

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KARDİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**HİPERLİPİDEMİ TEDAVİSİNİN SERUM OKSİDE LDL
OTOANTİKOR DÜZEYİNE ETKİSİ VE BUNUN PLAZMA TOTAL
ANTİOKSİDAN KAPASİTE VE LDL OKSİDASYON
KAPASİTESİYLE İLİŞKİSİ**

**(THE EFFECT OF LIPID-LOWERING THERAPY ON THE LEVELS
OF SERUM AUTOANTIBODIES AGAINST OXIDIZED LDL AND ITS
RELATIONSHIPS WITH LDL OXIDATION CAPACITY AND
PLAZMA TOTAL ANTIOXIDANT STATUS)**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Cihan ÖREM

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Cevdet ERDÖL

TRABZON-2001

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

KISALTMALAR

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Lipidler ve Lipoproteinler	5
2.2. LDL Oksidasyonu	6
2.3. Okside LDL ve Ateroskleroz	8
2.4. Okside LDL Antikoru	9
2.5. Hiperlipidemi Tedavisi ve Ateroskleroz	10
3. MATERYAL VE METOT	12
3.1. Çalışma Grubu ve Tedavi Programı	12
3.2. Kan Örneklerinin Toplanması	13
3.3. LDL İzolasyonu ve LDL Oksidasyon Kapasitesinin Ölçümü	14
3.4. LDL'nin Diyalizi	14
3.5. Lipoproteinlerde Protein Tayini	14
3.6. LDL Oksidasyonu	17
3.7. Okside LDL Antikoru Tayini	18
3.8. Total Antioksidan Status (TAS) Tayini	20
3.9. İstatistiksel Analizler	20
4. BULGULAR	21
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	33
7. ÖZET	35
8. İNGİLİZCE ÖZET	36
9. KAYNAKLAR	37

ÖZGEÇMİŞ

ÖNSÖZ

Çalışmalarındaki katkılarından dolayı başta tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Cevdet ERDÖL olmak üzere Kardiyoloji ve Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve Araştırma Görevlilerine teşekkür ederim.

Dr. Cihan ÖREM

KISALTMALAR

Apo	: Apolipoprotein
CV	: Değişim Katsayısı
ELAM	: Endotel Lökosit Adezyon Molekülü
ELISA	: Enzim Linked Immunosorbent Assay
G-CSF	: Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HDL-K	: HDL-Kolesterol
HM-LDL	: Çok Modifiye LDL
HNE	: Hidroksinonenol
IDL	: Orta Dansiteli Lipoprotein
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LDL-K	: LDL-Kolesterol
Lp (a)	: Lipoprotein (a)
LRCPS	: Lipid Research Clinics Prevalance Study
MM-LDL	: Az Modifiye LDL
MDA	: Malondialdehit
MCP	: Monosit Kemotaktik Protein
M-CSF	: Monosit Koloni Stimüle edici Faktör
MRFIT	: Multiple Risk Factor Intervention Trial
NCEP-ATP	: Ulusal Kolesterol Eğitim Programı-Yetişkinlerin Tedavi Panelleri
NO	: Nitrik Oksit
Ox-LDL	: Okside LDL
Ox-LAB	: Okside LDL Antikoru
PUFA	: Çoklu Doymamış Yağ Asitleri
PDGF	: Platelet Derivated Growth Faktör
ŞM	: Şilomikron
TAS	: Total Antioksidan Status
TF	: Doku Faktörü
TG	: Trigliserid
TK	: Total Kolesterol
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein

1. GİRİŞ

Koroner arter hastalıkları tüm ölümlerin %33-50'sinin, kalp hastalıklarına bağlı ölümlerin ise %50-75'inin nedenidir (1). Koroner arter hastalığı (KAH)'nın en önemli nedeni olan ateroskleroz uzun süreli bir oluşumdur. İlerleyici bir hastalık olan aterosklerotik KAH'nı oluştuktan sonra tamamen tedavi edebilecek bir yöntem henüz bulunmadığından, günümüzde ateroskleroz oluşumuna neden olan ve bu oluşumu hızlandıran risk faktörlerinden korunma ve tedavi yöntemlerine oldukça önem verilmektedir.

Ateroskleroza yol açan karmaşık mekanizmalar konusunda bilgilerimiz giderek artmaktadır. Ateroskleroz patogenezinin aydınlanmasının önemi korunma ve tedavi girişimlerine ışık tutmasıdır. Yol açan risk faktörlerinin azaltılması veya ortadan kaldırılması ile ateroskleroz gelişiminin önlenilebileceği veya geciktirilebileceği düşünülmektedir. Aterosklerotik lezyon gelişmiş kişilerde risk faktörlerinin modifikasyonu ile lezyonların geriletilebilmesi ve koroner olayların azaltılmasının mümkün olduğu da çok sayıda anjiyografik regresyon çalışmalarında gösterilmiştir (2).

Plazma kolesterolü ile aterosklerotik damar hastalığı gelişimi arasında sürekli, dereceli ve kuvvetli bir ilişki olduğu yapılan çok sayıda epidemiyolojik çalışmada gösterilmiştir. Plazma kolesterolünün %60-70'i düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ile taşınır. Bu yüzden LDL en aterojenik lipoprotein olarak bilinir. Bu nedenle LDL-Kolesterol (LDL-K) düzeyleri hiperkolesterolemik hastalarda ve KAH bulunanlarda belirlenmiş olan tedavi kılavuzlarının odak noktasını oluşturmaktadır (3). Ancak yüksek LDL-K düzeyleri KAH'ndan ölen hastaların yarısından daha azında belirlenebilmiştir (4). Statin grubu hipolipidemik ilaçlarla yapılan klinik çalışmalarda LDL-K düzeylerinde benzer değişiklikler elde edilmesine rağmen, kardiyovasküler olaylardaki azalmaların değişik dereceli oldukları gözlenmiştir (5-7). Bu durumda farklı faktörlerin bu olay üzerinde değişik derecelerde rol aldığını düşünmek mümkündür. Yapılan çalışmalarda plazma LDL-K miktarındaki artış kadar, LDL'nin fizikokimyasal niteliğindeki değişikliklerin de önemli olduğu yargısına varılmıştır.

Ateroskleroz gelişiminin ilk basamağının çeşitli risk faktörleriyle oluşabilen endotelial hasar olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Endotelial hasar sonucu LDL'nin subendotelial alana girişi artar. Bu alanda biriken LDL miktarı plazma LDL miktarı ve tipiyle yakından ilişkilidir. Subendotelial alandaki LDL, inflamatuvar hücrelerden salgılanan serbest radikallerin etkisiyle oksitlenir. Oxide LDL (Ox-LDL) çöpçü (scavenger) reseptörler yoluyla makrofajlar tarafından alınarak köpük hücre gelişimine neden olur. Ox-LDL sitotoksik, prokoagulan ve antijenik özelliklere sahiptir. Antijenik özelliğinden dolayı Ox-LDL, Ox-LDL antikorları (Ox-LAB)'nın oluşumuna neden olur. LDL'nin okside olma kapasitesi; onun antioksidan içeriği, kolesterol miktarı ve yağ asidi bileşimine bağlıdır. Ateroskleroz kronik inflamatuvar bir olay olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle oksidan kapasiteyle (serbest radikal üretim kapasitesi), antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması, subendotelial LDL'lerin oksidasyon derecesinde artma meydana getirebilmektedir. Bu durum oluşabilecek antikor miktarı ile de ilişkilidir. Ox-LDL'nin aterosklerotik süreçteki öneminden dolayı bir çok çalışmada LDL'nin oksidasyona yatkınlığı değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ox-LDL'nin in vivo biyokimyasal tespiti zor olduğundan, Ox-LAB düzeylerinin belirlenmesi yoluyla in vivo LDL oksidasyon düzeyi hakkında bilgi edinilmektedir. Lipid düşürücü ilaçların LDL-K seviyesini düşürücü etkileri yanında antiaterojenik etkilerinin olduğu da bilinmektedir ve bu ajanların kullanıldığı çalışmalarda aterosklerotik işlem sürecinde duraklama ve düzelmeler görülmüştür. Bu çalışmaların bazılarında LDL oksidasyonu üzerine olumlu etkiler ortaya konulmuştur. Ateroskleroz gelişimindeki önemli rolünden dolayı son yıllarda in vivo LDL oksidasyonunun bir göstergesi olan Ox-LAB üzerinde oldukça fazla durulmaktadır. Lipid düşürücü tedavinin Ox-LAB üzerine etkisini gösteren bir çalışma literatürde henüz bulunmamaktadır. Bu çalışmada hiperlipidemi tedavisinin serum Ox-LAB düzeyine etkisinin incelenmesi ve bunun LDL oksidasyon kapasitesi ve plazma total antioksidan kapasiteyle ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Koroner kalp hastalıkları, koroner arterlerin beslediği bölgelere herhangi bir nedenle yeterli kan taşıyamaması sonucu myokartta oluşan iskemi ve nekrozun derecesine göre gelişen hastalıklar ve bu hastalıkların komplikasyonlarını içerir. Koroner kalp hastalıklarının en önemli nedeni, ateroskleroz sonucu koroner arterlerin daralması veya tıkanmasıdır.

Ateroskleroz insidansı erişkin yaş grubunda giderek artmakta, aterosklerotik KAH gelişmiş batı ülkelerinde özellikle 40 yaş ve sonrası ölüm nedenlerinin başında gelmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde her yıl kardiyovasküler hastalıklardan kaynaklanan bir milyon ölümün yaklaşık yarısı KAH'dan kaynaklanmaktadır (8). TEKHARF çalışmasına göre ülkemizde tüm nedenli ölümlerin % 42'sini koroner kalp hastalıkları oluşturmaktadır (9). Dünya Sağlık Örgütü'nün hesaplarına göre KAH 2005 yılında hemen tüm dünya ülkelerinde bir numaralı ölüm nedeni olacaktır. Ülkelerin KAH'na verdikleri önem ve ayrılan ekonomik yük de fazla olmaktadır. ABD'nde her yıl 50-100 milyon dolar harcama koroner kalp hastalıklarının önlenmesi ve tedavisine yapılmaktadır (10). Son 45 yılda koroner arter hastalıklarının tanı, tıbbi ve cerrahi tedavi ve korunma yöntemlerinde çok önemli gelişmeler olmuştur. Bu hızlı gelişmeye rağmen KAH'na bağlı yüksek morbidite ve mortalite oranları devam etmektedir.

KAH'nın görülme sıklığı ve buna bağlı ölüm oranları yaşa, cinse, diğer risk faktörlerine, toplumlara, ülkelerin gelişmişlik düzeylerine ve coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Koroner arterleri daraltan temel etiyolojik neden olan ateroskleroz oluşumunda hiperlipidemi, hipertansiyon, diyabetes mellitus, aile öyküsü ve sigara içimi gibi faktörler çok önemli rol oynamaktadır. Günümüz bilgilerine göre ateroskleroz belli bir genetik alt yapı ve riske sahip kişilerde çevresel risk faktörlerinin etkisiyle ortaya çıkan bir hastalıktır. Bireylerde ve toplumlarda risk faktörlerinin fazlalığı, bu faktörlerden korunma ve tedavisi koroner arter hastalığının görülme sıklığında önemli rol oynamaktadır (11). Günümüzde oluşmuş koroner arter darlığını özünden tedavi edecek

tıbbi ve cerrahi yöntem ne yazık ki bulunmamaktadır. Bu nedenlerle son zamanlarda ateroskleroz oluşumunu hızlandıran risk faktörlerinden korunma ve tedavi yöntemlerine çok önem verilmektedir. Bu konuda yaygın çalışmalar yapılmakta olup, koroner arter hastalığı için majör risk faktörlerinin tespit edilmesi için 1988 ve 1993 yıllarında ABD’de Ulusal Kolesterol Eğitim Programı gerçekleştirilmiş ve yetişkinlerde tedavi panelleri planlanmıştır. Avrupa Ateroskleroz Derneği ve ardından ülkemizde Türk Kardiyoloji Derneği de risk faktörleri, KAH’dan korunma ve tedaviye ilişkin kılavuzlar yayınlamışlardır. 1993 Ulusal Kolesterol Eğitim Programı-Yetişkinlerde Tedavi Paneli 2 (NCEP- ATP 2)’ye göre KAH için majör risk faktörleri aşağıdaki gibi tanımlanmıştır (10):

- 1- Yaş: Erkeklerde 45 ve üzerinde, kadınlarda 55 ve üzerinde olması veya erken menopozun bulunması.
- 2- Aile öyküsü: Birinci dereceden erkek akrabalarda 55 yaşından, birinci dereceden kadın akrabalarda 65 yaşından önce infarktüs veya ani ölüm bulunması.
- 3- Sigara kullanımı.
- 4- Hipertansiyon tanısı almış veya antihipertansif tedavi alıyor olmak.
- 5- Diyabetes mellitus.
- 6- LDL-K yüksekliği (160 mg/dl ve üzeri)
- 7- Yüksek dansiteli lipoprotein-kolesterol (HDL-K) düşüklüğü (35 mg / dL’nin altı)

Yaş ve aile öyküsü değiştirilemeyen risk faktörleri iken, diyabet ve dislipidemi uygun tedavi yaklaşımlarıyla kontrol altına alınabilen risk faktörleridir.

Yüksek kolesterol düzeyi ile ateroskleroz düzeyi arasındaki ilişkiyi gösteren ilk bulgular 1930’larda tespit edilmiştir (12,13). Daha sonra Framingham Kalp Çalışması (14) ve Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT) (15) çalışmaları ile büyük popülasyonlarda yüksek kolesterol düzeyi ile KAH arasındaki kuvvetli ilişki epidemiyolojik olarak ortaya konulmuştur. MRFIT çalışmasında KAH’dan ölümlerin total kolesterolü 245 mg/dL’nin üzerinde olanlarda 200 mg/dL’nin altında olanlara göre 2-3 kat daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür. Benzer olarak, Ni-Hon-San Çalışmasında ABD’de yaşayan japon erkekler Japonya’da yaşayanlardan daha yüksek yağ ve kolesterol içeren diyet uygulamışlar ve bu erkeklerdeki total kolesterol düzeyi, myokard infarktüsü insidansı ve KAH’dan ölüm oranları daha yüksek bulunmuştur (16). Plazma total kolesterolünün çoğu LDL tarafından taşındığı için LDL-K düzeyleri KAH riski için takip edilen parametrelerin başında gelmektedir. Lipid Research Clinics Prevalance Study (LRCPS)

çalışmasına göre, LDL-K konsantrasyonlarının KAH'na bağlı 10 yıllık ölümler oranlarını tahmin edebilme duyarlılığının %47 düzeyinde olduğu tespit edilmiştir (17). Bu gelişimden de anlaşılacağı gibi, plazma lipid ve lipoproteinlerinin aterosklerotik işlemin başlangıcında ve gelişiminde önemli rolleri vardır.

2.1. Lipidler ve Lipoproteinler

Yağlar suda zayıf; benzen, kloroform ve eter gibi organik çözücülerde iyi çözünen organik bileşiklerdir. Lipidler adipoz dokuda enerjinin depo şekli, diğer dokularda ise hücre membranlarının yapısal bileşenleridir. Dokuları ve organları sarmak yoluyla ısı yalıtımından sorumludurlar. Özellikle apolar lipidler miyelinli sinirlerde impulsların iletiminde önemli rol oynarlar. Lipidlerin proteinlerle ve karbohidratlarla yaptıkları kompleks bileşikler, hücre membranlarının yapısına katılır ve çeşitli görevler üstlenirler (18).

Lipidler kanda lipoprotein adı verilen suda çözünebilir makromolekül kompleksleri halinde taşınırlar. Lipoproteinlerin genel fonksiyonu, kanda çözünmeyen lipidlerin kanda çözünebilir lipid ve protein kompleksleri halinde taşınmasıdır. Lipoproteinler, hidrofobik lipidleri (trigliserid ve ester kolesterol) kapsayan bir çekirdek ile protein, serbest kolesterol ve fosfolipidlerden oluşan tek katlı bir yüzey tabakasından meydana gelen küresel makromoleküllerdir. Apolipoprotein (Apo) adı verilen yaklaşık 10 değişik protein lipoproteinlerin yapısında yer alır. Lipoproteinlerin yüzeyinde yer alan apolipoproteinler, lipoproteinlerin metabolizmasında yer alan enzimlerin aktivasyonunda ve dokulardaki reseptörler için ligand olarak önemli rol oynarlar. Lipoprotein metabolizmasını ve lipid bozuklukları ile ilişkili hastalıkları anlayabilmek için her apolipoproteinin lipid metabolizmasındaki rolünü dikkate almak gerekmektedir. Lipoproteinler sahip oldukları farklı apoproteinler ve değişik miktarlardaki lipidler nedeniyle farklı yoğunluk ve büyüklüğe sahiptirler. Lipoproteinler ultrasantrifügasyon yöntemi ile yoğunluklarına göre ayrılabilir. Lipoproteinlerin sınıflandırılması elektroforetik hareketliliklerine ve içerdikleri apolipoproteinlere göre yapılmaktadır. Apolipoproteinler serumda nefelometrik metotlar başta olmak üzere çeşitli yöntemlerle tayin edilebilir (19,20).

Başlıca altı farklı lipoprotein sınıfı lipid taşınmasında çeşitli roller üstlenmektedir. Bunlar şilomikronlar (ŞM), çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL), orta dansiteli lipoproteinler (IDL), düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) ve lipoprotein (a) [Lp (a)]'dır (20). Plazma lipoproteinleri bağırsak ve karaciğerde

sentez edilir. Diyetle alındıktan sonra bağırsaklarda kısmen hidroliz olan ve yağ asitleri, monoaçilgliserol, fosfolipid ve kolesterol şeklinde bağırsak mukoza hücrelerinden absorbe edilen yağlar, şilomikron partikülleri şeklinde lenfatik sistem aracılığı ile kana verilir ve metabolize olur (19).

Karaciğer gerek kendi sentezlediği gerekse reseptörler vasıtasıyla diğer lipoproteinlerden gelen lipidleri kullanmaya çalışır. Karaciğer, bu lipidleri VLDL olarak sentezler ve kana salgılar. VLDL plazmada metabolize olurken sırasıyla IDL ve LDL'ye dönüşür. LDL de LDL reseptörleri vasıtasıyla karaciğer ve ekstrahepatik dokular tarafından alınarak metabolize edilir. HDL hem karaciğerde hem de bağırsakta sentezlenir. HDL diğer lipoproteinlerin aksine, lipidlerin dokulardan karaciğere taşınmasında önemli role sahiptir. HDL, bu ters kolesterol taşınımından ve yapısındaki antioksidanlardan dolayı antiaterojenik lipoprotein olarak bilinir. Plazmadaki kolesterolün büyük bir kısmı LDL tarafından taşındığından LDL aterojenik lipoprotein olarak bilinir. Doğal LDL, normal LDL reseptörü yolu ile hem karaciğer hemde ekstrahepatik dokular tarafından katabolize edilirken, modifiye olmuş Ox-LDL bu yoldan bağımsız olarak makrofajlardaki çöpçü reseptörler üzerinden elimine edilir. Down regülasyona uğramayan bu yol subendotelyal alanda köpük hücre oluşumu ve aterosklerotik işlemin temel başlangıç yoludur (21).

2.2. LDL Oksidasyonu

LDL'nin oksitlenmiş iki şekli vardır:

- 1) Az modifiye LDL (MM-LDL): Bu LDL, lipid peroksidasyonu ve lipid hidroperoksidasyonunun erken fazında oluşmaktadır. MM-LDL'de Apo B'de önemli değişiklikler olmadan lipidler okside olmuştur. LDL reseptörü ile reaksiyona girebilmekte ve asetil LDL reseptörü tarafından da önemli ölçüde alınabilmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu ve protrombotik faktörleri etkilemektedir.
- 2) Çok modifiye LDL (HM-LDL): HM-LDL haline dönüşen LDL, çöpçü reseptörler tarafından tanınarak makrofajlar içine alınır. Bu olay sonucu makrofajlarda lipid birikimi ve sonuçta köpük hücre oluşumu gerçekleşir. HM-LDL çeşitli hücre tipleri için sitotoksik ve kan monositleri için kemotaktiktir. Başlıca monositler ve retiküloendotelyal hücreler tarafından hızlı bir şekilde çöpçü reseptörlerle bağlanarak hücreye alınırlar (22,23).

LDL'nin antioksidan içeriği, kolesterol miktarı ve yağ asidi bileşimi oksidasyon kapasitesi üzerinde etkili en önemli faktörlerdir. Oksidasyon direnci, kolesterol düzeyi

azaltılarak, LDL'nin antioksidan içeriği artırılarak ve oleik asit/linoleik asit oranı düşürülerek arttırılabilir (24).

Ox-LDL'de gözlenen başlıca değişiklikler ve Ox-LDL'nin biyolojik özellikleri şunlardır:

A) Ox-LDL'de meydana gelen fizikokimyasal değişiklikler

- 1) Antioksidanların tamamı ile poliinsatüre yağların kısmen ya da çoğunun kaybı,
- 2) Fosfatidilkolin ve kolesteril esterlerinin kaybı,
- 3) Lizofosfatidil kolin, oksisteroller, hidroksi ve hidroperoksi çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), konjuge dienler, malondialdehit (MDA), hekzanol, hidroksinonenal (HNE) ve diğer aldehitlerin miktarında artış,
- 4) Negatif yükte artışa bağlı olarak elektroforetik mobilitede artış,
- 5) Apo B'de fragmantasyon ve konformasyonel değişiklikler olur. Dien konjugatların artışı ile apo B iki farklı peptide parçalanır. Kısaca apo B'de iki şekilde değişiklik gözlenir:
 - a) Peptid bağlarının direkt oksidasyonu olur.
 - b) Lipid peroksidasyon ürünlerinin bazıları apo B'nin serbest amino grupları ile etkileşerek kovalent bağlar oluşturur. Bu bağlarla negatif yük artar.
- 6) Dansite artışı,
- 7) Fosfolipid tekli tabakasının tekrar düzenlenmesi,
- 8) Büyüklük, heterojenite ve agregasyona eğilimde artış görülür.

B) Ox-LDL'nin biyolojik özellikleri

- 1) Çöpçü reseptörler ve diğer reseptörler yolu ile makrofajlar tarafından alım ve degradasyonda artış olur.
- 2) Bir çok hücreye karşı sitotoksiktir.
- 3) Monosit ve düz kas hücrelerinin kemotaksisini artırmaktadır.
- 4) Guanilat siklazın nitrik oksit (NO) aktivasyonunu inhibe etmektedir.
- 5) Asetil kolin, NO ve nitrogliserinle indüklenmiş izole düz kas hücresi gevşemesinde inhibisyon olur.
- 6) Trombozistans aktivitesini artıran protein C'nin baskılanması, kültür endotel hücreleri ve doku faktörü (TF) aktivitesinde artış olur.
- 7) Monosit ve makrofajlarda Platelet Derivated Growth Factor (PDGF) salınımı ve PDGF-mRNA üretimi baskılanır.

8) Kültür endotel hücrelerinin MM-LDL ile muamelesi, çok sayıda biyolojik aktif faktörlerin üretimini uyarmaktadır. Bu faktörler; monosit kemotaktik faktör (MCP-1), endotel lökosit adezyon molekülü (ELAM), monosit büyüme faktörü (M-CSF), granülosit büyüme faktörü (G-CSF) ve koagülasyona esansiyel TF'dir (22,25-27).

9) Antijenik yapıdadır.

Yapılan çalışmalarda, farklı LDL tiplerinin (LDL subgrupları) oksidasyona yatkınlıklarının belirgin şekilde farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu farklılığın endojen antioksidan konsantrasyonlarından ve LDL yağ asidi kompozisyonundan kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür (28,29). LDL büyüklük, dansite ve kimyasal içerik bakımından bir çok farklı alt gruplara ayrılır. Bunlar içinde küçük ve yoğun olan LDL (small dense LDL)'nin oksidatif modifikasyona en yatkın olduğu gösterilmiştir (30).

Ox-LDL'nin aterosklerotik süreçteki öneminden dolayı, bir çok çalışmada LDL'nin oksidasyona yatkınlığı değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu değerlendirmede kullanılan başlıca yöntem şöyledir: Ultrasantrifügasyonla bireylerin plazmalarından izole edilen LDL partikülleri Cu^{+2} (Bakır) ile oksidasyon için inkübasyona bırakılarak zamana göre 234 nm'de oluşan dien konjugat düzeyi spektrofotometrik olarak takip edilir ve grafiği çizilir. LDL'nin oksidasyona direnç kapasitesine göre grafikteki gecikme zamanı (lag time= $t-lag$) başlıca değerlendirilen parametredir. $t-lag$ uzadıkça LDL'nin oksidasyona yatkınlığının az olduğu yani daha az aterojenik özelliğe sahip olduğu söylenebilir (31). Yapılan bir çok çalışmada ateroskleroz gelişen bireylerde LDL oksidasyonunun arttığı gösterilmiştir (32,33).

2.3. Okside LDL ve Ateroskleroz

Aterosklerozun erken lezyonları hayatın ilk 30 yılında görülür ve yalnızca mikroskopik ve kimyasal olarak tespit edilebilir. Bu lezyonun ilerlemesi ve koroner aterosklerotik plağın ortaya çıkmasında bir çok faktör etkili olur. Aterogenez için gerekli primer faktörlerden biri lokal endotelial disfonksiyon veya hasardır. Endotelin vasküler homeostaziste önemi büyüktür. Aynı zamanda plazma lipoproteinlerine karşı geçirgenlikte, lökositlerin adezyonunda, protrombotik ve antitrombotik faktörlerin salgılanmasında, büyüme faktörleri ve vazoaktif maddelerin salgılanmasında önemli rol oynar. Hiperlipidemi, hipertansiyon, diyabetes mellitus ve sigara içimi gibi risk faktörleri endotelin kronik hasarına neden olmaktadır. Bu kronik endotelial hasar sonucu lipidlerin ve monositlerin subendotelial alanda birikimi artar ve bu birikim aterosklerotik işlemin

gelişmesinde çok önemli bir role sahiptir. Subendotelyal alana girecek olan LDL miktarı plazma LDL düzeyi ve tipiyle yakın ilişkilidir. Subendotelyal alana girişi artan LDL, bu alana gelen inflamatuvar hücrelerden salgılanan serbest radikallerin etkisiyle oksitlenir ve Ox-LDL şekline dönüşür. Yukarıda bahsedildiği gibi Ox-LDL'nin bir çok aterojenik özelliği vardır. Ox-LDL monositlerdeki çöpçü reseptörler vasıtasıyla hızlı bir şekilde ortamdan toplanmaya çalışılır. Bu olay sonucu makrofajlar köpük hücresine dönüşür. HDL bu köpük hücresindeki lipidleri temizlemeye ve karaciğere taşımaya çalışır. Burada lezyonun durumunu, subendotelyal alana giren LDL miktarı ve oksitlenmesi ile köpük hücresindeki kolesterolün HDL ile ters taşınımı arasındaki denge belirler. Ayrıca HDL subendotelyal alanda LDL'nin oksidasyonunu inhibe ederek makrofajlar tarafından alınımını ve köpük hücre oluşumunu engeller (34).

Serum veya plazmada Ox-LDL ölçümü gerek in vitro ortamda örneklerin modifikasyona uğraması gerekse Ox-LDL'nin direkt dolaşımdan daha çok subendotelyal alanda olmasından dolayı yapılamamaktadır. İnsan serumunda Ox-LDL'ye karşı otoantikörlerin belirlenmesiyle in vivo LDL oksidasyonu hakkında bilgi elde edilmiştir. Bu antikörlerin salgılanmasını sağlayan antijen hakkında çok şey bilinmemektedir. Bunlar dolaşımda olabilir veya olmayabilir, fakat bir şekilde immun sistem ile karşılaşmakta ve antikör yapımı uyarılmaktadır. Aterosklerotik plakta LDL immun kompleksleri tespit edilebilmiştir.

2.4. Okside LDL Antikoru

Oksitlenerek modifiye olmuş LDL'ye karşı oluşturulan otoantikörler, direkt oksidasyonu gösteren parametrelerden biri olarak kullanılmaktadır. İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda lipoproteinlerdeki modifikasyon ve özellikle Ox-LDL formuna farklılaşmanın humoral immun cevaba ve otoantikör üretimine sebep olduğu ve dolaşımda Ox-LDL'ye karşı otoantikörler bulunduğunu göstermiştir. Bu otoantikörlerin oluşmasına yol açan antijenlerin tam olarak bilinmemesine rağmen, MM-LDL'nin çok güçlü antijenik özellik taşıdığı gösterilmiştir (35-37). Bu otoantikörlerin ortaya çıkmasında in vivo koşullarda oluşan Ox-LDL'nin sorumlu olabileceği ileri sürülmüştür. Dolaşımdaki otoantikörler aterosklerotik lezyondaki Ox-LDL'yi tanıyabilmektedir. Ancak arter duvarından geçerek lezyondaki Ox-LDL'ye bağlanıp bağlanmadıkları bilinmemektedir (37,38).

Koroner arter hastalarında Ox-LAB seviyesi yüksek bulunmuştur (39). Karotid aterosklerozu hızla ilerleyen bir hasta grubunda MDA lizin epitopunu tanıyan otoantikor titresinin, kontrol grubundan anlamlı ölçüde daha yüksek olduğu ve bu otoantikorların lezyonun ilerleyişini gösteren bağımsız bir gösterge olabileceği bildirilmiştir. Ox-LAB ile karotid aterosklerozun ilerleyişi arasında bir korelasyon görülmüştür (40).

Ox-LDL ile aterosklerotik lezyondaki özgül antikorlar arasında immun kompleks tespiti in vivo olarak Ox-LDL'nin oluşabildiğini göstermektedir. Arteriyel tromboz geçirmiş hastalarda Ox-LAB seviyesi (41), aterosklerotik plaklarda Ox-LDL ve Ox-LDL epitoplarını algılayan IgG seviyesi yüksek bulunmuştur (42,43).

Sistemik lupus eritematozus, üremi, preeklampsi gibi hastalıklarda, normal ve komplikasyonlu gebelerde gebe olmayanlara göre Ox-LAB serum konsantrasyonu artmıştır (43,44). Diyabette, periferel vasküler hastalıkta ve hipertansiyonda da otoantikor düzeyi yüksek bulunmuştur (45).

Kolesterolce zengin diyet uygulanmış, LDL reseptörü eksik farede aterogenez derecesi ile otoantikor gelişimi arasında bir ilişki bulunmuştur. Lezyonda Ox-LDL birikimi, otoantikor oluşumunu indüklemekte, otoantikor titresinin fazla olması da lipid peroksidasyonunun yüksek olduğunu yansıtmaktadır (46).

LDL oksidasyonu sırasında çok sayıda reaktif lipid peroksidasyon ürünleri oluşur ve apoproteinlerde, lipidlerde modifikasyonlar görülür. Örneğin poliansatüre yağ asitlerinin yıkım ürünleri olarak çoğu immunojenik olan oldukça reaktif aldehitler oluşabilir. MDA-Lizin, 4-HNE-Lizin, Cu⁺²-LDL ve hipokloritle modifiye LDL epitoplarına karşı antikorlar tespit edilmiştir (47).

2.5. Hiperlipidemi Tedavisi ve Ateroskleroz

KAH'ndan korunmak ve mevcut aterosklerotik lezyonun gelişimini durdurmak, hatta küçülmesini sağlamak amacıyla bir çok primer ve sekonder korunma çalışması başlatılmış ve bir çoğu da halen devam etmektedir. Primer korunma kavramının içine sağlıklı kişilerdeki koroner mortalite ve morbiditeden korunma girer. Sekonder korunma ise, KAH tanısı almış olan kişilerde ortaya çıkabilecek koroner mortalite ve morbiditeden korunmadır. Lipid düşürücü ilaçlar hem primer hem de sekonder korunmada kullanılırlar. Statinler bu amaçla yaygın olarak kullanılan ve LDL-K'ü düşürmekte bilinen en etkili ilaçlardır.

Statinler, kolesterol sentez basamağının bir enzimi olan hidroksimetilglutaril koenzim A (HMG Co-A) redüktaz enzimi ile kompetisyona girerek kolesterol sentezini azaltırlar. Statinler etkilerini karaciğer hücrelerine gösterirler. Statin tedavisi ile total kolesterol %15-30, LDL-K %20-35 oranında azalır. Aynı zamanda bu ilaçlar trigliserid düzeylerini %10-15 oranında azaltırken, HDL-K'ü de %2-12 oranında artırır. Genel olarak yan etki ve toleransları çok iyi olan ilaçlardır. Yan etkileri arasında başağrısı, döküntü, kas ağrıları ve karaciğer enzimlerinde yükselme sayılabilir. Bizim çalışmamızda kullanılan statin türevi atorvastatin olup, yapılan çalışmalarda LDL-K'ü düşürmede diğer statinlerden daha etkili ve güvenlik profilinin de benzer olduğu gösterilmiştir (48,49).

Primer ve sekonder korunma çalışmalarından çıkan sonuçlara göre statinlerin koroner olayları ve mortaliteyi azalttığı kesin olarak gösterilmiştir. Sekonder korunma çalışmalarından LIPID, 4S ve CARE'de total mortalitenin (7,50,51), primer korunma çalışmalarından WOSCOPS (6) ve AFCAPS/TexCAPS (52)'da koroner olayların azaldığı tespit edilmiştir.

Statin tedavisiyle lipid düşürücü etki dışında aterosklerotik işlem sırasında oluşan patolojik olayların bir çoğunda duraklama ve hatta düzelmeler olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bunların başlıcaları; endotel fonksiyonlarında düzelme (53) ve trombotik olaylarda gerileme (54) şeklindedir. Bununla birlikte antiinflamatuvar (55), düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu (56) ve plak stabilizasyonu üzerine etkileri (57) de gösterilmiştir. Bu çalışmaların bazılarında da tedavinin LDL oksidasyonu üzerine olumlu etkileri ortaya konulmuştur. Fakat, literatürde statinle tedavinin in vivo LDL oksidasyonunun bir göstergesi olan Ox-LAB üzerine etkisinin gösterildiği bir çalışma bulunmamaktadır.

Yapılan bu çalışmada hiperlipidemi tedavisinin serum Ox-LAB düzeyine etkisi incelenmiş, bu etkinin ortaya çıkışında LDL'nin oksidasyona yatkınlığının ve plazma total antioksidan kapasitenin rolü değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Çalışma Grubu ve Tedavi Programı

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Polikliniğine 1999-2000 döneminde başvurarak ilk kez hiperlipidemi tanısı alan ve daha önce lipid düşürücü tedavi almamış, yaş ortalamaları 53.6 ± 10.7 olan, 24'ü kadın, 20'si erkek toplam 44 hasta üzerinde yapıldı. Hastaların tamamı 240 mg/dl ve üzerinde total kolesterol düzeyine sahipti. 15 hastada trigliserid düzeyleri 200 mg/dL'nin üzerinde idi. Hastaların hipolipidemik ilaç tedavisi endikasyonu LDL-K seviyeleri gözönüne alınarak NCEP-ATP 2 kriterlerine (10) göre konulmuştur. Hastalar değerlendirilirken hiperkolesterolemik (n=29) ve mixed tip hiperlipidemik (hiperkolesterolemi + hipertrigliseridemi) (n=15) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Yapılan klinik ve laboratuvar değerlendirmeler sonucu, KAH ve herhangi bir endokrin, renal, hepatik bozukluğu olanlar çalışmaya dahil edilmediler. Ayrıca sigara içenler çalışmaya alınmadılar. Hastalara 10 mg/gün atorvastatin tablet tedavisi başlandı ve 6 hafta sonra kontrole çağırılarak değerlendirildiler. Bu sürede NCEP kriterlerine göre LDL-K'ü hedeflenen düzeye ulaşmayan hastalarda atorvastatin dozu 20 mg/gün düzeyine çıkarıldı ve bu hastalar tedavilerinin 12. haftasında tekrar değerlendirildiler. Kan örnekleri tedavi öncesinde ve tedavi sonrası hedeflenen kan lipid düzeylerine ulaşıldıktan sonra alındı. Hastaların tedavi süreleri boyunca değerlendirilen karaciğer ve kas enzim düzeylerinde tedaviyi sonlandırmayı gerektiren değişiklikler gözlenmedi.

Çalışma grubumuz için tedavi kararında kullanılan NCEP kriterleri

	İlaç tedavisi için	
	Başlangıç LDL-K seviyesi (mg/dL)	Hedef LDL-K seviyesi (mg/dL)
KAH yok, ikiden az risk faktörü var	≥190	<160
KAH yok, iki veya daha fazla risk faktörü var	≥160	<130

3.2. Kan Örneklerinin Toplanması

Kan örnekleri 12 saatlik açlık dönemini takiben sabah, brakıyal venden venopunktur yöntemiyle alındı. Serum elde etmek için 8 ml antikoagülsüz vakuteinerli tüpler, plazma elde etmek için de 8 ml antikoagülanlı (EDTA 1 mg/dL) tüpler kullanıldı. Plazma ve serum örnekleri 3000 rpm'de 15 dk'lık santrifüjü takiben elde edildi. Plazma, aynı gün LDL izolasyonu için kullanıldı. Serum ve plazma örneklerinin bir kısmı lipid ve lipoprotein tayinleri için kullanılırken, diğer kısmı da Ox-LAB düzeyi ve TAS tayini için -85 °C'de saklandı. Saklanan numuneler 6 ay içinde kullanıldı.

Total kolesterol (TK), trigliserid (TG), HDL-K, LDL-K tayinleri Hitachi 917 otoanalizöründe, Boehringer Mannheim kitleri kullanılarak yapıldı. TG ve TK tayini için enzimatik-kolorimetrik yöntemler kullanıldı. HDL-K tayini için dekstran sülfat ile presipitasyondan sonra enzimatik kolesterol tayin yöntemi kullanıldı. Tüm analizler günlük kalite kontrol çalışmalarını takiben yapıldı.

Behring Nephelometre (BN II) cihazı ile orijinal kitler kullanılarak apo AI ve apo B tayinleri yapıldı. Testin prensibi monoklonal immunopresipitasyon metoduna dayanmaktadır. Tüm analizler günlük kalite kontrol çalışmalarını takiben yapıldı.

3.3. LDL İzolasyonu ve LDL Oksidasyon Kapasitesinin Ölçümü

Lipoproteinlerin izolasyonu

Lipoproteinlerin izolasyonu 10.4 mL'lik ultrasantrifüj tüplerinde yapıldı. NaBr ile dansite gradient ultrasantrifügasyonu ile LDL izole edildi.

Deneyin yapılışı:

20 dk, 4 °C'de ve 3000 rpm'de santrifüj edilerek elde edilen plazmanın yoğunluğu, katı NaBr ile 1,30 g/mL'ye ayarlandı. Bu işlem için terazi kullanıldı. 3.5 mL plazma tartıldı, NaBr ilave edilerek ağırlığı 4,55 g'a (3.5mL x 1.3 g/mL) getirildi ve üzerine tabaka olacak şekilde insülin iğnesi ile sırasıyla değişik yoğunluktaki çözeltiler ilave edildi.

Hazırlanan santrifüj tüpleri, tabakaların bozulmamasına özen gösterilerek ultrasantrifügasyon rotoruna (Bechman SW 90 Tİ) yerleştirildi. 50 000 rpm ve 4 °C'de 3 saat santrifüj edilerek VLDL, LDL ve HDL tabakaları elde edildi. Bu tabakalar pastör pipetleri ile dikkatle alındı ve sadece LDL'de diyaliz işlemi uygulandı. Diyaliz edilmiş LDL'de protein tayinleri Lowry metodu ile spektrofotometrik olarak yapıldı.

3.4. LDL'nin Diyalizi

İzole edilen LDL'den EDTA'yı uzaklaştırmak için ilk önce 10 mM EDTA-10 mM PBS ile 12 saat ve ardından sadece 10 mM PBS ile yine 12 saat her 3-4 saatte bir tamponlar tazelenerek 4 °C'de magnetik karıştırıcıda diyaliz işlemi yapıldı. İlk aşamada EDTA'lı tampon kullanmada amaç diyaliz işlemi esnasında geçen uzun sürede meydana gelebilecek oksidasyona engel olmaktır.

3.5. Lipoproteinlerde Protein Tayini

İzole edilen HDL, LDL ve VLDL protein tayini Lowry Metodu ile yapıldı. Bu metotta protein önce alkali bakır çözeltisi ile muamele edildi. Alkali ortamdaki Cu^{+2} proteinlerin peptid bağları ile kompleks oluşturarak Cu^{+1} 'e indirgendi. Daha sonra Folin ve Ciocolteu'nun fenol reaktifi ilave edildi. Fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asitlerin indirgenmesiyle molibdenyum mavisi ve tunsten mavisi renkleri meydana geldi.

Bu metodun hassasiyeti 2-100 µg arasındadır. Bu nedenle tayine geçmeden önce, LDL 20 kat %0.9'luk NaCl çözeltisi ile seyreltildi.

Çözeltilerin Hazırlanması:

1. 2 X Lowry Reaktifi

A. 20 g Na_2CO_3 260 mL, 0.4 g $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 mL ve 0.2 g Na-K tartarat 20 mL deiyonize suda çözüldükten sonra üçü karıştırıldı ve böylece Cu reaktifi elde edilmiş oldu.

B. 10 g SDS 100 mL deiyonize suda çözüldü.

C. 4 g NaOH 100 mL deiyonize suda çözüldü.

Kullanmadan hemen önce 3:1:1 oranında hacimlerde A:B:C karıştırılarak Lowry reaktifi elde edildi.

2. Folin reaktifi, 0.2 N

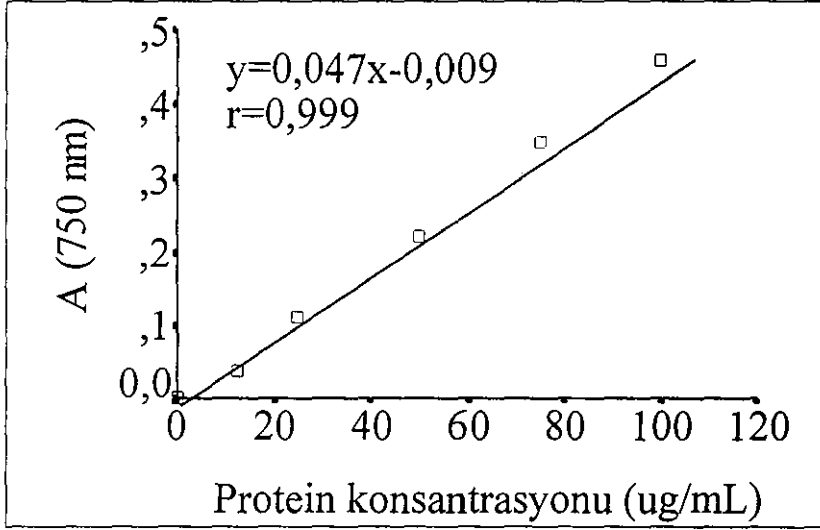
2 N'lık Folin reaktifi 1:10 oranında deiyonize su ile seyreltildi.

3. Albumin standartları

10 mg albümin 100 mL deiyonize suda çözülerek 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik albümin standardı ve bu standarttan da 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik standartlar hazırlandı. Aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı.

Reaktifler	Kör(μL)	Nümuneye(μL)	Standart(μL)
NaCl (%0.9)	400	-	-
Nümuneye	-	400	-
Standart	-	-	400
2xLowry	400	400	400
Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi			
Folin reaktifi (0.2 N)	200	200	200
Oda Sıcaklığında 30 dk bekletildi			
750 nm'de absorbanları okundu			

Folin reaktifi asidik pH'da kararlıdır. Oysa indirgenme asidik pH'da yapılmaktadır. Bu nedenle Folin reaktifi alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilir edilmez iyice karıştırıldı. Böylece fosfomolibdik-fosfotungstat reaktifleri parçalanmadan indirgenmesi sağlanmış oldu. Protein tayinindeki standart grafiği şekil 1'de verilmiştir. Hesaplamalar bu grafikten faydalanılarak yapılmıştır.



Şekil 1. Lowry yöntemiyle protein tayininde elde edilen standart grafik.

3.6. LDL Oksidasyonu

LDL oksidasyonu, Cu^{+2} 'nin LDL'ye bağlanarak LDL'de kimyasal, fizikokimyasal ve biyolojik değişiklikler meydana getirmesi esasına dayanmaktadır. LDL oksidasyonunda ilk olay, LDL poliansature yağ asitlerinde hidroperoksi ölçümüdür. Bu lipid peroksitler, konjuge dienlerdir ve 234 nm'de absorbansları artar. Bu dalga boyunda takiple çift bağlı PUFA'ların konjuge çift bağlı hidroperoksitlere dönüşümü takip edilir. 234 nm'de dien konjugatların ölçümü, LDL oksidasyon direncinin bir ölçüsüdür ve LDL oksidasyonunun başlangıcı olan lag fazı uzunluğunun tam belirleyicisidir.

Çözeltilerin hazırlanması:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 μM

25 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 10 mL PBS tamponunda (10 mM, pH 7.4) çözülerek 10 mM'lık $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 100 μL alınarak yine 19 mL PBS tamponunda çözüldü ve bu şekilde 100 μM 'lık $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ hazırlanmış oldu.

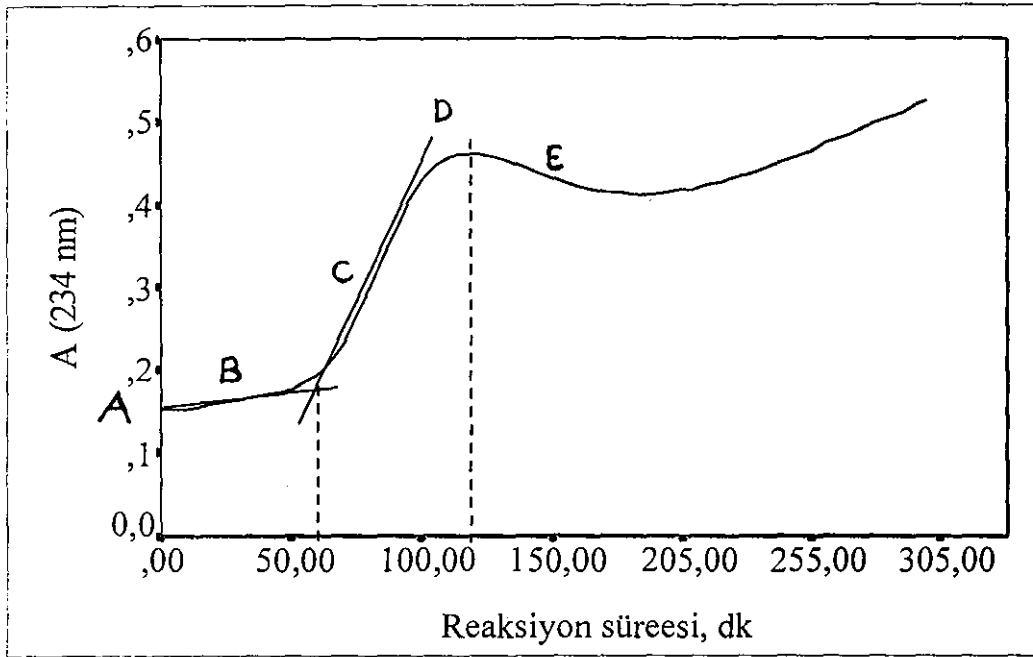
Deneyin yapılışı:

50 μg LDL/mL : 1.67 μM Cu^{+2} olacak şekilde 1000 μL 'lik kuvartz küvetlere aşağıdaki tabloya göre pipetlemeler yapıldı.

	Kör (μL)	Nümuneye (μL)
10 mM PBS, pH 7.4	984	*
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 100 μM	16.7	16.7
Nümuneye	-	**
30°C'de ve 234 nm'de 240 dk LDL oksidasyon direnci takibi		

1000 μL 'de LDL protein miktarı son konsantrasyonu 50 μg olacak şekilde PBS (*) ve nümuneler (**) pipetlendi.

Sonuçların değerlendirilmesi Şekil 2’de verilen grafiğe göre yapıldı.



Şekil 2. Bakır ile LDL oksidasyonu kinetiği.

A : Oksidasyon başlangıcında ilk absorbans

B : t-lag, dk

C : Maksimum oksidasyon hızı ($\Delta A/dk$)

D : Maksimum düzeyde konjuge dien elde edilinceye kadar geçen süre, dk

E : Ayrışma süresi, dk

$$\text{Konjuge dien hızı } (\mu\text{M/dk}) = (\Delta A/dk) \times 33.8$$

3.7. Okside LDL Antikoru Tayini

Ox-LAB tayin metodu, serumda Ox-LDL'ye karşı otoantikörlerin tayini için bir enzim bağlanmış immünoassay (ELISA) düzeneğidir. Antijen olarak Cu^{+2} ile oksitlenmiş LDL mikroplate strip üzerine adsorbe edilir. Serumdaki antikörler, antijene spesifik olarak bağlanır. Peroksidaz konjuge olmuş antihuman IgG, antijene bağlı antikör ortamına ilave edilir. Sonra bağlanmamış konjugatlar yıkanarak atılır. Tetrametil benzidin (TMB) kromojenik substrat olarak ortama ilave edilir. Oluşan rengin optik yoğunluğu numunedeki antikörün konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve bir ELISA okuyucu sistem tarafından

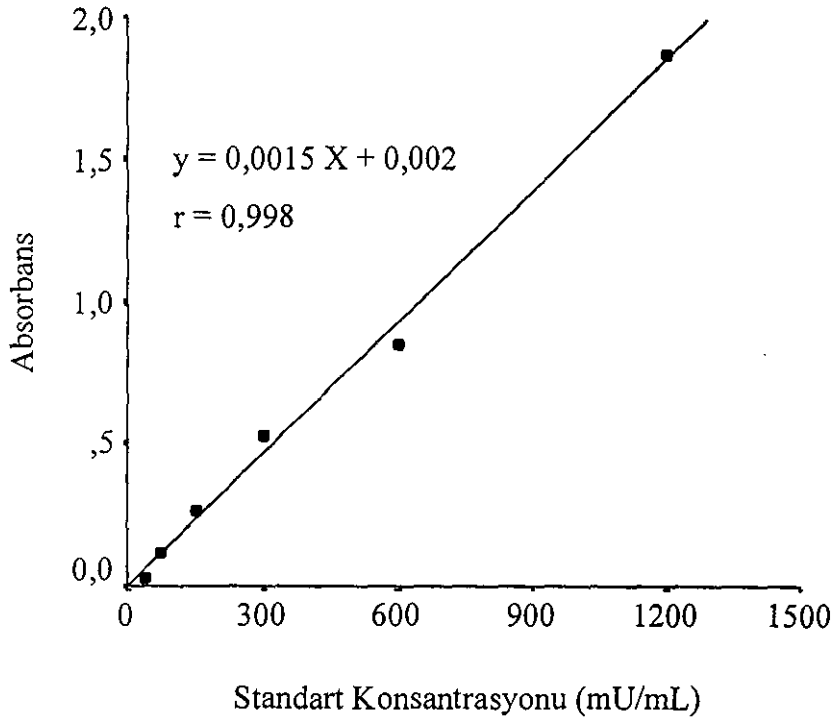
okunur. Numunedeki IgG cinsi Ox-LAB konsantrasyonu mU/mL cinsinden ifade edilmiştir (BIOMEDICA, Cat no: B 1-20032).

Ox-LAB tayini için yüzde varyasyon katsayısı (% CV) (Inter-assay).

	n	% CV
Kontrol A (300 mU/mL)	5	4,7
Kontrol B (1000 mU/mL)	5	5,8

Sonuçların Değerlendirilmesi:

Standart grafik yardımı ile nümunelerdeki Ox-LAB miktarı tayin edildi (Şekil 3).



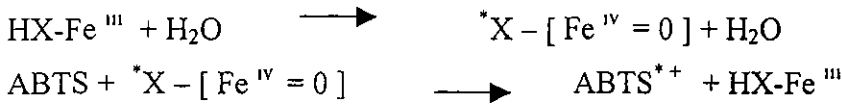
Şekil 3. Ox-LAB tayininde standart konsantrasyonlara karşı absorbans grafiği.

3.8. Total Antioksidan Status (TAS) Tayini

TAS tayini kolorometrik-spektrofotometrik yöntemle yapıldı.

Deneyin prensibi:

ABTS (2,2'-Azino-di-[3-etylbenzthiazoline sulphonate]) bir peroksidaz (metmyoglobin) ve H₂O₂ ile inkübe edilerek ABTS^{*+} radikal katyonu elde edilir. Bu nisbeten stabil mavi-yeşil bir çözeltilidir. 600 nm'de absorbans verir. İlave edilen nümune içindeki antioksidanlar bu rengin oluşum derecesinde baskılama oluştururlar. Bu baskılama derecesiyle antioksidan konsantrasyonu orantısaldır. Çalışmamızda Randox, TAS tayin reaktifleri kullanılmıştır.



HX-Fe^{III} : Metmyoglobin

*X - [Fe^{IV} = O] : Ferrylmyoglobin

ABTS: 2,2'-Azino-di-[3-etylbenzthiazoline sulphonate]

Çalışma reaktifleri Randox, TAS kit (Cat no. NX2332) inden sağlanmıştır.

3.9. İstatistiksel Analizler

Elde edilen değerler aritmetik ortalama (\bar{X}) ve standart sapma (SD) olarak ifade edilmiştir. Her iki gruptaki parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Simirnov testi ile değerlendirilmiştir. Tedavi öncesi ve sonrası parametreler arası değişikliğin önemi Wilcoxon veya paired t testiyle değerlendirilmiştir. Hiperkolesterolemik ve mixed tip hiperlipidemik hasta grupları arasındaki karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Parametreler arası ilişki Pearson Korelasyon testi ile incelenmiştir. p<0,05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Hiperlipidemik hastalara ait demografik bulgular Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Hastalara ait demografik bulgular.

n	44
Yaş, yıl	53.6 ± 10.7 (30-76)
Cins (K/E)	24/20
BMI (kg/m ²)	28.2 ± 4.1 (19-41)
Hipertansiyon (%)	21 (%47,7)
Aile Öyküsü (%)	16 (%36,3)

Çalışmaya alınan hastaların 21 (%47.7)’inde hipertansiyon hikayesi vardı. Hastaların antihipertansif tedavilerinde çalışma süresi içinde hiç bir değişiklik yapılmadı ve tedavi süresince kan basınçlarının regüle olduğu gözlemlendi. Hipertansif hastaların 12’si kalsiyum kanal blokörü (amlodipin 5, 10 mg/gün) ve 9’u anjiotensin konverting enzim inhibitörü (trandolapril 2 mg/gün veya fosinopril 10 mg/gün) veya anjiotensin I reseptör antagonisti (valsartan 80 mg/gün) kullanmaktaydı. Hastalarda antihipertansif ilaç kullanımı dışında düzenli başka bir ilaç kullanım öyküsü yoktu.

Hipolipidemik tedavi öncesi ve sonrası serum lipid, lipoprotein ve apolipoprotein düzeyleri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Tedavi öncesi ve sonrası serum lipid ve lipoprotein düzeyleri.

	Tedavi Öncesi (n = 44)	Tedavi Sonrası (n = 44)	% Değişiklik
TK, mg/dL	285±31 ^b	206.3±36.3	- 27.3
TG, mg/dl	193±103 ^a	141.8±69	- 20.4
HDL-K, mg/dL	41±7.4 ^b	44.8±8.2	9.2
LDL-K, mg/dL	202.8±32 ^b	132.7±35.8	- 33.9
Lp(a), mg/dL	20.3±27.4	19.3±27.2	-4.9
Apo AI, mg/dL	122 ± 39 ^b	162 ± 79	32.7
Apo B, mg/dL	135 ± 21 ^b	103 ± 16	- 23,7

^a p < 0.01, Wilcoxon testine göre

^b p < 0.01, Paired t testine göre

NCEP kriterlerine göre hastaların hepsinde hedeflenen LDL-K düzeyleri elde edildi. Tedavi öncesi ve sonrası dönemde serum Lp (a) düzeyleri hariç, diğer parametrelerde anlamlı derecede değişiklikler tespit edildi. Serum TK, TG, LDL-K ve Apo B düzeylerinde düşme, HDL-K ve Apo AI düzeylerinde ise anlamlı artışlar gözlemlendi.

Hastalarda tedavi öncesi ve sonrası serum Ox-LAB, t-lag ve TAS düzeyleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Hastalarda tedavi öncesi ve sonrası serum Ox-LAB, t-lag ve TAS düzeyleri.

	Tedavi Öncesi	Tedavi Sonrası	% Değişimi
Ox-LAB, mU/L	344 ± 259 ^a	265 ± 207	- 18,7
t- lag, dakika	75 ± 24 ^b	94 ± 29	31,3
TAS, mmol/L	1,40 ± 0,10 ^b	1,50 ± 0,08	7,6

^a p < 0.01, Wilcoxon testine göre.

^b p < 0.01, Paired t testine göre

Ox-LAB düzeyleri tedavi sonrası anlamlı derecede azalmış bulundu. İzole LDL'lerin oksidasyona direnç kapasitesini gösteren t-lag tedavi sonrası dönemde tedavi önceki döneme göre anlamlı derecede uzamış tespit edildi. Plazma TAS düzeyleri de benzer bir değişim göstererek tedavi sonrası dönemde artmış olarak bulundu.

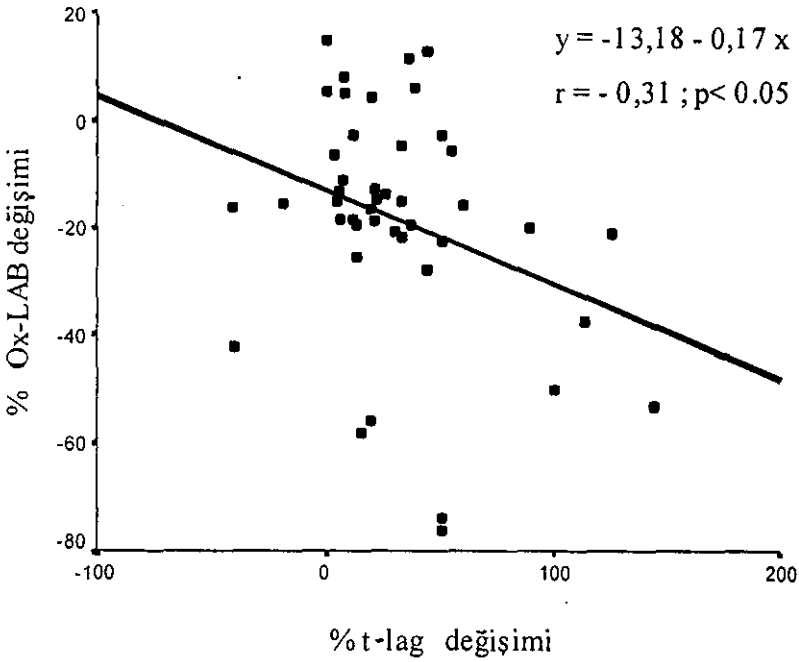
Tedavi öncesi ve sonrası dönemde parametreler incelendiğinde Tablo 4'te görülen anlamlı ilişkiler tespit edilmiştir.

Tablo 4. Tedavi öncesi ve sonrası dönemde biyokimyasal parametreler arası ilişkiler. (r) p

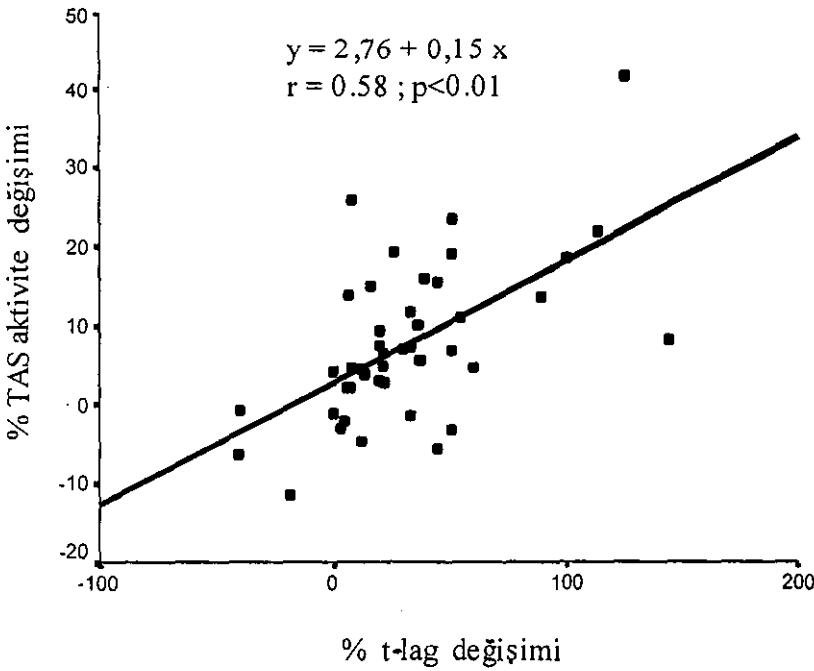
Tedavi Öncesi					
	LDL-K	Apo B	Apo AI	t-lag	TAS
TK	(0.77) 0.001	(0.58) 0.001	-----	(-0.33) 0.027	(-0.32) 0.031
LDL-K	-----	(0.42) 0.05	-----	-----	-----
HDL-K	-----	-----	(0.45) 0.002	-----	-----
t-lag	-----	-----	-----	-----	(0.42) 0.004
Tedavi Sonrası					
	LDL-K	Apo B	Apo AI	t-lag	TAS
TK	(0.94) 0.001	(0.57) 0.001	-----	-----	-----
LDL-K	-----	(0.57) 0.001	-----	-----	-----
t-lag	-----	-----	-----	-----	(0.47) 0.001

Tedavi öncesi dönemde TK düzeyi ile t-lag ve TAS arasında anlamlı negatif korelasyon tespit edildi (Sırasıyla $p < 0.027$, $p < 0.031$). Bu ilişki tedavi sonrası dönemde gözlenmedi. Buna rağmen, gerek tedavi öncesi gerekse tedavi sonrası dönemde t-lag ile TAS arasında anlamlı pozitif korelasyon tespit edildi ($p < 0.01$). Ayrıca yine her iki dönemde serum TK, LDL-K ve Apo B arasında pozitif korelasyonlar gözlemlendi ($p < 0.01$).

Parametrelerin yüzde değişim ilişkileri değerlendirildiğinde, t-lag yüzde değişiminin, Ox-LAB yüzde değişimi ile negatif yönde (Şekil 4), TAS yüzde değişimi ile pozitif yönde ilişkili olduğu tespit edildi (Şekil 5).



Şekil 4. t-lag ve Ox-LAB yüzde değişimi arasındaki ilişki.



Şekil 5. t-lag ve TAS yüzde değışimi arasındaki ilişki.

TK ile LDL-K yüzde değışimleri arasında anlamlı pozitif ilişki olduğu belirlendi ($r=0.93 ; p < 0.001$).

Hastaları hiperkolesterolemik ve mixed tip hiperlipidemik olarak iki gruba ayırıp incelediğimizde Tablo-5 ve 6'da verilen bulgular elde edildi. TK düzeyleri her iki hasta grubunda benzer düzeylerden aynı oranda azalma gösterdi ve hemen hemen aynı düzeylere düştü. TG düzeyleri mixed tip hiperlipidemili hastalarda %35.3'lük düşme ile 310 mg/dL düzeylerinden 198 mg/dL düzeylerine geriledi. LDL-K düzeyleri de her iki grupta yaklaşık %33'lük bir düşüş gösterdi. Hiperkolesterolemik grupta ise TG düzeyleri %12.8'lik bir düşüşle 132 mg/dL'dan 112 mg/dL düzeylerine geriledi. HDL-K düzeylerindeki yüzde değışiklik her iki grupta da yaklaşık %9 civarında iken, mixed tip hiperlipidemik grupta HDL-K 37.8 mg/dL'den 41.2 mg/dL'ye, hiperkolesterolemik grupta 42.7 mg/dL'den 46.5 mg/dL'ye yükseldi. Bu değışikliklerin tümü istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Her iki grup arasında TG düzeyleri ($p < 0.01$) hariç lipid ve lipoprotein değışiklikleri arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$).

Tablo 5. Hiperkolesterolemik hastalarda tedavi öncesi ve sonrası döneme ait biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler

	Tedavi Öncesi (n = 29)	Tedavi Sonrası (n = 29)	% Değişiklik
TK, mg/dL	282±33 ^b	205.3±36.8	- 27.2
TG, mg/dl	132±39 ^b	113± 39	- 12.8
HDL-K, mg/dL	43±7.9 ^b	46.6±8.8	9.3
LDL-K, mg/dL	209.8±29,7 ^b	130.4±34.4	- 35.5
Lp (a), mg/dL	20.5±30.3	19.8±29.5	- 3.4
Apo AI, mg/dL	121 ± 45 ^a	177 ± 98	46.2
Apo B, mg/dL	132 ± 16,5 ^b	101 ± 12,3	- 23,4
Ox-LAB, mU/L	367 ± 294 ^a	265 ± 226	- 21,7
t- lag, dakika	75 ± 21,8 ^b	97 ± 28,3	35,7
TAS, mmol/L	1,40 ± 0,09 ^b	1,50 ± 0,08	7,3

^a p < 0.01, Wilcoxon testine göre

^b p < 0.01, Paired t testine göre

Her iki grup Ox-LAB, TAS ve t-lag açısından değerlendirildiğinde, hiperkolesterolemik grupta bu üç parametre tedavi ile belirgin derecede düzelme gösterirken, mixed tip hiperlipidemik grupta TAS ve Ox-LAB düzeyi daha az düzelme göstermiştir. t-lag'ın ise bu grupta tedaviye anlamlı cevap vermediği görülmektedir (Tablo 6).

Tablo 6. Mixed tip hiperlipidemik hastalarda tedavi öncesi ve sonrası döneme ait biyokimyasal parametrelerdeki değişiklikler.

	Tedavi Öncesi (n = 15)	Tedavi Sonrası (n = 15)	% Değişiklik
TK, mg/dL	289±26 ^c	209±36	- 27,5
TG, mg/dl	310±84 ^c	199±79	- 35,3
HDL-K, mg/dL	37,8±7,7 ^c	41,3±5,9	9,3
LDL-K, mg/dL	189±32,9 ^c	129,5±39,5	- 31
Lp (a), mg/dL	19,8±21,4	18,5±23	- 6,5
Apo AI, mg/dL	123 ± 43 ^a	134 ± 36	8,9
Apo B, mg/dL	142 ± 27 ^c	108 ± 21	- 23,9
Ox-LAB, mU/L	300 ± 176 ^b	263 ± 173	- 12,6
t- lag, dakika	76 ± 29	89 ± 33	22,7
TAS, mmol/L	1,40 ± 0,11 ^c	1,50 ± 0,08	8,1

^a p < 0.01, Wilcoxon testine göre

^b p < 0.05, Wilcoxon testine göre

^c p < 0.01, Paired t testine göre

Hasta grubunun hepsi serum HDL-K risk seviyesine göre iki gruba ayrılıp Ox-LAB, TAS ve t-lag yüzde değişimleri incelendiğinde Tablo 7'deki bulgular elde edilmiştir.

Tablo 7. HDL-K seviyesine göre Ox-LAB , TAS ve t- lag yüzde deęişiklikleri.

	HDL-K, mg/dL	
	35 mg/dL'nin altı (n = 13)	35 mg/dL'nin üzeri (n = 31)
Ox-LAB % değişim	- 15,6 ± 14,3	- 19,9 ± 23,8
TAS % değişim	5,9 ± 7,5	8,3 ± 10,8
t- lag % değişim	17,2 ± 30,2 ^a	37 ,1 ± 39,3

^a p< 0.05

Her iki grup arasında Ox-LAB ve TAS yüzde değişikliklerinde anlamlı farklılık gözlenmezken, HDL-K 35 mg/dl'nin üzerinde olanlarda t-lag yüzde değişikliği anlamlı artmış olarak gözlendi (p<0.05).

5. TARTIŞMA

Statinlerle yapılan çalışmalarda serum TK ve LDL-K düzeylerini düşürmek amaçlanmıştır. Statin tedavisinin değerlendirildiği büyük çalışmalara (REGRESS, 4S, WOSCOPS ve LIPID) göre; LDL-K düzeylerindeki azalma ile, klinik olaylar, KAH'ndan ölüm ve risk azalması arasında, beklenenden farklı bir ilişki bulunmuştur (5-7,49). Kardiyovasküler olaylardaki azalmanın LDL-K'daki azalma ile ilişkisinin zayıf olması üzerine, bunu etkileyen başka mekanizmaların da olabileceği düşünülerek bir çok yeni laboratuvar ve klinik çalışmalar başlatılmıştır. Yapılan çalışmalarda aterosklerotik olayların gelişiminde LDL-K'nın miktarındaki artış kadar LDL'nin fizikokimyasal niteliğinin de önemli yeri olduğu gösterilmiştir. Özellikle small dense LDL'nin diğer alt gruplara göre daha aterojenik olduğu kabul edilmektedir. Bunun sebebi bu tip LDL'nin oksidasyona yatkın oluşu ve total antioksidan savunmadaki azlığıdır. Ox-LDL'nin makrofajlardaki çöpçü reseptörler tarafından alınması ve köpük hücre oluşumunu sağlaması yanında, vücut için yabancı bir molekül olarak immun sistemi uyardığı ve Ox-LAB oluşumuna neden olduğu da bilinmektedir. Aterosklerotik lezyonlarda bu antijen-antikor reaksiyonu sonucu agregasyonlar tespit edilmiştir (35,58). Yapılan çalışmalarla Ox-LDL'ye karşı gelişen otoantikor düzeyi ile aterosklerotik plak progresyon hızı arasındaki pozitif ilişki gösterilmiştir (59,60). Bir diğer çalışmada yüksek antikor düzeyi ile koroner arter restenozu arasındaki ilişki vurgulanmıştır (39).

Bu çalışmadaki temel nokta hiperlipidemi tedavisinin Ox-LAB üzerine etkisinin değerlendirilmesidir. Çalışmada hiperlipidemi tedavisiyle Ox-LAB düzeyinin anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (%18.7). Bu antikor üretimi Ox-LDL olduğu düşünülen bir antijen tarafından uyarıldığı için çalışmamızda LDL'nin oksidasyona yatkınlığı ve plazma TAS birlikte değerlendirilmiştir. LDL'nin oksidasyona yatkınlığı tedavi öncesi döneme göre tedavi sonrası dönemde %31 azalmıştır. Yani LDL'nin oksidasyona direnç kapasitesi yükselmiştir. LDL'nin oksidasyonunda LDL'nin antioksidan kapasitesi (özellikle vitamin E içeriği gibi), yağ asitlerinin cinsi, LDL partikül büyüklüğü ve LDL'nin bulunduğu ortamda üretilen serbest radikal miktarı önemli faktörler arasında sayılmaktadır.

Çalışmamızda hiperlipidemi tedavisi ile in vivo ortamda aterojenik kapasitesi yüksek olan Ox-LDL oluşumunun azaldığı görülmektedir. LDL'nin oksidasyona yatkınlık

derecesi olarak değerlendirdiğimiz t-lag ile plazma TAS arasındaki pozitif ilişki gözlenmesi, azalmış LDL oksidasyonunu ve artmış LDL antioksidan kapasitesini düşündürmektedir. LDL'nin oksidasyona maruz kaldığı en önemli bölge subendotelyal alandır. Bu alana göç eden makrofajlardan açığa çıkan artmış radikal üretiminin bu oksidasyonda önemli rolü vardır. t-lag düzeyi ile Ox-LAB düzeyindeki değişiklik arasında gözlenen ters ilişki ve tedavi sonrası dönemde plazma Ox-LAB düzeyindeki düşüş, LDL'nin oksidasyonu ile antikor üretiminin yakın ilişkide olduğunu düşündürmektedir.

Hastaları hiperkolesterolemik ve mixed tip hiperlipidemik diye ayırıp incelediğimizde her iki gruptaki TK'nın %27 azaldığını, TG'nin ise mixed tipte %35.5 azalırken, hiperkolesterolemik tipte %12.7 azaldığını görüyoruz. Bu değişime göre Ox-LAB, t-lag ve TAS'ı incelediğimizde hiperkolesterolemik grupta TAS ve t-lagdaki artma ve Ox-LAB düzeyindeki düşme, mixed tipe göre daha belirgindi ($p<0.01$). t-lag düzeyindeki değişiklik mixed tip hiperlipidemiklerde anlamlı bulunmadı. Bu bulgulara göre mixed tip hiperlipidemi tedavisinin bu üç parametre üzerine etkisi, hiperkolesterolemik grupta gözlenen kadar belirgin değildi. Yapılan çalışmalarda hipertrigliseridemi KAH için bağımsız bir risk faktörü olarak değerlendirilmiştir (61,62). Burada özellikle yüksek TG düzeylerinin, yüksek small dense LDL düzeyi ve düşük HDL düzeyleri ile olan ilişkisi önemli rol oynar (61,62). Small dense LDL oksidasyona yatkınlığı en yüksek olan LDL alt grubudur.

Her iki grubun tedavi öncesi ve tedavi sonrası dönemde TK düzeylerinin birbirine çok yakın olmasına rağmen, tedavi sonrası TG düzeyleri mixed tipte 199 mg/dl, hiperkolesterolemik grupta ise 112 mg/dl düzeylerine inmiştir. Krauss ve arkadaşları (59) TG için 160 mg/dl'lik sınır değerinin LDL büyüklüğünü belirlemede (TG 160 mg/dl'nin altında LDL >255 A⁰, TG 160 mg/dl'nin üzerinde LDL <255 A⁰) önemli bir yeri olduğunu vurgulamışlar ve small dense LDL'li kişilerin %65'inde 160 mg/dl'nin üzerinde TG düzeyleri belirlemişlerdir. Bu çalışmada mixed tip hiperlipidemilerde TG düzeyleri yaklaşık %35.5 düşürülmüş, fakat 160 mg/dL düzeyine ulaşılammıştır. Bu kişilerde small dense LDL düzeyinin yüksek olabileceği ve bunun da t-lag'daki artışın bu grupta yetersiz olma nedenini açıklayabileceği düşünülebilir.

HDL gerek ters kolesterol taşınımı ile gerekse antioksidan özelliğinden dolayı LDL'nin oksidasyonunu önlemekte önemli rol oynar. Hastaları HDL-K'sı risk sınır değeri olan 35 mg/dL'in altında (n=13) ve üzerinde (n=31) olarak ayırdığımızda (Tablo 7), HDL-K'sı yüksek olan grupta Ox-LAB düzeyindeki düşme biraz daha fazla gözlenmesine

rağmen bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Aynı anlamsız artış plazma TAS düzeylerinde de gözlemlendi. Bunlara rağmen t-lag düzeyindeki uzama 35 mg/dL üzerinde HDL-K düzeyi olan kişilerde bu düzeyin altındakilere göre anlamlı olarak yüksekti (%17.2'ye karşılık %37.1) ($p<0.05$). Bu durum HDL'nin plazmadaki LDL'nin oksidasyona direnç kapasitesi üzerinde önemli etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Aterosklerotik gelişim sürecinde, LDL'nin oksidasyonu ve oluşan Ox-LDL'nin toksik etkilerinin önemli rolü olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ox-LDL'yi in vivo şartlarda göstermek çok zordur. Çünkü çoğunlukla subendotelial alanda gelişir ve makrofajlarca hızlı bir şekilde toplanarak köpük hücre oluşumuna katılır. Plazmada Ox-LAB ölçülmesi in vivo LDL oksidasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Virella ve arkadaşları bu antikorları asemptomatik gençlerde göstermişler ve modifiye LDL'ye karşı gelişen bu immun cevabın aterosklerotik işlemin erken başlatıcı faktörlerinden biri olabileceğini ileri sürmüşlerdir (63). Dolayısıyla bu antikorların aterosklerozun başlamasında ve gelişiminde erken bir marker olarak değerlendirilebileceği ve özellikle primer korunmada, hiperlipidemi tedavisinin takibinde lipid profiliyle birlikte değerlendirilmesi gereken biyokimyasal markerlerden biri olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmaya göre tedaviyle birlikte antikor düzeyinde gözlediğimiz düşme antiaterojenik bir etki olarak değerlendirilebilir. Ayrıca antikor düzeyindeki azalmanın plazma TAS ve LDL oksidasyon kapasitesiyle yakın ilişkisi olduğu gözlenmiştir. Bazı koroner arter hastalarında plazma lipid düzeylerinin normal sınırlarda olması, bu hastalardaki LDL oksidasyon kapasitesinin yüksek veya Ox-LDL'ye karşı immun cevabın daha belirgin olması gibi faktörlerin etkili olabileceğini akla getirmektedir. Ayrıca bu çalışmada gözlenen plazma TAS ile LDL oksidasyon kapasitesi arasındaki ters ilişki, hipolipidemik tedaviyle birlikte vücudun antioksidan kapasitesine yapılabilecek desteğin antiaterosklerotik bir etki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, hipolipidemik tedaviyle sadece plazma lipid ve lipoprotein düzeylerinde bir düzelme elde edilmeyip, aynı zamanda aterojenik bir lipoprotein olan LDL'nin niteliğinde de önemli derecede değişiklikler sağlanmaktadır. Bu değişikliklerin ateroskleroz gelişimini negatif yönde etkilediği düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1- Hiperlipidemik hastaların hipolipidemik tedavisi sırasında:

a- Hem hiperkolesterolemik hem de mixed tip hiperlipidemik hasta grubunda istenen LDL-K düzeylerine ulaşıldı. Tedavi sonrası TK, TG, HDL-K, Apo AI ve Apo B düzeylerinde anlamlı değişiklikler izlendi. TK, TG, Apo B düzeyinde azalma, HDL-K, Apo AI düzeylerinde artma tespit edildi. Hiperkolesterolemik grupta TK %27.2, LDL-K %35.5, TG %12.8 azalırken, mixed tip hiperlipidemik grupta TK %27.5, LDL-K %31 ve TG %35.3'lük azalma gösterdi. Lp (a) düzeyinde anlamlı değişiklik izlenmedi.

b- Tedavi sonrası Ox-LAB düzeyinde anlamlı azalma, t-lag ve TAS düzeyinde anlamlı artma bulundu. Hastalar hiperkolesterolemik ve mixed tip hiperlipidemik olarak ayrı ayrı incelendiğinde mixed tip hiperlipidemik grupta TAS ve ox-LAB düzeylerinde hiperkolesterolemik gruba göre daha az oranda artış tespit edildi, t-lag'da ise anlamlı değişiklik gözlenmedi.

c- Tedavi öncesi dönemde TK düzeyi ile TAS ve t-lag arasında anlamlı negatif ilişki gözlemlendi. Hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrası dönemde t-lag ile TAS arasında anlamlı pozitif ilişki tespit edildi. Her iki dönemde TK, LDL-K ve Apo-B arasında beklenen ilişkiler gözlemlendi.

d- t-lag yüzde değişiminin Ox-LAB yüzde değişimi ile negatif, TAS yüzde değişimi ile pozitif ilişkili olduğu gözlemlendi. TK yüzde değişimi ile LDL-K yüzde değişimi arasında da anlamlı pozitif ilişki tespit edildi.

e- Hastalar HDL-K düzeylerine göre 35 mg/dl'nin altında ve üzerinde olmak üzere iki gruba ayrılıp incelendiğinde; her iki grupta Ox-LAB ve TAS yüzde değişimi arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, HDL-K'ü 35 mg/dl üzerinde olanlarda t-lag yüzde değişiminde anlamlı artış gözlemlendi.

2- Hiperlipidemi tedavisi sırasında lipid profili ile birlikte Ox-LAB düzeyinin ölçülmesi in vivo aterosklerotik sürecin değerlendirilmesinde iyi bir marker olabilir.

3- Bu antikorların oluşumunda indirekt etkisi olan azalmış antioksidan kapasitenin, KAH riski taşıyan kişilerde özellikle aterosklerotik olayların yoğunlaştığı dönemlerde desteklenmesinin faydalı olabileceği düşünülebilir.

4- Bu çalışmada lipid düşürücü tedavinin otoantikör seviyesi üzerine etkisi değerlendirildi. Aynı zamanda immun sistemin de bu otoantikörlerin üretilmesine etkisini değerlendirecek ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşüncesine varıldı.

7. ÖZET

Ox-LDL ateroskleroz gelişiminde önemli bir rol oynar. LDL'nin oksidatif modifikasyonu, onun makrofajlarda hızlıca birikimi ve köpük hücrelerinin oluşumu için gereklidir. Plazmadaki yüksek antioksidan madde seviyesinden dolayı LDL oksidasyonunun esas olarak aktive lökosit ve endotel hücrelerinden ortaya çıkan reaktif oksijen moleküllerinin fazla miktarda bulunduğu arteriyel duvarın subendotelyal bölgesinde olduğu bilinmektedir. Ox-LDL'ye karşı gelişen antikorlar(Ox-LAB) direkt olarak in vivo LDL oksidasyonunu gösterir. Bir çok çalışma serumdaki antikor miktarının aterosklerotik plak gelişim hızı ile doğru orantılı olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmanın amacı, hiperlipidemili hastalarda lipid düşürücü tedavinin (atorvastatin kullanımı) Ox-LAB üzerine etkisini belirlemek ve aynı zamanda antikorlar, LDL oksidasyon kapasitesi ve plazma total antioksidan status (TAS) arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Hiperlipidemili 44 hastada (29 hiperkolesterolemik, 15 mixed tip hiperlipidemik) t-lag ile izole LDL'nin antioksidan kapasitesi, lipid, lipoprotein, TAS ve ox-LAB düzeyleri tespit edildi. Tedavi sonrası t-lag ve plazma TAS düzeyi artarken (sırasıyla %31.3 ve %7.6), plazma Ox-LAB düzeyi anlamlı olarak (%18.7) azalmış bulundu. t-lag değişim yüzdesi Ox-LAB değişim yüzdesi ile negatif ilişkili bulundu ($r=-0.31$, $p<0.05$). Aynı zamanda t-lag yüzde değişimi TAS yüzde değişimi ile pozitif bir ilişki gösterdi ($r=0.58$, $p<0.01$). Hiperkolesterolemili hastalarda Ox-LAB %21.7 kadar azalma gösterdi, bu değişiklik mixed tip hiperlipidemili hastalarda %12.6 idi. Aynı zamanda hiperkolesterolemik hastalarda Ox-LAB düzeyleri mixed tip hiperlipidemik olan hastalardan daha yüksekti (367 ± 294 ve 300 ± 176).

Sonuç olarak, lipid düşürücü tedavi Ox-LDL'ye karşı oluşan antikor düzeylerindeki azalmaya ve plazmadaki LDL'nin antioksidan kapasitesi ve TAS'daki artmaya katkı sağlayabilmektedir. Aynı zamanda lipid düşürücü tedavi sırasında Ox-LDL'ye karşı oluşan antikorların ölçümünün in vivo LDL oksidasyonu ve aterosklerotik süreci gösteren önemli bir marker olarak kullanılabileceği önerilmektedir.

8. SUMMARY

The effect of lipid-lowering therapy on the levels of serum antibodies against oxidized LDL and its relationships with LDL oxidation capacity and plasma total antioxidant status

Oxidized low density lipoproteins (Ox-LDL) are believed to play an important role in the progression of atherosclerosis. Oxidative modification of LDL is a prerequisite for rapid accumulation of LDL in macrophages and for the formation of foam cells. Because of high antioxidants levels in plasma, LDL oxidation is suggested to occur mainly in subendothelial space of the arterial wall, where the concomitant presence of large amounts of reactive oxygen species generated by endothelial cells and activated leukocytes. After Ox-LDL formation, antibodies against this form of LDL may occur. Antibodies against Ox-LDL show directly in vivo LDL oxidation. Many studies have indicated that the amount of antibodies in serum to be positively correlated to the rate of progression of atherosclerotic plaques.

The purpose of the study was to determine the effects of lipid-lowering therapy (by using Atorvastatin) on the levels of Ox-LDL antibodies (Ox-LAB) in the patients with hyperlipidemia and also investigate the relationships among the antibodies, plasma total antioxidant status (TAS) and LDL oxidation capacity.

Serum levels of Ox-LAB, lipids, lipoproteins, TAS and antioxidant capacity of isolated LDL by using lag time (t-lag) in 44 patients with hyperlipidemia (29 of hypercholesterolemia and 15 of mixed type hyperlipidemia) were determined. After treatment, serum levels of Ox-LAB were found to be significantly decreased by 18.7 %, while t-lag and the levels of plasma TAS were increased (31.3 % and 7.6 %, respectively). The per cent change of t-lag was found to be negatively correlated the per cent change of Ox-LAB ($r=-0.31$, $p<0.05$). Also the per cent change of t-lag levels showed a positive correlation with per cent change of TAS ($r=0.58$, $p<0.01$). Ox-LAB levels in patients with hypercholesterolemia showed a decrease by 21.7 %, this change was 12.6 % in patients with mixed type hyperlipidemia. Also the Ox-LAB levels in patients with hypercholesterolemia were higher than those of mixed type hyperlipidemic group (367 ± 294 vs 300 ± 176 mU/L).

It was concluded that lipid-lowering therapy may contribute to reduce the levels of antibodies against Ox-LDL and increase the antioxidant capacity of plasma LDL and TAS. It was also suggested that measurement of the antibodies during the lipid-lowering therapy may be used an important marker for representing in vivo LDL oxidation and atherosclerotic processes.

9. KAYNAKLAR

1. National Heart, Lung, and Blood Institute. Morbidity from coronary heart disease in the United State. NHLBI Data Fact Sheet, June 1990.
2. Superko H R, Krauss R M: Coronary artery disease regression: convincing evidence for the benefit of aggressive lipoprotein management. *Circulation* 1994;90:1056-1069.
3. The Canadian Consensus Conference on Cholesterol. Final Report. *Can. Med. Assoc. J.* 1988;26:369-388.
4. Pekkanen J, Tervahuata M, Nissinen A, Karvonen M J: Does the predictive value of baseline coronary risk factors change over a 30-years follow up? *Cardiology* 1993;82:181-190.
5. Jukema J W, Bruschke A V G, van Boven A J, et al.: Effects of lipid lowering by pravastatin on progression of coronary artery disease in symptomatic men with to moderately elevated serum cholesterol levels: the Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *Circulation* 1995;91:2528-2540.
6. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998;97:1440-1445.
7. Tonldn A: For the Long Term Intervention With Pravastatin In Ischemic Disease (LIPID) paper presented at:70th Scientific Session of the American Heart Association. Nowember 12, 1997. Orlando, Fla.
8. American Heart Association. Heart an Stroke Facts. 1995 Statistical Supplement, American Heart Association. 1994.
9. Onat A, Keleş İ, Aksu H ve ark.: Türk erişkinlerinde toplam ve kardiyak olayların prevalansı: TEKHARF Çalışmasının 8-yıllık takip verileri. *Türk Kardiol. Dern. Arş.* 1999;27:8-14.

10. Summary of second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (adults treatment panel 2). JAMA 1993; 269-3015.
11. Stason W B: Cost of benefits of risk factor reduction for coronary heart disease: In sights from screening and treatment of serum cholesterol. Am. Heart J. 1990; 119: 718-724.
12. Müller C: Xanthomata, hypercholesterolemia, angina pectoris. Acta Med. Scand. 1938;89 (suppl): 75-84.
13. Thannhauser S J, Magendatz H: The different clinical groups of xanthomatous disease: a clinical physiological study of 22 cases. Ann. Intern Med. 1938;11:1662-1746.
14. Kannel W B, Castelli W P, Gordon T: Cholesterol in the prediction of atherosclerotic disease: new perspectives based on the Framingham Study. Ann. Intern Med. 1979;90:85-91.
15. Martin M H, Hulley S B, Browner W S, Kuller H L, Wentworth D: Serum cholesterol, blood pressure, and mortality: implications from a cohort of 361662 men. Lancet 1986;ii:933-930.
16. Robertson T L, Kato H, Rhoads G G, et al.: Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: Incidence of myocardial infarction and death from coronary heart disease. Am J. Cardiol. 1997;39:239.
17. Grover S A, Coupall, Hu X P: Identifying adults at increased risk of coronary disease: how well do the current cholesterol guidelines work? JAMA 1995;274:801-806.
18. Stein E A: Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. In Tietz, Textbook of Clinical Chemistry. WB Saunders Company. Philadelphia 1986; pp:829-926.
19. Keha E E, Kührevioğlu Ö İ: Biyokimya. Şafak Yayınevi 1997; S:182.
20. Thompson G R: Hiperlipidemi El Kitabı (Çev. Enis Tağumur). Uycan Yay. A.Ş. 1989;23-41.

21. Stone W L, Heinberg M, Scott L S, Le Chair I, Wilcox G H: Altered hepatic catabolism of low density lipoprotein subject to lipid peroxidation in vitro. *Biochem J*, 1994;297:573-579.
22. Esterbauer H, Gebicki J, Phul H H, Jürgens G: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. Med.* 1992; 13:341-390.
23. Mahley R W: Aterogenezin Hücresel ve Moleküler Biyolojisi, Kolesterol Taşınması ve Lipoprotein Metabolizması. O Gökdemir, K E Raloğlu (Editörler). Amerikan Hastanesi Lipid Kliniği İstanbul. 1995; s:146-150.
24. Fruebis J, Bird D A, Rottison J, Rolinski W: Extent of antioxidant protection of plasma LDL is not a predictor of the atherogenic effect of antioxidants. *J Lipid Res.* 1997;38(12):2455-64.
25. Kleinueld H A, Naber A H J, Stalenhoef A F H, Democker PM: Oxidation resistance, oxidation rate and extent of oxidation of human low density lipoprotein depend on the ratio of oleic acid content to linoleic acid content: Studies in Vitamin E deficient subjects. *Free Rad. Biol. Med.* 1993;15:273-280.
26. Esterbauer H, Jürgens G, Quenlenberger O, Koller E: Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes *J Lipid Res.* 1987;28:495-509.
27. Fuhrman B, Judith O, Keider S, Yoish L B, Kaplan M, Aviram M: Increased uptake receptor activity and of a further progressive oxidation of LDL *Free Rad. Biol. Med.* 1997;23:34-36.
28. Esterbauer H, Dieber-Rotheneder M, Waeg G, Puhl H, Tatzber F: Endogenous antioxidants and lipoprotein oxidation . *Biochem. Soc. Trans.* 1990;18:1059-61.
29. Parthasarathy S, Khoo J C, Miller E, Barnett J, Witztum J L, Steinberg D: Low density lipoprotein rich in oleic acid is protected against oxidative modification: implications for dietary prevention of atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990;87:3894-8.
30. Tribbie D L, Holl L G, Wood P D, Krauss R M: Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subsfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis* 1992;93:189-89.

31. Loughrey C, Young I: Indirect Assays of Lipid Peroxidation. In Handbook Of Lipoprotein Testing. Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH (Eds.). 2nd Edition AACC Press Washington 2000; pp: 441-464.
32. Salonen J T, Nyssonen K, Salonen R, Porkkala-Sarataho E, Tuomainen T P, Diczfalusy U, Bjorkhem I: Lipoprotein oxidation and progression of carotid atherosclerosis. *Circulation* 1997;95:840-5.
33. Van de Vijver L P, Kardinaal A F, van Duyvenvoorde W, Kruijssen D A, Grobbee D E, van Poppel G, Princen H M: Oxidation of LDL and extent of peripheral atherosclerosis. *Free Radic. Res.* 1999;31:129-39.
34. Gersony, Fuster V: Atherogenesis In Handbook of Lipoprotein Testing. Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH (Eds.). 2nd Edition. AACC Press Washington 2000;pp:31-46.
35. Yla-Herttuala S, Polinski W, Beutler S, Pcard S, Steinberg D, Witztum JL: Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognize epitopes of oxidized LDL. *Atheroscler Thromb.* 1994;14:32-40.
36. Witztum J L, Steinberg D: Role of oxidized Low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin. Invest* 1991; 88:1785-1791.
37. Amengual O, Atsum T, Khemashta M A, Tinahones F, Huges G R V: Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in antiphospholipid syndrome. *Br. J. Rheum.* 1997;36:964-968.
38. Kim J G, Sabbogh F, Santaram N, Wilcox J N, Medfer R M, Parthasarathy S: Generation of a polyclonal antibody against lipid peroxide modified proteins. *Free Rad. Biol. Med.* 1997;23:251-259.
39. Eber B, Schumacher M, Tatzber F, et al.: Autoantibodies to oxidized low density lipoproteins in restenosis following coronary angioplasty. *Cardiology* 1994;84:310-315.
40. Salonen J T, Herttuala S Y, Yamamoto R, Beutler S, Koppela H, Salonen R, Nyssonen K, Pualinsk: Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1989;339:883-886.

41. Branch D W, Mitchell M D, Miller E, Palinski W, Witztum JL: Preeclampsia and serum autoantibodies to oxidized low density lipoprotein . *Lancet* 1994; 343:645-646.
42. Puurunen M, Manttarri M, Manninen V: Antibodies against oxidized low density lipoprotein predict myocardial infarction. *Arch. Intern Med.* 1997;154:2605-2609.
43. Maggi E, Finardi G, Polzi M, Bollati P, Fillipponi M, Stefano PL, Paolini G, Gressi A, Clot P, Albaro E: Specificity autoantibodies against oxidized LDL as an additional marker for atherosclerotic risk. *Coronary Artery Dis.* 1993;4:1119-1122.
44. Maggi E, Belezzi R, Gazo A Seccia M Bellona G: Autoantibodies against oxidatively modified LDL in uremic patients undergoes dialysis. *Kidney Int* 1994;46:869-876.
45. Vaanalo O, Alghan G, Jauhiainen N, Leirizolo-Ripo M Aho K, Palosua T: Crossreaction between antibodies to oxidized low density lipoprotein and cardiolipin in systemic lupus erythematosus. *Lancet* 1993;341:923-925.
46. Orekhov A N, Tentov V V, Kabokov A E, Adamow I Y, Pokrovsky S N, Smirnov V N: Autoantibodies against modified low density Lipoprotein: Nonlipid factor of blood plasma that stimulates foam cell formation. *Arterioscler. Thromb.* 1991;11:316-326.
47. Isbir T: Antioksidan sistemler. Endotel, İzmir Tabip Odası Tıpta Temel Bilimler Kolu Sonbahar Okulu, İzmir. *Ekim* 1994; s:92-98.
48. Treating to Meet NCEP-Recommended LDL Cholesterol Concentrations with Atorvastatin, Fluvastatin, Lovastatin, or Simvastatin in Patients with Risk Factors for Coronary Heart Disease. *J Fam Pract* 1998;47:349-356.
49. Jones P, Kafonek S, Laurora I, et. al.: Comparative Dose Efficacy Study of Atorvastatin Versus Simvastatin, Pravastatin, Lovastatin, and Fluvastatin in Patients With Hypercholesterolemia (The CURVES Study). *Am J Cardiol.* 1998;81:582-587.
50. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Baseline serum cholesterol and treatment effect in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1995;345:1274.
51. Sacks F M, Pfeffer M A, Moya L A, et al.: Cholesterol And Recurrent Events (CARE). *N Engl J Med* 1996;335:1001-1009.
52. Downs J R, Gotto A M Jr.: Design and rationale of the Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *Am J Cardiol.* 1997; 80:287-293.

53. Treasure C B, Klein J I, Weintraub W S, et al.: Beneficial effects of cholesterol lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 1995;332:481-487.
54. Le Quan Sang K H, Levenson J, Megnien J L, et al.: Platelet cytosolic Ca^{+2} and membrane dynamics in patients with primary hypercholesterolemia: effects of pravastatin. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol.* 1995;15:759-764.
55. Weber C, Erl W, Weber K S C: HMG-CoA reductase inhibitors decrease CD I 1b expression and CD I 1b-dependent adhesion of monocytes to endothelium and reduce increased adhesiveness of monocytes isolated from patients with hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 1997;30:1212-1217.
56. Negre-Aminoux P, van Vliet A K, van Erck M, et al.: Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors: comparison with other human cell types. *Biochem Biophys Acta.* 1997;1345:259-268.
57. Clarkson T B, Bond M G, Bullock B C, Marzetta C A: A study of atherosclerosis regression in *Macaca mulatta*. *Exp. Mol. Pathol.* 1981;34:345-368.
58. Palinski W, Rosenfeld M E, Yla-Herttuala S, et al.: Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989;86:1372-1376.
59. Lehtimaki T, Lehtinen S, Solakivi T, et al.: Autoantibodies against oxidized low density lipoprotein in patients with angiographically verified coronary artery disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999;19:23-27.
60. Salonen J T, Yla-Herttuala S, Yamamoto R, et al.: Autoantibody against oxidized LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992;339:883-887.
61. Gotto M A, Dphil M D: Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1998;82:22-25.
62. Krauss R M, Berkeley M D: Triglycerides and Atherogenic Lipoproteins: Rational for Lipid Management. *J Med.* 1998;105(1A):58S-62S.
63. Virella G, Virella I, Leman R B, et al.: Antioxidized low density lipoprotein antibodies in patients with coronary disease and normal healthy volunteers. *Int J Clin. Lab. Res.* 1993; 23: 95-101.

ÖZGEÇMİŞ

1971 yılında Trabzon'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimlerini 1988 yılında Trabzon'da tamamladı. 1994 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden dönem birincisi olarak mezun oldu. Ağustos 1994 - Ocak 1996 tarihleri arasında Tonya Devlet Hastanesi ve Trabzon 5 No'lu Merkez Sağlık Ocağı'nda pratisyen hekim olarak çalıştı. 6 Şubat 1996 tarihinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalında uzmanlık eğitimine başladı. Halen aynı Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.