde depo edilir ve çeşitli agonistlerin fagositleri aktive etmesinden sonra hücre dışı alana ve fagolizozomal kompartmana salınır (56). Tipik olarak fagosit aktivasyonu ve MPO sekresyonuna, NADPH'ın yükseltgenmesiyle beraber, süperoksit (O_2^-) ve hidrojen peroksitin (H_2O_2) oluştuğu oksidatif bir patlama eşlik eder (55-57).

MPO için önerilen kinetik model şudur: Temel durumda MPO ferrik (Fe III) durumda bulunur. H_2O_2 eklenmesi durumunda MPO'nun *hem* grubu okside olarak reaktif ferril radikalini oluşturur. Bu ara bileşiğe "Bileşik I" denir. Cl^- , Br^- , I^- gibi halojenürlerin ve tiyosiyanat (SCN) gibi psödohalojenürlerin varlığında Bileşik I kolayca indirgenerek MPO-Fe III ve uygun gelen hipohalöz asidi (HOX) oluşturur. Halojenürlerin ve tiyosiyonatın normal plazma düzeylerinde klor tercih edilen bir

substrattır ve hipokloröz asit HOCl oluşur (58). Ortamdaki indirgeyici substratlarla Cl⁻ konsantrasyonu arasındaki oran MPO'nun H₂O₂'yi peroksidasyon veya klorinasyon döngülerinden hangisinde kullanacağını belirler. Zayıf peroksidaz substratları Bileşik I ile reaksiyona girerek Bileşik II'yi oluştururlar ve HOCl oluşumunu inhibe ederler (59). Halojenürler ve tiyosiyonata ek olarak MPO'nun nitrit (NO₂⁻), tirozin, askorbat, urat, katekolaminler, östrojenler ve serotonin gibi başka doğal substratları da bulunmaktadır(60). MPO-Fe III inaktif ferröz formu olan MPO-Fe II'ye indirgenebilir (55). MPO-Fe III, O₂⁻ ile ve MPO-Fe II, O₂ ile birleşerek Bileşik III denen bir ara ürün oluştururlar (MPO-Fe II - O₂). Spektral çalışmalarla gösterildiği gibi Bileşik III'e H₂O₂ eklenmesi en son Bileşik II'yi oluşturur. Dolayısıyla Bileşik III dolaylı olarak tek elektron ile peroksidasyon işlemlerini başlatabilir.

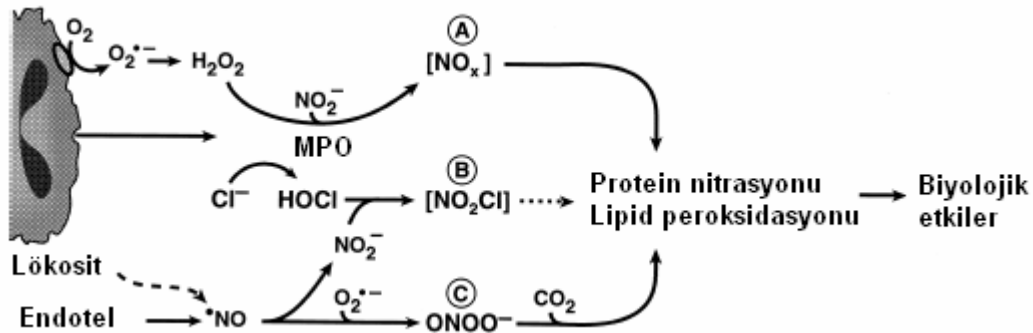


Şekil 2. MPO için önerilen kinetik model. Podrez ve ark.(78)'den alınmıştır

Nötrofillerde O₂⁻, MPO'nun klorinasyon aktivitesini ayarlar. Son yıllardaki çalışmalar NO'nun da MPO aktivitesinin modüle edilmesinde rolü olduğunu göstermiştir. Kinetik çalışmalar, düşük NO seviyelerinde, MPO tarafından

İkincisi ise NO_2 'nin, MPO tarafından oluşturulmuş HOCl tarafından sekonder olarak oksidasyonunu kapsar (63). Hem izole hem de insan nötrofillerinde yapılan çalışmalarda serbest ve protein bağlı tirozin kalıntılarının bu yollarla nitrotirozin (NO_2Tyr) haline getirildiği gösterilmiştir (60,63,64)

MPO tarafından katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarının (tirozilasyon, nitrasyon, halojenasyon) ürünleri insan aterosklerotik lezyonlarında bulunmuştur (65). Nitrotirozinin inflamatuvar doku hasarı olan bölgelerde varlığı bilinen bir gerçek haline gelmiştir. LDL'nin oksidasyonu ateroskleroz için kritik adımdır. LDL modifikasyonu için *in vivo* şartlarda gösterilen yollardan biri reaktif nitrojen türleri üzerinden gerçekleşmektedir. İmmünohistokimyasal çalışmalar protein hasarının global bir belirteci olan nitrotirozinin insan aterosklerotik intimasında yüksek oranda mevcut olduğunu göstermiştir (63). Bundan daha önemli bir nokta ise, yapılan kütle spektrometresi çalışmalarıyla, insan aterosklerotik aortasından elde edilen LDL'deki nitrotirozin miktarının, sağlıklı bireylerin dolaşımında bulunan LDL'dekinden 100 kat fazla olduğunu gösterilmesidir. Ayrıca MPO kaynaklı bu belirteç aterosklerozun tüm evrelerinde görülmektedir(66) .



Şekil 4. MPO aracılı nitrasyon mekanizması. Podrez ve ark.(78)'den alınmıştır

2.3.2. MPO'nun ateroskleroz oluşumundaki rolü

Son yıllarda yapılan çalışmalar, MPO'nun kardiyovasküler hastalıklar açısından önemini göstermiştir. Koroner arter hastalığı olanlarda MPO düzeyi yüksek bulunmuş ve bu yüksekliğin gelecekteki kardiyovasküler olayları ve riskleri önceden belirleyebilme konusunda da önemli olabileceği öne sürülmüştür (67). Kardiyovasküler bir olay olmadan önce saptanan MPO düzeylerindeki yüksekliğin, Troponin T'si negatif olan hastalarda (0,1ng/ml) MI açısından bir risk faktörü olduğu belirlenmiştir. MPO düzeyleri, aynı zamanda, ölçüldükten sonraki ilk 30 gün-6 ay içerisinde meydana gelmesi muhtemel kardiyak komplikasyon (MI, revaskülarizasyon ihtiyacı, ölüm) risklerinin önceden belirlenmesinde de önemlidir (68). Hazen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, koroner arter hastalığı olanlarda, miligram nötrofil proteini başına düşen MPO aktivitesi, kontrollere göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (69).

MPO antimikrobiyal aktivitesi olan oksidatif ürünleri oluşturan bir enzimdir. Bununla birlikte MPO, hücrede inflamasyon bölgelerinde ve aterosklerotik lezyonlarda oksidatif hasarı artırır. İmmünohistokimyasal çalışmalar insan aterosklerotik lezyonlarında MPO'nun varlığını göstermiştir. *In vivo* çalışmalar, MPO'nun LDL oksidasyonuna katkısı olduğunu, dolayısıyla LDL'nin makrofajlar tarafından alınarak köpük hücrelerinin oluşmasında rol aldığını göstermiştir. MPO aynı zamanda NO'yu substratı olarak kullanabilir ve NO'yu azaltarak endotel disfonksiyonuna yol açabilir (70). Bu etkisiyle MPO, NO-bağımlı vazodilatasyonu inhibe eder

ABCA-1 ilk kez 1999 yılında Tangier hastalığındaki defektif gen olarak bulunmuştur. ABCA-1 hücrel kolesterolün makrofajlardan ve periferik dokulardan, kolesterolden fakir Apo-A1'e aktarılmasında önemli bir rol oynamaktadır (71). *In vitro*

çalışmalar MPO tarafından katalizlenen HDL ya da Apo-A1 oksidasyonunun ABCA-1'e bağlı kolesterol çıkışında azalmaya yol açtığını göstermiştir (71).

MPO'nun ateroskleroz oluşumundaki rolünün öncelikle LDL oksidasyonu üzerinden gerçekleştiği gösterilmiş olsa da kısa süre önce yayınlanan bir çalışmada yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) partikülünün başlıca apolipoprotein bileşeni olan Apo-A1'in MPO tarafından katalizlenen tirozin nitrasyonu için selektif bir hedef olduğu ve aterosklerotik plak yapısındaki Apo-A1 moleküllerinde yüksek oranda NO₂Tyr olduğu gösterilmiştir (47). Apo-A1'in MPO ile oksidasyonu HDL fonksiyonlarını bozarak proaterojenik ve proinflamatuvar HDL oluşumuna neden olur.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Kitler ve aletler

Plazmada MPO düzeyinin ölçümü için MPO-ELISA kiti (Oxis Research), plazma nitrotirozin düzeylerinin ölçümü için NO₂ Tyr-ELISA kiti (Oxis Research) kullanılmıştır.

Deneylerde Nüve NF 800R santrifüj, Heidolph Instruments Titramax 101 mikroparka çalkalayıcı, Shimadzu UV-1700 mikropalak okuyucu, Roche-Hitachi modüler sistem otoanalizör kullanılmıştır.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Denek grubu

Araştırmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji polikliniğine başvuran ve anjiyografi endikasyonu konularak anjiyografi uygulanan 78 bireyden oluşan bir grup üzerinde çalışılmıştır. Denekler yaş, cinsiyet, kardiyovasküler hastalığı olma gibi kriterlerden bağımsız olarak seçildi. 78 denekten rastgele olarak seçilen 30'unda, koroner kalsiyum skorları ölçülmüştür.

3.2.2. Çalışma materyali

Çalışmada kardiyoloji polikliniğine başvuran ve anjiyografi endikasyonu konulan bireylerden anjiyografi sırasında alınan kan örnekleri kullanılmıştır. EDTA'lı tüplere, alınan venöz kan örnekleri 1500 xg'de 10 dakika santrifüj edilerek plazma kısımları ayrılmıştır. Plazma örnekleri -20°C'de muhafaza edilmiştir. Plazma örnekleri ayrılan bireylerin, koroner damarlarının tıkanıklık durumuna göre Gensini skorları belirlenmiştir.

3.2.3. HDL ve total kolesterol düzeylerinin ölçümü

HDL ve total kolesterol düzeyleri Roche/Hitachi modüler sistemlerinde uygun kitler kullanılarak serumdan ölçülmüştür. HDL ölçümü için polietilenglikol (PEG) modifiye enzimler kullanılır ve kullanılan testin prensibi şöyledir:



(*HSDA: N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3,5-dimetoksianilin)

Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kolesterol ölçümünde kolesterol esterlerini hidroliz etmek için bakteriyel kolesterol hidrolazı kullanılır ve kullanılan testin prensibi şöyledir:



Oluşan renk spektrofotometrik olarak ölçülür.

3.2.4. MPO ve nitrotirozin düzeyleri ölçümü

MPO düzeyi ölçümü:

Daha önce alınan kanlardan ayrılan plazmalarda üç basamaklı sandviç ELISA yöntemi uygulanmıştır. Birinci basamakta, anti-insan MPO monoklonal antikorunu uygulanmış plaklara örnek eklenerek MPO'nun bağlanması sağlanır; ikinci basamakta, birincide bağlanmış olan MPO, biyotin işaretli poliklonal MPO antikorunu ile ikinci kez bağlanır; üçüncü basamakta ise ortama biyotin ile etkileşecek olan avidin/alkalen fosfataz konjugatı eklenir. Alkalin fosfatazın substratı olan *p*-nitrofenil fosfatın hidrolizi sonucu oluşan sarı renkli *p*-nitrofenolün 405 nm'de ölçülmesi ile örnekteki MPO miktarı hesaplanır.

İşlem şu şekilde uygulanmıştır: Çalışmadan önce plazma örnekleri beş kez seyreltilmiştir. Seyreltilmiş örnekler ve standartlardan kuyucuklara 100'er µl eklenmiştir. Daha sonra plağın üzeri kapatılarak oda sıcaklığında 60 dakika çalkalanmıştır. Bu işlem bittikten sonra yıkama tamponuyla beş kez yıkanmış ve kuyucuklara 100'er µl biyotin işaretli anti-MPO antikor çözeltisi eklenmiştir. Üzeri kapatılan plak 30 dakika çalkalandıktan sonra yine yıkama tamponuyla beş kez yıkanmıştır. Daha sonra kuyucuklara 100'er µl avidin/alkalen fosfataz konjugatı eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika çalkalanmıştır. Yıkama tamponuyla beş kez yıkanan kuyucuklara *p*-nitrofenil fosfat çözeltisinden 100'er µl eklenmiştir. Plak oda sıcaklığında 30 dakika çalkalandıktan sonra kuyucuklara 50 µl durdurma çözeltisi eklenip karıştırılmış ve absorbans 405 nm'de okunmuştur.

Nitrotirozin düzeyi ölçümü:

Sandviç ELISA yöntemi uygulanmıştır. Biyotin işaretli poliklonal anti-NO₂Tyr antikorunu uygulanmış plaklara örnek eklenerek NO₂Tyr'in bağlanması sağlanmış ve daha sonra bu komplekse streptavidin/peroksidaz konjugatı ile eklenmiştir.

Peroksidazın substratı olan tetrametil benzidinin oksidasyonu sonucu oluşan ürünün 450 nm'de ölçülmesi ile örnekteki NO₂Tyr miktarı hesaplanmıştır.

3.2.5. Ateroskleroz yaygınlığının değerlendirilmesi

Gensini skortlama sistemi:

Kalp kasını besleyen koroner damarların tıkalı olup olmadıklarını anlamak amacıyla radyokontrast madde kullanılarak görüntülenmeleri işlemine koroner anjiyografi adı verilmektedir. Bu çalışmada, Judkins yöntemiyle yapılan koroner anjiyografiler iki araştırmacı tarafından birbirlerinden habersiz olarak yorumlanmıştır. Koroner arter hastalığının ciddiyetini ve yaygınlığını değerlendirmek için, tıkanıklık olan damarların yeri, sayısı ve tıkanıklık derecesine göre hesaplama yapılan Gensini skortlaması kullanılmıştır (72). Gensini skortlama sisteminde koroner arteriyel ağaç segmentlere bölünmekte ve her lezyona yerleşimine ve ciddiyetine göre skor verilmektedir. Damar lümen çaplarındaki azalmalar yüzde olarak belirlenir (%25, %50, %75, %90, %99 ve tam oklüzyon) ve her birine sırasıyla 1, 2, 4, 8, 16 ve 32 gibi skorlar verilir. Daha sonra bu skorlar tıkanıklığın bulunduğu damarın yerine ve önemine göre belirlenmiş bir katsayıyla çarpılarak Gensini skoru elde edilir. Bu skortlama sistemi, koroner arter hastalığı yaygınlığı hakkında hasta damar sayısının değerlendirilmesine göre daha doğru bilgiler vermektedir.

Koroner kalsiyum skortlaması:

78 denekten rasgele seçilen 30 tanesinde koroner kalsiyum skortlaması yapılmıştır. Nabzı dakikada 70'den daha hızlı olan hastalara kalp hızını düşürmek için işlemden 1 saat önce 40 mg oral propranolol verilmiştir. Kalsiyum skortlama işlemi 16-multi kanallı spiral bilgisayarlı tomografi aleti ile gerçekleştirilmiş (Sensation 16, Siemens, Erlangen, Almanya) ve total kalsiyum yükünün belirlenmesi için Siemens koroner kalsiyum skortlama analiz programı kullanılmıştır. Tetkik esnasında

kalbin sistolik ve diyastolik fazlarını kapsayacak biçimde kontrast verilmeden geriye dönük EKG eşliğinde alınacak görüntülerin hastanın alacağı X-ışını dozunu en aza indirecek şekilde parametreleri planlanmıştır (120 kV, 130 mAs, 12x1.5 kesit kalınlığı). Görüntülerin alınması anında eş zamanlı olarak EKG'de kayıt edilmesi sayesinde, ham görüntülerden sadece kalp hareketinin en az olduğu diyastolik faz esnasında alınacak kısımların seçilmesi ve bu imajların değerlendirmeye alınması sağlanmıştır. Damarda kalsiyum plağı görülmediği zaman buna '0' skoru verilmiş ve plakların büyüklüğüne göre hastalara 1-10, 11-100, 101-400 ve 400 üzeri skorlar verilmiştir.

3.2.6. İstatistik

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 11.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar normal dağılım gösteren parametreler için (yaş, HDL, total kolesterol, total kolesterol/HDL) ortalama±standard sapma olarak; diğerleri için ise ortanca [range] olarak ifade edildi. Grupların birbirleri ile karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. $P \leq 0,05$ değerleri anlamlı olarak kabul edilmiştir. İki sayısal değişken arasındaki korelasyon için, normal dağılım gösterenlerde "Pearson korelasyon katsayısı"; diğerleri için ise "Spearman rho korelasyonu" kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların gruplara göre dağılımı

Çalışmaya dahil edilen 78 hastadan 48'inde koroner arterlerin çeşitli derecelerde tıkalı olduğu anjiyografik olarak saptanmış ve bu bireyler koroner arter hastalığı grubu olarak değerlendirilmişlerdir. Tıkanıklığın yerleşimi ve oranına göre, ateroskleroz yaygınlığı Gensini skorlaması yapılarak ifade edilmiştir. Anjiyografik

olarak koroner arter tıkanıklığı izlenmemiş 30 hasta ise kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Tablo 2, hastaların yaş ve biyokimyasal parametrelerinin koroner arter hastalığı ve kontrol gruplarına göre dağılımını göstermektedir.

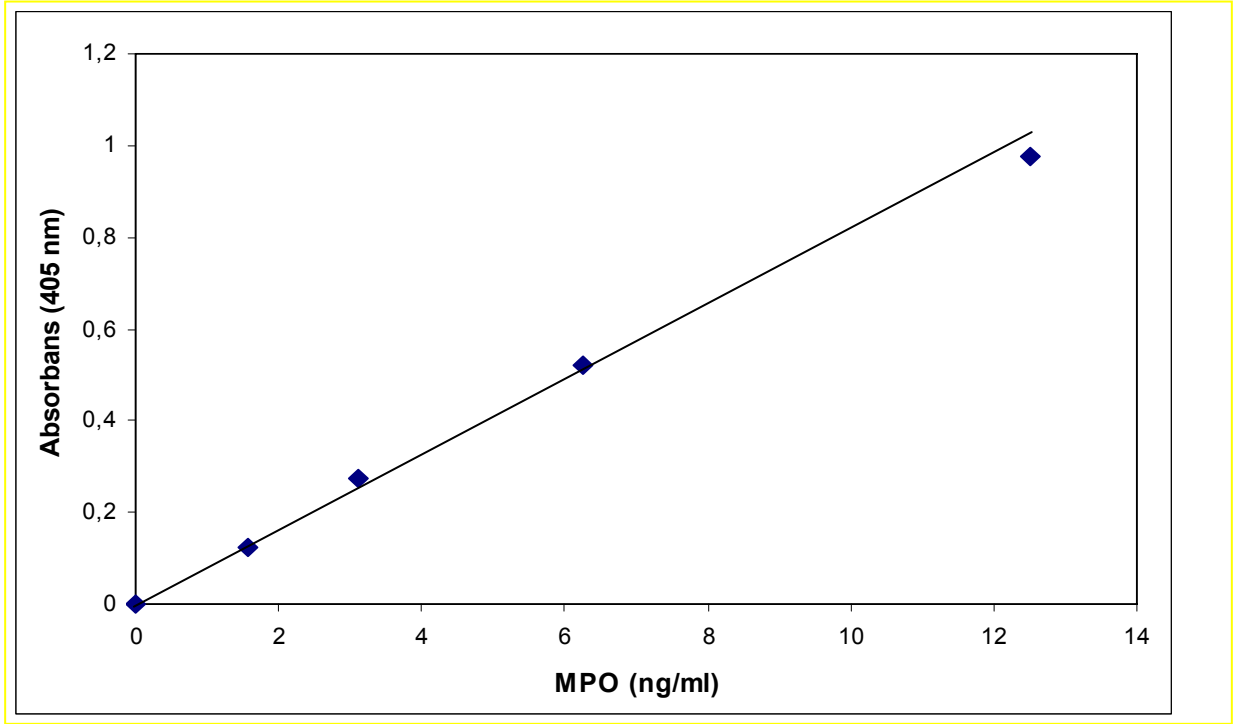
Tablo 2. Hastaların yaş ve biyokimyasal parametrelerinin koroner arter hastalığı ve kontrol gruplarına göre dağılımı.

	Kontrol (n=30)	KAH (n=48)
Yaş, ortalama±SD	58,27±10,30	61,70±11,30
HDL (mg/dl), ortalama±SD	55,92±13,90	47,27±11,40
Total kolesterol (mg/dl), ortalama±SD	200,10±30,70	198,70±42,27
Total kolesterol/HDL, ortalama±SD	3,70±1,06	4,40±1,30
Beden kitle indeksi (kg/m ²), ortalama±SD	27,80±3,60	26,01±2,80
Diabetes mellitus, %	10 (n=3)	19 (n=9)
Hipertansiyon, %	60 (n=18)	54 (n=26)
Sigara, %	27 (n=8)	33 (n=16)

KAH: koroner arter hastalığı

4.2. Plazma MPO düzeyleri ve ateroskleroz yaygınlığı ile ilişkisi

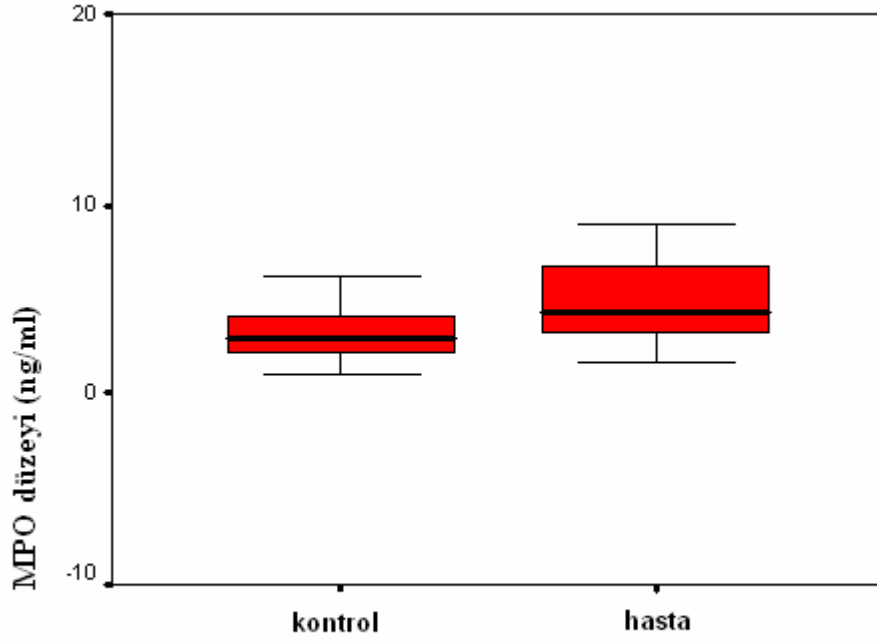
Anjiyografik olarak koroner damarlarının normal olduğu gösterilen 30 kontrol ve koroner arterleri değişik derecelerde tıkalı 48 koroner arter hastasından alınan kanların plazmalarında MPO düzeyleri ölçülmüştür. Örneklerle eşzamanlı olarak çalışılan standartların absorbanları grafiklenmiş ve bu standard grafiği (Şekil 5) kullanılarak örneklerdeki MPO miktarı ng/ml cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 5. MPO standard grafiği.

Koroner arter hastalarındaki MPO düzeyleri (4,27 [1,60-42,43] ng/ml), kontrol grubuna göre (2,93 [1-9,25] ng/ml) anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur ($p=0,002$) (Şekil 6).

Anjiyografi yapılan 78 bireyde, koroner arter hastalığının yaygınlığı ve derecesinin saptanması için Gensini skorlaması yapılmıştır. Hastaların Gensini skorları ile MPO düzeyleri arasında anlamlı ancak zayıf bir pozitif korelasyon saptanmıştır ($r=0,228$; $p=0,044$). Bu bulgu, yüksek MPO düzeylerinin daha yaygın ve ciddi koroner arter hastalığı için risk faktörü oluşturabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 6. Kontrol ve koroner arter hastalığı (KAH) gruplarında MPO düzeylerinin dağılımı

4.3. Plazma nitrotirozin düzeyleri

Plazma NO₂Tyr düzeyleri, ELISA prensibi ile çalışan bir kit ile üreticinin önerilerine uyularak ölçülmüştür. Buna göre en az 10 kez sulandırılması gerektiği belirtilen örnekler önce 12 kez sulandırılarak çalışılmış ve bütün örnek absorbanslarının körün altında kaldığı görülmüştür. İkinci denemede örnekler beş kez sulandırılmış, ancak yine bütün örnek absorbansları körün altında kalmıştır. Her iki çalışmada da standard okumaları beklenildiği gibi sonuç verdiği için yöntemin uygulanması ile ilgili bir sorun olmadığına karar verilmiştir. Proje dışı kaynaklarla tekrar kit alınmış ve örnekler sulandırılmadan çalışılmıştır. Ancak bu koşullarda bile

sadece altı hastada anlamlı bir ölçüm yapılabilmiş ve bu da istatistiksel inceleme için yeterli olmamıştır.

4.4. Koroner kalsiyum skorları ve MPO düzeyleri ile ilişkisi

Koroner kalsiyum skoru, koroner arterlerdeki total kalsifikasyon yükünü gösterir. Total kalsifikasyon yükü aterosklerotik lezyonlarla uyumludur. Kalsiyum skorlama işlemi 30 bireyde gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar anjiyografi ile belirlenen ateroskleroz yaygınlığı skorlamasına paraleldir. Yapılan incelemede, koroner arter hastalığı olan bireylerde koroner kalsiyum skorunun (21 [0-639]), koroner arterleri normal olanlara göre (1 [0-41]) anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır (p=0,034).

Tablo 3'te incelenen 30 bireyin koroner kalsiyum skorları ve MPO düzeyleri arasında da zayıf ama pozitif bir korelasyon bulunduğu görülmektedir (r=0,433, p=0,017). Koroner arter hastalığının yaygınlığı ve ciddiyetinin belirlenmesinde son yıllarda kullanıma girmiş olan kalsiyum skorlaması ile MPO düzeyleri arasında anlamlı bir korelasyon olması, hem anjiyografik skorlama ile MPO ilişkisini gösteren sonuçlarla uyumlu olması bakımından, hem de MPO'nun koroner arter hastalığı yaygınlığı ve ciddiyetinin belirlenmesinde önemli bir belirteç olabileceğini göstermesi bakımından kayda değerdir.

4.5. Serum HDL düzeyleri ve total kolesterol/HDL oranı ile ateroskleroz yaygınlığının ilişkisi

Koroner arter hastalığından koruyucu olduğu bilinen HDL'nin, 30 kişilik kontrol grubundaki düzeyi (55,92±13,90 mg/dl), 48 kişilik koroner arter hastalığı bulunan gruptaki HDL düzeyine (47,27±11,40 mg/dl) göre anlamlı bir şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004).

Anjiyografi yapılan 78 kişilik grupta, HDL düzeyleri ile ateroskleroz yaygınlığını gösteren Gensini skorları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (r= 0,097). Buna

paralel olarak HDL düzeyleri ile koroner kalsiyum skorlaması arasında da bir korelasyon bulunamamıştır ($r= 0,052$).

Tek başına HDL'den daha önemli bir belirteç olduğu düşünülen total kolesterolün HDL'ye oranı göz önüne alındığında, 48 kişilik koroner arter hastası grubundaki total kolesterol/HDL oranının ($4,40\pm 1,32$), 30 kişilik kontrol grubuna göre ($3,78\pm 1,06$) anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,031$). Bununla birlikte tek başına total kolesterol düzeyinin, koroner arter hastalığı olan grup ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark göstermediği bulunmuştur. Benzer şekilde total kolesterolün HDL'ye oranı ile Gensini skorları arasındaki korelasyon da istatistiksel açıdan önemsizdir (Tablo 3).

Tablo 3. Biyokimyasal parametrelerin ateroskleroz yaygınlığını gösteren Gensini ve koroner kalsiyum skorları ile korelasyonları ve anlamlılık dereceleri.

	Gensini skoru		Koroner kalsiyum skoru	
	r	p	r	p
MPO ng/ml	0,228	0,044	0,433	0,017
HDL mg/dl	0,097	>0,05	0,052	>0,05
Total kolesterol/HDL	0,167	>0,05	0,012	>0,05

5. TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıkların etyolojisi ve patofizyolojisi ile ilgili bilgi birikiminin giderek artmasına karşın, görülme sıklıkları ve ölüm oranları da giderek artmaktadır. Gelişmekte olan ülkelerde yaşam süresinin giderek uzaması, gıdaların eskisine oranla daha fazla yağ, şeker ve tuz içermesi, sigara ve alkol tüketiminin artması, ve sedanter bir yaşam tarzının benimsenmesi bu hastalıkların oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Tanı ve tedavi süreçlerine bakıldığında ise, yaşlı hasta grubuna gereğinden fazla tanı ve tedavi amaçlı girişim yapıldığı, yüksek risk altında olan genç (ve özellikle kadın) popülasyonda ise bu girişimlerin yetersiz kaldığı görülmektedir. Bütün bu sayılan nedenlerle toplumumuzda, koroner kalp hastalığı riskini erken yaşta ve hastalık ortaya çıkmadan değerlendirebilmek çok önemlidir. Halen yaş, cinsiyet, aile öyküsü, genetik yatkınlık ve doğum ağırlığı gibi faktörler değiştirilemez risk faktörleri olarak tanımlanırken; yüksek total kolesterol, yüksek LDL, yüksek kan basıncı, sigara, düşük HDL, egzersiz eksikliği, gövdesel şişmanlık, diyabet ve glukoz intoleransı gibi faktörler değiştirilebilir kabul edilmektedir (73). Bu faktörlerin bir kısmı (lipid ve lipoproteinler, kan şekeri, Hemoglobin A1c gibi) biyokimyasal olarak ölçülebilen ve riski gösteren belirteçler olarak ta değerlendirilir. Koroner kalp hastalığına sebep olan aterosklerozun gelişim sürecine katkıda bulunan çok sayıda başka molekülün de biyokimyasal belirteçler olarak kullanılmaları gündemdedir.

Ateroskleroz birçok etkene bağlı olarak gelişen inflamatuvar bir süreçtir. Son yapılan çalışmalar bu inflamatuvar süreçte oksidasyonun önemli bir rolünün olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada öncelikle, lipoproteinlerde oksidatif modifikasyonlar oluşturduğu gösterilmiş olan bir enzimin (MPO) ateroskleroz yaygınlığını gösteren bir belirteç olması olasılığı değerlendirilmiştir. Koroner anjiyografi ile ateroskleroz yaygınlığı değerlendirilen 78 hastadan 48'inde değişik

derecelerde koroner arter tıkanıklığına rastlanırken, koroner damarları normal olan 30 kişi kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Gruplar yaş ve beden kitle indeksi açısından birbiriyle uyumludur. Risk faktörlerinden sigara içme ve tip 2 DM oranı hastalık grubunda daha yüksekken hipertansiyon oranı kontrol grubunda daha yüksektir. Koroner anjiyografinin yanı sıra, ateroskleroz yaygınlığını değerlendirmek amacıyla hastaların bir kısmında koroner damarlardaki kalsifikasyonlar radyolojik olarak da görüntülenmiştir. Koroner arter kalsiyum skorlama tetkiki ile koroner arterlerdeki total kalsifikasyon yükünün belirlenmesi, tarama tetkiki olarak dünyada yaygın kullanıma girmiştir. Koroner arter kalsifikasyonları aterosklerotik hastalığın spesifik bulgusudur. Koroner kalsifikasyon yaygınlığının belirlenmesi, koroner arter hastalık riskinin ve geçirilmiş koroner arter hastalığının tekrarlama riskinin belirlenmesini sağlar. Çalışmamızda da koroner kalsiyum skorları ile anjiyografik değerlendirme skorlarının birbirleriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

Koroner arter hastalığı tespit edilen kişilerde MPO düzeyinin koroner damarları normal olanlara göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($p=0,002$). Koroner arterlerdeki lezyonların sayı ve ciddiyeti ile MPO düzeyleri arasında ise çok yüksek olmayan bir korelasyon bulunmaktadır ($r=0,228$, $p=0,044$). Öte yandan, koroner kalsiyum skorları ile MPO düzeyleri arasındaki korelasyon daha yüksek ve anlamlıdır ($r=0,433$ $p=0,017$). Bu sonuçlar, plazma MPO düzeylerinin ateroskleroz yaygınlığını göstermede anlamlı bir belirteç olabileceğini işaret etmektedir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda da MPO düzeyleri ile koroner arter hastalığı riski ve endotel disfonksiyonu arasında bağlantı olduğu ve anjiyografik olarak tespit edilen damar lezyonları ile MPO düzeylerinin ilişkili olduğu gösterilmiştir (68). Bizim çalışmamız ise buna ek olarak MPO düzeyleri ile koroner kalsiyum skoru arasında korelasyon olduğunu gösteren ilk çalışma olma niteliğini taşımaktadır. Gerek Gensini

skoru gerekse koroner kalsiyum skoru koroner damarlardaki aterosklerotik değişim düzeyini göstermek bakımından günümüzde kabul gören skora sistemleri olmalarına rağmen lezyonun büyüklüğü ve ciddiyetini sayısal olarak yansıtmada konusunda ne kadar yeterli oldukları tartışmalıdır. Gensini skorlamasında verilen değerlerin tıkanıklığın yüzdesiyle doğru orantılı olmaması, kalsiyum skorlamasında ise değerlerin öznel olarak değerlendirilen (küçük, orta, büyük gibi) plak büyüklüğüne göre verilmesi bu skorların biyokimyasal parametrelerle ilişkilendirilmelerini zorlaştırmaktadır. Geliştirilecek daha nesnel, özgül ve duyarlı skora sistemleriyle gelecekte daha iyi sonuç verecek çalışmalar yapılabilir.

Sistemik MPO düzeylerinin akut koroner sendromlarla ilişkili olabileceğini gösteren çalışmalar da vardır. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada artmış MPO düzeyleri ile sol ventriküler diyastolik performansta azalma ve sağ ventriküler sistolik fonksiyon bozukluğu arasında bir korelasyon gösterilmiştir ve MPO'nun gelecekte gelişmesi muhtemel kardiyak komplikasyonlar için de iyi bir belirteç olabileceği öne sürülmüştür (74). Daha önceki bazı çalışmalarda oksidatif stres belirteçlerinin mortalite riskini gösteren belirteçler olabileceği düşünülmüştür (75-76). Ancak bu parametreler B tipi natriüretik peptid (BNP) ve sol ventriküler ejeksiyon fraksiyonundan (SVEF) bağımsız olarak anlamlı sonuçlar vermemiş, MPO ise bu faktörlerden bağımsız olarak mortalite riskini anlamlı bir şekilde göstermiştir (74). Brennan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaysa MPO düzeylerinin göğüs ağrısıyla kliniğe başvuran hastalardaki kardiyovasküler riskleri CRP ve Troponin T gibi inflamasyon belirteçlerinden bağımsız olarak ortaya koyduğu gösterilmiştir(68). Troponin T, kreatin kinaz MB izoformu, ve C-reaktif proteinden (CRP) farklı olarak MPO, koroner arter hastalığı açısından risk altında olan hastaları nekroz olmadan önce de belirleyebilmektedir. Aynı çalışmada sadece MPO düzeyinin değil,

lökositlerdeki MPO aktivitesinin de koroner arter hastalığı olanlarda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (69). Kalp yetmezliğini belirlemek için yapılan taramalarda MPO'nun, BNP ve CRP ile beraber kullanımının tarama çalışmasının özgüllüğünü artırdığı gösterilmiştir. Yine MPO düzeyleri kalp yetmezliğinin şiddetiyle de ilişkilidir (74,77). Fakat MPO'nun hücre içi bir enzim olması nedeniyle serum MPO aktivitesi ölçümündeki zorluklar, MPO aktivitesinin, kardiyovasküler hastalık riskini gösteren bir belirteç olarak kullanılmasını engellemektedir. Ayrıca bizim çalışmamız ve diğerlerinde görüldüğü şekilde sistemik MPO düzeyleri toplumda heterojen bir dağılım göstermektedir. O nedenle MPO düzeyinin normal sınırlarını belirlemek kolay değildir ve bu amaçla geniş denek grubu olan çalışmalar yapılması gerekli görünmektedir. Bu çalışma da dahil olmak üzere şimdiye kadar yapılan çalışmalar, koroner arter hastalığı gelişmeden MPO düzeylerinin belirlenmesi ve MPO düzeyi yüksek olan kişilerin koroner arter hastalığı gelişimi bakımından takip edilmesini kapsayacak ileriye yönelik çalışmalar için temel oluşturabilir.

MPO gerek difüzyonla yayılabilen oksidanlar üreterek, gerekse lipid ve proteinlerde oksidatif değişiklikleri başlatarak ateroskleroz oluşumuna katkıda bulunur (78). Aterosklerotik lezyon gelişiminin tüm aşamalarında MPO varlığı gösterilmiştir (79,80). MPO'nun proteinlerdeki tirozinler üzerinden gerçekleştirdiği nitrasyon, hem endotel fonksiyonu için önemli bir molekül olan NO'yu tüketmekte, hem de proteinlerin fonksiyonunu bozmaktadır. Özellikle HDL yapısındaki Apo-A1'in MPO tarafından katalizlenen tirozin nitrasyonu için selektif bir hedef olması, ateroskleroz oluşumuna etkisini gösteren iyi bir örnektir (47). Bu çalışma planlanırken, MPO'nun yanı sıra plazma NO₂Tyr düzeylerinin de ölçülmesinin ve hem MPO hem de ateroskleroz yaygınlığı ile ilişkisinin araştırılmasının anlamlı olacağı düşünülmüştür. Ancak NO₂Tyr ölçümlerinden verimli bir sonuç

alınamamıştır. Ölçüm için literatürde yer alan bazı çalışmalarda kullanılmış olan bir kit seçilmiştir. Fakat ölçümlerin çoğunda plazma NO₂Tyr düzeylerinin ELISA yönteminin duyarlılık sınırının altında kaldığı ve bu ölçümün daha duyarlılığı yüksek analiz yöntemleri gerektirdiği sonucuna varılmıştır.

HDL'nin kolesterolün ters taşınmasını sağlayarak ateroskerozu önlediği bilinen bir gerçektir. Bunun yanında HDL'nin, LDL'nin oksidasyonunu, dolayısıyla proaterojenik hale gelmesini engellediği de bilinmektedir (81). Yaptığımız çalışmada koroner arter hastalığı olan ve olmayan bireylerde HDL düzeyleri ölçülmüş ve kontrol grubunda HDL anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,004). Ancak koroner arter hastalığının derecesini ve yaygınlığını belirleyen bir gösterge olan Gensini skoru ile MPO düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulunmuşken, HDL düzeyleri ve Gensini skorları arasında anlamlı bir korelasyona rastlanmamıştır (r=0,097). Benzer şekilde koroner kalsiyum skoru ile HDL düzeyleri arasında da bir korelasyon bulunamamıştır (r=0,052). Yani HDL'nin yüksek olması koroner arter hastalığından koruyucu olabilir ancak HDL'deki azalmanın oranı ateroskleroz yaygınlığının göstergesi olarak değerlendirilebilecek bir parametre değildir.

Koroner kalp hastalığı gelişimi açısından önde gelen risk faktörlerinden biri de total kolesterolün HDL'ye oranıdır. Bu oranın 5'in üstünde olması yüksek risk olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamızda, koroner arter hastalığı olan bireylerde total kolesterol/HDL oranı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (p=0,031). Ayrıca HDL'ye benzer şekilde, total kolesterol/HDL oranıyla ne Gensini skorları ne de koroner kalsiyum skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır (r=0,167). Bu verilerin ışığında, hem tek başına HDL hem de total kolesterol/HDL oranı koroner arter hastalığı riskinin ortaya konması bakımından önemli belirteçlerdir denilebilir. Fakat koroner arter hastalığının yaygınlığının ve

ciddiyetinin gösterilmesinde her iki parametre de yetersiz kalmaktadır. Bu yetersizlikten doğacak boşluğu kapatmak için kullanılabilir bir belirteç ise MPO olabilir.

Diğer yandan HDL düzeylerinin yüksek olması tek başına aterosklerozdan korunma bakımından önemli olsa da, HDL'nin oksitlenmemiş ve proaterojenik hale gelmemiş olması daha önemli görünmektedir. Bu bakımdan HDL düzeylerini kantitatif olarak yükseltecek tedavilerle beraber HDL'yi oksitlenmekten koruyacak yaklaşımlar da gelecekte önem kazanabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda enfeksiyon ve inflamasyonun HDL seviyelerinde bir düşüşle beraber seyrettikleri gösterilmiş olmasına karşılık bunun sebebi tam olarak açıklanamamıştır. Bilindiği gibi HDL koruyucu fonksiyonlarını apolipoproteinleri aracılığıyla da gösterir. Ayrıca HDL fonksiyonları, değişik enzim ve transfer proteinleri aracılığıyla da düzenlenmektedir. Enfeksiyon ve inflamasyon sırasında HDL seviyesinin düşmesi yanında bu apolipoproteinler, enzimler ve transfer proteinleri de bir takım değişikliklere uğramaktadır. Örneğin bu süreçte insanlarda ve farelerde PON aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (48). PON aktivitesinin azalmasıyla HDL, LDL'nin oksidasyonuna karşı olan koruyucu işlevini kaybetmektedir (82,83). Van Lenten ve arkadaşları influenza A enfeksiyonu sırasında fare HDL'sinin LDL'yi oksidasyona karşı koruma yeteneğinin azaldığını göstermiştir (84). Metal bağlayan bir protein olan transferrin HDL ile birlikte çalışır ve antioksidan özellikler gösterir (85). Yine enfeksiyon sırasında transferrin azalarak HDL'nin oksidasyonu önleyici işlevlerini sekteye uğratır (48). Bütün bu çalışmalar enfeksiyonların HDL'nin LDL oksidasyonuna karşı olan koruma işlevini azalttığını göstermektedir. Hatta enfeksiyon ve inflamasyon HDL'yi aterojenik hale getirebilmektedir. Bu verilerin ışığında, gelecekte koroner arter hastalıklarından korunmak için, HDL'nin miktarını

artırmak yanında oksitlenerek proinflamatuvar hale gelmesini önlemek amacıyla antioksidan alımı ve enfeksiyonlardan korunma da önem kazanacaktır.

6. SONUÇ

Bu çalışmanın sonuçları, sistemik MPO düzeylerinin, koroner arter hastalığının varlığı ve ateroskleroz yaygınlığı ile ilişkisini ön plana çıkarmaktadır. Plazma MPO düzeyi hem anjiyografik olarak gösterilen ateroskleroz yaygınlığıyla, hem de koroner kalsiyum skoru ile ilişkili bulunmuştur ve bu yönüyle çalışmamız literatürde ilk olma özelliğini taşımaktadır. HDL ve total kolesterol/HDL oranının koroner arter hastalığı için önemli belirteçler olduğu çalışmamızda da görülmüştür. Ancak her iki parametre de ateroskleroz yaygınlığını yansıtmakta yetersizdir. Sonuçlarımız HDL'nin kantitatif olarak dolaşımdaki miktarının koroner arter hastalığından korunma bakımından önemli olduğu, ancak oksidasyona uğrayıp proinflamatuvar hale gelmesi durumunda bu korunmanın ortadan kalkacağı varsayımını destekler niteliktedir. Dolayısıyla HDL'nin koroner arter hastalığını önleyici fonksiyonlarını tam olarak yerine getirebilmesi için oksitlenmemiş ve proinflamatuvar hale gelmemiş olması gerekmektedir ve enfeksiyon gibi MPO ekspresyonunu arttıran olayların koroner arter hastalığı gelişimi bakımından etkileri, odaklanması gereken bir konudur. İlginç olarak MPO ekspresyonu olmayan transgenik farelerde ateroskleroza önleyici bir etki görülmemiş, hatta yüksek yağlı diyetle beslenen farelerde oluşan aterosklerotik plakların daha büyük olduğu görülmüştür (86). Türler arasındaki çok sayıda yapısal ve metabolik farklılığın bu tip sonuçlara yol açabileceği tartışılmakla beraber, H₂O₂-MPO-HOCl sistemi ile ilişkili başka fonksiyonlar olabileceği de akla gelmektedir. MPO'nun bir kardiyovasküler belirteç olarak değerini ortaya koyabilmek için de bir

yandan daha geniş hasta gruplarıyla klinik çalışmalara devam edilirken, öte yandan enzimin etkilerini moleküler düzeyde inceleyen çalışmalar gerçekleştirilmelidir.

7. KAYNAKLAR

- 1) Kan Damarı Hastalıkları: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Basic Pathology 7th. Ed. WB Saunders, Philadelphia, 2003, s. 277-286.
- 2) Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherotrombosis. *Faseb J* 2001; 15: 2073-2084.
- 3) Gotto AM, Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986; 128: 3-41.
- 4) Ramos P, Giesege SP, Schuster B, Esterbauer H. Effect of temperature and phase transition on oxidation resistance of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1995; 36:2 113-2128.
- 5) Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Oxidation, Inflammation, and Genetics. *Circulation*. 1995; 91: 2488-96.
- 6) Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci*. 1976; 76: 333-337.
- 7) Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA. Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *J Lipid Res*. 1998; 39: 777-788.
- 8) Yoshida H, Quehenberger O, Kondratenko N, Green S, and Steinberg D. Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD 36, and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998; 18: 794–802.

- 9) Cominacini L, Garbin U, Pasini AF, Davoli A, Campagnola M, Contessi B, Pastorino AM, Lo CV. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical vein endothelial cells. *Free Radic Biol Med.* 1997; 22: 117-127.
- 10) Anthonen MW, Stengel D, Hourton D, Ninio E, Johansen B. Mildly oxidized LDL induces expression of group IIa secretory phospholipase A(2) in human monocyte-derived macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 1276-1282.
- 11) Ivandic B, Castellani LW, Wang XP, Qiao JH, Mehrabian M, Navab M, Fogelman AM, Grass DS, Swanson ME, de Beer MC, de Beer F, Lusis AJ. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis: 1. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1284-1290.
- 12) Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87: 5134-5138.
- 13) Newby AC, George SJ. Proliferation, migration, matrix turnover, and death of smooth muscle cells in native coronary and vein graft atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol.* 1996; 11: 574-582.
- 14) Newby AC, Zaltsman AB. Fibrous cap formation or destruction—the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res.* 1999; 41: 345-360.

- 15) Stiko-Rahm A, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J, Hamsten A, Nilsson J. Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1992; 12: 1099-1109.
- 16) Kohno M, Yokokawa K, Yasunari K, Minami M, Kano H, Hanehira T, Yoshikawa J. Induction by lysophosphatidylcholine, a major phospholipid component of atherogenic lipoproteins, of human coronary artery smooth muscle cell migration. *Circulation* 1998; 98: 353-359.
- 17) Kim JG, Taylor WR, Parthasarathy S. Demonstration of the presence of lipid peroxide-modified proteins in human atherosclerotic lesions using a novel lipid peroxide-modified anti-peptide antibody. *Atherosclerosis* 1999; 143: 335-340.
- 18) Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res.* 1991; 68: 106-113.
- 19) Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem.* 1995; 270: 319-324.
- 20) Thorin E, Hamilton CA, Dominiczak MH, Reid JL. Chronic exposure of cultured bovine endothelial cells to oxidized LDL abolishes prostacyclin release. *Arterioscler Thromb.* 1994; 14: 453-459.
- 21) Li LX, Chen JX, Liao DF, Yu L. Probucol inhibits oxidized-low density lipoprotein-induced adhesion of monocytes to endothelial cells by reducing P-selectin synthesis in vitro. *Endothelium* 1998; 6: 1-8.
- 22) Ishii H, Kizaki K, Horie S, Kazama M. Oxidized low density lipoprotein reduces thrombomodulin transcription in cultured human endothelial cells through

- degradation of the lipoprotein in lysosomes. *J Biol Chem.* 1996; 271: 8458-8465.
- 23) Wilson BD, Pitas RE, Rodgers GM. Regulation of endothelial cell protein C activation by native and oxidized low density lipoprotein. *Semin Thromb Hemost.* 1992; 18: 11-17.
- 24) Petit L, Lesnik P, Dachet C, Moreau M, Chapman MJ. Tissue factor pathway inhibitor is expressed by human monocyte-derived macrophages: relationship to tissue factor induction by cholesterol and oxidized LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 309-315.
- 25) Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 1519-1522.
- 26) Heermeier K, Leicht W, Palmetshofer A, Ullrich M, Wanner C, Galle J. Oxidized LDL suppresses NF-kappaB and overcomes protection from apoptosis in activated endothelial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 456-463.
- 27) Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 1724-1731.
- 28) Attie AD. ABCA-1: at the nexus of cholesterol, HDL and atherosclerosis. *Trends Biochem Sci.* 2007; 32: 172-179.
- 29) Matthew JP, Prediman KS. New strategies in managing and preventing atherosclerosis: focus on HDL. *Rev Cardiovasc Med* 2002; 3: 129-137.
- 30) Stephen A. Hill ,Matthew J. Reverse cholesterol transport—a review of the process and its clinical implications. *Clinical Biochem.* 1997; 30: 517-525.
- 31) Shah K. Plaque disruption and thrombosis. Potential role of inflammation and infection. *Cardiol Clin.* 1999; 2: 271-81.

- 32) Matsuda Y, Hirata K, Inoue N, Suematsu M, Kawashima S, Akita H, Yokoyama M. High density lipoprotein reverses inhibitory effect of oxidized low density lipoprotein on endothelium-dependent arterial relaxation. *Circ Res.* 1993; 5: 1103-1109.
- 33) Nilsson J, Dahlgren B, Ares M, Westman J, Hultgardh Nilsson A, Cercek B, Shah PK. Lipoprotein-like phospholipid particles inhibit the smooth muscle cell cytotoxicity of lysophosphatidylcholine and platelet-activating factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 13-19.
- 34) Navab M, Hama SY, Anantharamaiah GM, Hassan K, Hough GP, Watson AD, Reddy ST, Sevanian A, Fonarow GC, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. *J Lipid Res.* 2000; 41: 1495–1508.
- 35) Navab M, Hama SY, Cooke CJ, Anantharamaiah GM, Chaddha M, Jin L, Subbanagounder G, Faull KF, Reddy ST, Miller NE, Fogelman AM. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *J Lipid Res.* 2000; 41: 1481–1494.
- 36) Yuhanna IS, Zhu Y, Cox BE, Hahner LD, Osborne-Lawrence S, Lu P, Marcel YL, Anderson RG, Mendelsohn ME, Hobbs HH, Shaul PW. High-density lipoprotein binding to scavenger receptor-BI activates endothelial nitric oxide synthase. *Nat Med.* 2001; 7: 853–857.
- 37) Kuhn FE, Mohler ER, Satler LF, Reagan K, Lu DY, Rackley CE. Effects of high-density lipoprotein on acetylcholine-induced coronary vasoreactivity. *Am J Cardiol.* 1991; 68: 1425–1430.
- 38) Zeiher AM, Schachlinger V, Hohnloser SH, Saubier B, Just H. Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans: elevated

- high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation* 1994; 89: 2525–2532.
- 39) Spector AA, Scanu AM, Kaduce TL, Figard PH, Fless GM, Czervionke RL. Effect of human plasma lipoproteins on prostacyclin production by cultured endothelial cells. *J Lipid Res.* 1985; 26: 288–297.
- 40) Cockerill GW, Saklatvala J, Ridley SH, Yarwood H, Miller NE, Oral B, Nithyanathan S, Taylor G, Haskard DO. High-density lipoproteins differentially modulate cytokine-induced expression of E-selectin and cyclooxygenase-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 910–917.
- 41) Unoki H, Fan J, Watanabe T. Low-density lipoproteins modulate endothelial cells to secrete endothelin-1 in a polarized pattern: a study using a culture model system simulating arterial intima. *Cell Tissue Res.* 1999; 295: 89–99.
- 42) Barter PJ, Baker PW, Rye KA. Effect of high-density lipoproteins on the expression of adhesion molecules in endothelial cells. *Curr Opin Lipidol.* 2002; 13: 285–288.
- 43) Sugatani J, Miwa M, Komiyama Y, Ito S. High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *J Lipid Mediat Cell Signal.* 1996; 13: 73–88.
- 44) Murugesan G, Sa G, Fox PL. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell movement by a mechanism distinct from basic fibroblast growth factor. *Circ Res.* 1994; 74: 1149–1156.
- 45) Sugano M, Tsuchida K, Makino N. High-density lipoproteins protect endothelial cells from tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 272: 872–876.

- 46) 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: 1031-1040.
- 47) Zheng L, Nukuna B, Brennan ML, Hazen SL: Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2004; 114: 529-541.
- 48) Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest.* 1995; 96: 2758-2767.
- 49) Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* 1999;340:448-454.
- 50) Shih DM, Xia Y-R, Wang X-P, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull K, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ. Combined serum paraoxonase/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:17527-17535.
- 51) Navab M, Ananthramaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *J Lipid Res.* 2004; 6:993-1007.
- 52) Ansell BJ, Navab M, Hama S, Kamranpour N, Fonarow G, Hough G, Rahmani S, Mottahedeh R, Dave R, Reddy ST, Fogelman AM. The inflammatory/anti-inflammatory properties of HDL distinguish patients from

- controls better than HDL-cholesterol levels and are favorably impacted by simvastatin treatment. *Circulation* 2003;108:2751-2756.
- 53) Olsen RL, Little C. Studies on the subunits of human myeloperoxidase. *Biochem. J.* 1984; 222:701-709.
- 54) Fittschen C, Henson PM. Linkage of azurophil granule secretion in neutrophils to chloride ion transport and endosomal transcytosis. *J Clin Invest.* 1994; 93: 247–255.
- 55) Johnson RK, Nauseef WM. Molecular biology of MPO. *Peroxidases in chemistry and biology.* CRC Press, Amsterdam, 1991, s. 65-73.
- 56) Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med.* 1978; 298: 659-668.
- 57) Harrison JE, Schultz J. Studies on the chlorinating activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem* 1976; 251:1371-1374.
- 58) Weiss SJ, Klein R, Slivka A, WeiXu M Chlorination of Taurine by Human Neutrophils. Evidence for hypochlorous acid generation. *Clin Invest.* 1982; 70: 598–607.
- 59) Kettle AJ, Winterbourn CC. Mechanism of inhibition of myeloperoxidase by anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol.* 1991; 41: 1485-92.
- 60) Van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE. Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. *J Biol Chem.* 1997; 272: 7617-7625.
- 61) Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 2000; 275: 5425-5430.

- 62) Van Dalen CJ, Winterbourn CC, Senthilmohan R, Kettle AJ. Nitrite as a Substrate and Inhibitor of Myeloperoxidase. *J Biol Chem.* 2000; 275: 11638-11644.
- 63) Eiserich JP, Hristova M, Cross CE, Jones AD, Freeman BA, Halliwell B, Van der Vliet A. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. *Nature* 1998; 391: 393-397.
- 64) Hazen SL, Zhang R, Shen Z, Wu W, Podrez EA, MacPherson JC, Schmitt D, Mitra SM, Mukhopadhyay C, Chen Y, Cohen PA, Hoff F, Abu-Soud HM. Formation of nitric oxide–derived oxidants by myeloperoxidase in monocytes. *Circ Res* 1999; 85: 950-958.
- 65) Hazen SL, Heinecke JW. 3-Chlorotyrosine, a specific marker for myeloperoxidase-catalyzed halogenation, is present in human atherosclerotic aorta. *J Clin Invest.* 1997; 99: 2075–2081.
- 66) Heinecke JW. Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis *Am J Cardiol.* 2003 ;91:12A-16A.
- 67) Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor MH, Penn MS, Keaney JF Jr, Hazen SL. Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 2004; 110: 1134–1139.
- 68) Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Aviles RJ, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL. Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain. *N Engl J. Med.* 2003; 349: 1595–1604.
- 69) Zhang R, Brennan ML, Fu X, Aviles RJ, Pearce GL, Penn MS, Topol EJ, Sprecher DL, Hazen SL. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. *JAMA* 2001; 286: 2136-2142.

- 70) Abu-Soud HM, Hazen SL. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J Biol Chem.* 2000; 275: 37524-37532.
- 71) Joyce C, Freeman L, Brewer H B Jr, Santamarina-Fojo S. Study of ABCA1 function in transgenic mice . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23: 965-971
- 72) Gensini GG. *Coronary arteriography.* Futura, Mt Kisco, New York, 1975, s. 488.
- 73) Homma Y. Predictors of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11: 265-270.
- 74) Tang WH, Tong W, Troughton RW, Martin MG, Shrestha K, Borowski A, Jasper S, Hazen SL, Klein AL. Prognostic value and echocardiographic determinants of plasma myeloperoxidase levels in chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2007; 49: 2364-70.
- 75) Tsutsui T, Tsutamoto T, Wada A, et al. Plasma oxidized low-density lipoprotein as a prognostic predictor in patients with chronic congestive heart failure *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:957-962
- 76) Scott B, Deman A, Peeters P, et al. Cardiac troponin T and malondialdehyde modified plasma lipids in haemodialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18:737-742
- 77) Ng LL, Pathik B, Loke IW, Squire IB, Davies JE. Myeloperoxidase and C-reactive protein augment the specificity of B-type natriuretic peptide in community screening for systolic heart failure. *Am Heart J.* 2006; 152: 94-101
- 78) Podrez EA, Abu-Soud HM, Hazen SL. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. *Free Radic Biol Med.* 2000;12:1717-1725.
- 79) Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by macrophage-colony stimulating

- factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol.* 2001;158: 879-891
- 80) Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1994;94:437-444.
- 81) Assmann G, Gotto AM. HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 2004;109: (Suppl III), III8-III14
- 82) Shih DM, Gu L, Xia YR, et al. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 1998; 394:284-287
- 83) Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low density lipoprotein. *FEBS Lett.*1999; 286: 152-154
- 84) Van Lenten BJ, Wagner AC, Nayak DP, Hama S, Navab M, Fogelman AM. HDL loses its anti-inflammatory properties during acute influenza A infection. *Circulation* 2001;103:2283-2288
- 85) Kunitake ST, Jarvis MR, Hamilton RL, Kane JP. Binding of transition metals by apolipoprotein A-I containing plasma lipoproteins: inhibition of oxidation of low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci.*1992; 89:6993-6997
- 86) Brennan ML, Anderson MM, Shih DM, Qu XD, Wang X, Mehta AC, Lim LL, Shi W, Hazen SL, Jacob JS, Crowley JR, Heinecke JW, Lusis AJ. Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. *J Clin Invest.* 2001;107: 419–430