



**DİSLİPİDEMİ OLUŞTURULAN ERKEK RATLARDA TEŞHİS
AMAÇLI SERBEST GLİSEROL İLE KOLESTEROL ESTER
KULLANIMININ İNCELENMESİ**

Annour ADOUM BATIL

Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Özgür KAYNAR

Doktora Tezi-2020

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİSLİPİDEMİ OLUŞTURULAN ERKEK RATLARDA
TEŞHİS AMAÇLI SERBEST GLİSEROL İLE
KOLESTEROL ESTER KULLANIMININ İNCELENMESİ**

Annour Adoum BATIL

**Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Özgür KAYNAR**

**ERZURUM
2020**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	IX
TABLolar DİZİNİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Lipidler.....	4
2.1.1. Lipoproteinler	4
2.1.2. Şilomikronlar, VLDL, IDL, LDL ve HDL	7
2.1.3. Lipoproteinlerdeki Temel Lipitler	12
2.2. Dislipidemiler	16
2.2.1. Hiperkolesterolemi.....	16
2.2.2. Hipertrigliseridemi.....	17
2.3. Dislipidemilerin Laboratuvar Değerlendirmesi	18
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Deney Hayvanları	22
3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar.....	22
3.3. Çalışmada Kullanılan İlaç.....	23
3.4. Metot.....	23
3.4.1. Deneysel Uygulamalar.....	23
3.4.2. Deney Sonunda Numunelerin Alınması	24

3.5. Çalışmanın Biyokimyasal İncelenmesi.....	25
3.5.1. HDL-Kolesterol Düzeyinin Ölçülmesi	25
3.5.2. LDL-Kolesterol Düzeyinin Ölçülmesi.....	26
3.5.3. Trigliserit Analizi.....	28
3.5.4. Serbest Gliserol Analizi	29
3.5.5. Gerçek Trigliserid Konsantrasyonunun Hesaplanması.....	31
3.5.6. Total Kolesterol Analizi.....	31
3.5.7. KETP Ekspresyon Analizi	32
3.5.8. LKAT Aktivite analizi	34
3.5.9. Kolesterol Ester Oranının Belirlenmesi (YPİTK Metod)	36
3.6. İstatistik Analiz	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Spektrofotometrik Bulgular	37
4.2. Kromatografik Bulgular.....	47
5. TARTIŞMA.....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
KAYNAKLAR	65
EKLER	83
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	83
EK-2.ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....	84
EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU	85
EK-4. TEZ ADI DEĞİŞİKLİK BİLDİRİM FORMU.....	87

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca ve bu tezi hazırlamamda bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, karşıma çıkan her türlü sorunda desteğini her zaman hissettiğim sayın danışmanım Prof. Dr. Özgür KAYNAR'a saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yine bu süreç içerisinde bilgi ve deneyimleriyle tüm desteklerini bana sunan sayın hocalarım Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR' e, Prof. Dr. Mesut Bünyami HALICI'ya, Prof. Dr. Necati UTLU'ya, Doç. Dr. Seçkin ÖZKANLAR'a, Doç. Dr. Betül APAYDIN YILDIRIM'a, Dr. Öğr. Üyesi Sefa KÜÇÜKLER'e, Arş. Gör. Dr. Mustafa İERİTÜRK'e ve Arş. Gör. Dr. Cihan GÜR'e ve tez izleme komitemde yer alan Doç. Dr. Mustafa ÖZKARACA'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yine, bu çalışmayı 119S165 proje kodu ile destekleyen TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Uzakta olmalarına rağmen bana her türlü desteği sağlayan anneme, babama ve eşime, yanında olmadığım oğlum İsa'ya ve kızım Lena'ya teşekkürlerimi sunarım.

Annour Adoum BATIL

ÖZET

Dislipidemi Oluşturulan Erkek Ratlarda Teşhis Amaçlı Serbest Gliserol ile Kolesterol Ester Kullanımının İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı, plazma serbest gliserol düzeyi ile kolesterol ester oranının doğru dislipidemi tanısı koymada güvenilirliğini ortaya koymaktır.

Materyal ve Metod: Çalışmada 420 ± 25 gr ağırlığında 70 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat, her grupta 10 rat adet olacak şekilde 7 gruba ayrıldı: 1. Grup (Kontrol); normal rat diyeti ile beslendi. 2., 3., 4. ve 5. Gruplar (Karışık hiperlipidemi grupları); Kontrol diyetine ilave olarak sırasıyla 0.1, 0.5, 1, ve 2 mg/kg/im dekzametazon enjekte edildi. 6. Grup (Hipertrigliseridemi); Hiperlipidemik diyet + % 10 fruktoz ile beslendi. 7. Grup (Hiperkolesterolemi); Aterojenik diyet + %3 kolesterol - %1 sodyum deoksikolat ile beslendi. 1. hafta sonunda dekzametazon grubundaki ratlardan, 8. hafta sonunda ise kontrol, hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemi grubundaki ratlardan sevofloran anestezisi altında *vena jugularis*'ten lityum heparin içeren tüpe kan alındı. Kan tüpleri 3000 rpm 10 dk süreyle santrifüj edilerek plazmalar elde edildi.

Bu plazmalarda HDL, LDL, trigliserid, serbest gliserol, ve total kolesterol düzeyleri, KETP ekspresyon düzeyi, LKAT aktivite analizi, kolesterol esteri, trigliserid, serbest yağ asidi, kolesterol ve fosfolipid oranları tespit edildi.

Bulgular: Hiperkolesterolemi grubunda enzimatik total kolesterol ölçüm kitinin hiperkolesterolemiyi doğru pozitif tespit ettiği, kolesterol ester oranının dislipidemi tanısını etkileyemediği görüldü. Bunun yanında hipertrigliseridemi grubunda enzimatik trigliserid ölçüm kitinin hipertrigliseridemiyi doğru pozitif tespit ettiği, serbest gliserol miktarının ise dislipidemi tanısını etkileyemediği görüldü. Ancak özellikle kritik değerdeki hiperkolesterolemi (200 mg/dL) yada hipertrigliseridemi (200 mg/dL) durumlarında sırasıyla plazma kolesterol esteri ile serbest gliserolünün yanlış dislipidemi (yanlış pozitif) teşhisine sebep olabilecek düzeyde değişebildiği tespit edildi.

Sonuç: Doğru hiperkolesterolemi tanısı koymak için ise sadece total kolesterol ölçümü yerine "total kolesterol, serbest kolesterol, ve kolesterol ester" düzeylerinin ölçülmesi, diğer yandan doğru hipertrigliseridemi tanısı koymak için ise "serbest gliserol"ün trigliserid ölçümünde blank olarak kullanılması kesinlikle önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Dislipidemi, Hiperkolesterolemi, Hipertrigliseridemi, Kesin Teşhis, Serbest Gliserol, Kolesterol Esteri

ABSTRACT

Investigation of Diagnostic Use of Free Glycerol and Cholesterol Ester in Dyslipidemia Induced Male Rats

Aim: The purpose of this study to evaluate the reliability of plasma free glycerol level and cholesterol ester ratio in correct diagnosis of dyslipidemia.

Material and method: In the study, 70 Spraque-Dawley male rats weighing 420 ± 25 g were divided into 7 groups, with 10 rats per group: Group 1 (Control); Rats were fed with normal rat diet. Groups 2, 3, 4 and 5 (Mixed hyperlipidemia groups); In addition to the control diet, 0.1, 0.5, 1, and 2 mg/kg/im dexamethasone were injected, respectively. Group 6 (Hypertriglyceridemia); Rats were fed with a hyperlipidemic diet + 10% fructose. Group 7 (Hypercholesterolemia); Rats were fed an atherogenic diet + 3% cholesterol - 1% sodium deoxycholate. The bloods were taken from the vena jugularis of the dexamethasone group rats at the end of the 1st week and from the control, hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia group rats at the end of the 8th week of the experiment into lithium heparin containing tubes. The blood tubes were centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm, and plasma were obtained.

These plasma used in the analysis of HDL, LDL, triglyceride, free glycerol, and total cholesterol levels, KETP expression level, LKAT activity, ratios of cholesterol ester, triglyceride, free fatty acid, cholesterol and phospholipid.

Results: The enzymatic total cholesterol assay kit correctly dedected hypercholesterolemia, and the cholesterol ester ratio did not affect the diagnosis of dyslipidemia in the hypercholesterolemia group. Besides, in the hypertriglyceridemia group, the enzymatic triglycerides assay kit correctly detected hypertriglyceridemia and the amount of free glycerol did not affect the diagnosis of dyslipidemia. However, it was found that especially in critical levels of hypercholesterolemia (200 mg/dL) or hypertriglyceridemia (200 mg/dL), changes in the levels of plasma cholesterol esters and free glycerol may cause the diagnosis of false dyslipidemia (false positive), respectively.

Conclusion: It is strongly recommended to measure "total cholesterol, free cholesterol, and cholesterol ester" levels instead only of total cholesterol measurement to diagnose correct hypercholesterolemia, and use "free glycerol" as a blank for triglyceride measurement to diagnose correct hypertriglyceridemia.

Key Words: Dyslipidemia, Hypercholesterolemia, Hypertriglyceridemia, Definitive diagnosis, Free Glycerol, Cholesterol Ester

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABKA1	:	ATP-bağlayıcı kaset A1
ADP	:	Adenozin difosfat
AdTP	:	Adult Treatment Panel
AH	:	Ailesel hiperkolesterolemi
AKH	:	Ailesel kombine hiperlipidemi
4-AAP	:	4-aminoantipirin
Apo	:	Apolipoprotein
ATADEM	:	Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezi
ATP	:	Adenozin trifosfat
BHB	:	β -hidroksibutirat
CRMLN	:	Cholesterol Reference Method Laboratory Network
DAP	:	Dihidroksiaseton fosfat
FBP	:	Fruktoz bifosfat
FE	:	Fosfatidiletanolamin
Fİ	:	Fosfatidilinositol
FK	:	Fosfatidilkolin
FKH	:	Ailesel kombine hiperlipidemi
FK/SM	:	Fosfatidilkolin / sfingomiyelin
FL	:	Fosfolipid
FS	:	Fosfatidilserin
G-1-P	:	Gliserol-1-fosfat
GK	:	Gliserol kinaz
GPO	:	Gliserol fosfat oksidaz
GTAG	:	Gerçek trigliserid
HDL	:	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HeAH	:	Heterozigot ailesel hiperkolesterolemi

HoAH	: Homozigot ailesel hiperkolesterolemi
HRP	: Horseradish peroksidaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HTG	: Hipertrigliseridemi
IDL	: Ara yoğunluklu lipoprotein
KAH	: Koroner arter hastalığı
KETP	: Kolesterol ester transfer protein
KKH	: Koroner kalp hastalığı
KOL	: Kolesterol
KOLE	: Kolesterol esteri
KPL	: Kapiller lipoprotein lipaz
KVH	: Kardiyovasküler hastalık
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LFK	: Lizofosfatidilkolin
LKAT	: Lesitin-kolesterol açıl transferaz
LPL	: Lipoprotein lipaz
NEFA	: Esterleştirilmemiş yağ asitleri
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
ÖTAG	: Ölçülen trigliserid
PL	: Plazma
POD	: Peroksidaz
SDS	: Sodyum dodesilsülfat
SDS-PAJE	: Sodyum Dodesilsülfat Poliakrilamid Jel elektroforezi
SGLİ	: Serbest gliserol
SKOL	: Serbest kolesterol
SM	: Sfingomiyelin
SS	: Standart sapma

SSPA	:	Sodyum N-etil-N- (3-sülfopropil) m-anisidin
SYA	:	Serbest yağ asidi
TG	:	Trigliserit
TKOL	:	Total Kolesterol
TKN	:	Ters kolesterol nakli
TSH	:	Tiroit stimulan hormon
VLDL	:	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
YPİT	:	Yüksek performanslı ince tabaka
YPİTK	:	Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Lipoprotein yapısının şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.2. Ekzojen lipidlerin - şilomikronların metabolizması.....	8
Şekil 2.3. Endojen lipidlerin - VLDL, IDL, LDL ve HDL metabolizması	10
Şekil 2.4. Kolesterol ve kolesterol esteri	12
Şekil 2.5. Trigliserid (kırmızı=linolenik, mavi=palmitik, yeşil=oleik trigliserid).	13
Şekil 2.6. Fosfatidilkolin ve sfingomyelin	14
Şekil 2.7. Palmitik asit, oleik asit ve araşidonik asit	15
Şekil 2.8. Kolesterol ölçüm prensibi	19
Şekil 2.9. Trigliserid ölçüm prensibi	20
Şekil 4.1. Plazma KETP ekspresyon düzeylerinin deneme gruplarına göre değişimi ...	39
Şekil 4.2. Plazma LKAT enzim aktivitelerinin deneme gruplarına göre değişimi.....	40
Şekil 4.5. Plazma tKOL konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi.....	41
Şekil 4.6. Plazma LDL konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi	42
Şekil 4.7. Plazma HDL konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi.....	43
Şekil 4.8. Ölçülen plazma TG konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi	44
Şekil 4.9. Plazma SGLİ konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi	45
Şekil 4.10. Gerçek plazma TG konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi	46
Şekil 4.24. Deneme sonu rat plazma lipid YPİT kromatogramı	47
Şekil 4.25. Kontrol grubu plazma lipid YPİT dansitogramı.....	47
Şekil 4.26. 0.1 mg/kg deksametazon grubu plazma lipid YPİT dansitogramı	47
Şekil 4.27. 0.5 mg/kg deksametazon grubu plazma lipid YPİT dansitogramı.....	48
Şekil 4.28. 1 mg/kg deksametazon grubu plazma lipid YPİT dansitogramı	48
Şekil 4.29. 2 mg/kg deksametazon grubu plazma lipid YPİT dansitogramı	48
Şekil 4.30. Hipertrigliseridemi grubu plazma lipid YPİT dansitogramı	49

Şekil 4.31. Hiperkolesterolemi grubu plazma lipid YPİT dansitogramı	49
Şekil 4.32. Plazma toplam yağı içerisindeki KOLE oranının deneme gruplarına göre değişimi.....	50
Şekil 4.33. Plazma toplam yağı içerisindeki TG oranının deneme gruplarına göre değişimi.....	51
Şekil 4.34. Plazma toplam yağı içerisindeki SYA oranının deneme gruplarına göre değişimi.....	52
Şekil 4.35. Plazma toplam yağı içerisindeki serbest KOL oranının deneme gruplarına göre değişimi.....	53
Şekil 4.36. Plazma toplam yağı içerisindeki fosfolipid oranının deneme gruplarına göre değişimi.....	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.2. HDL-kolesterol ölçüm prosedürü	26
Tablo 3.3. LDL-kolesterol ölçüm prosedürü.....	27
Tablo 3.4. Trigliserit ölçüm prosedürü	29
Tablo 3.5. Serbest gliserol ölçüm prosedürü.....	30
Tablo 3.6. Total kolesterol ölçüm prosedürü	32
Tablo 4.1. Deneme grubu hayvanlarına ait plazma sonuçları	37
Tablo 4.2. Çalışmada ölçülen parametrelerin birbiri ile korelasyonu	38
Tablo 5.1. ABD'nin önde gelen gelişmiş laboratuvarlarını ve gliserol körleme kullanımını	58

1. GİRİŞ

Plazmadaki başlıca lipit bileşenlerinden ikisi kolesterol ve trigliseritlerdir. Kolesterol, yağ emilimi için çok önemli olan safra asitlerinin, adrenal bezlerde, gonadlarda ve plasentada steroidogenezin öncüsüdür ve hücre zarının önemli bir bileşenidir. Trigliseritler, enerjinin vücut içinde taşınması ve depolanması için gereklidir. Hem kolesterol hem de trigliseritler suda çözünmediğinden, dokulara taşınmak için lipoprotein partikülleri olarak proteinle paketlenmeleri gerekir. Lipoprotein partikülü bir polar yüzey kaplamasına ve bir hidrofobik çekirdeğe sahiptir. Çekirdekte kolesterol ester ve trigliserit bulunur ve yüzey, lipoprotein partiküllerini çözündürmeye yarayan fosfolipidler, apolipoproteinler ve serbest kolesterol içerir. Beş ana lipoprotein sınıfı vardır ve bunlar ultrasantrifüleme yoğunluklarına veya elektroforetik hareketliliklerine göre sınıflandırılabilir. Tüm ana lipoprotein sınıfları kolesterol, trigliseritler, fosfolipidler ve apolipoprotein içerir. Bununla birlikte, bu çeşitli parçaların konsantrasyonu çeşitli lipoprotein sınıflarında farklılık gösterir. Lipoprotein taşıyan başlıca trigliseritler şilomikronlar ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerdir (VLDL). Plazma kolesterolünün baskın taşıyıcısı, plazma kolesterolünün yaklaşık üçte ikisini taşıyan düşük yoğunluklu lipoproteindir (LDL). Ara yoğunluk lipoprotein (IDL) yaklaşık olarak eşit miktarlarda trigliserit ve kolesterol esterleri içerir. Plazmada kolesterolün diğer önemli taşıyıcısı yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) sınıfıdır. Şilomikronlar yapı olarak çok düşük yoğunluklu lipoproteine (VLDL) benzer olsa da, apolipoprotein B kısmı, apolipoprotein B-100 sekansının amino terminal % 48'ine karşılık gelen apo B-48'dir. Dolaşımdaki şilomikronlar, adipositler ve iskelet kası gibi dokulardaki endotelial hücrelerde bulunan lipoprotein lipaz ile hidrolize edilir ve daha sonra apolipoprotein E'nin aracılık ettiği karaciğer tarafından hızla endoside edilen kalan partiküller üretilir. VLDL endojen trigliserit taşır ve ağırlıklı olarak karaciğerden kaynaklanır. Bu parçacıklar apolipoprotein

B-100, apolipoprotein E ve apolipoprotein C içerir. Bir apolipoprotein E ve C iltifatı, HDL'den VLDL'ye transfer edilir. VLDL, iskelet ve kalp kası ve yağ dokusu gibi dokuda kılcal endotelyumda bulunan lipoprotein lipaz ile hidrolize edilir. Lipoprotein lipaz için önemli bir ortak faktör apolipoprotein CII'dir. Trigliseritleri parçalandıkça VLDL'nin partikül çapı azalır. C proteinleri ve bazı E proteinleri lipoprotein kompleksinden ayrılır ve elde edilen VLDL kalıntı partikülü (IDL), apolipoprotein B100 molekülünü ve apolipoprotein E'nin birkaç kopyasını tutar. İnsanlarda IDL parçacıklarının yaklaşık yarısı, ligand olarak apolipoprotein E gerektiren bir işlemle karaciğer tarafından endositozlanır. Karaciğer tarafından uzaklaştırılmayan kalan partiküller, muhtemelen sadece bir apolipoprotein, apolipoprotein B100 içeren kolesterol açısından zengin bir lipoprotein ile sonuçlanan hepatik lipazın etkisiyle kalan trigliseritlerinin çoğunu ve apolipoprotein E'yi kaybederler. Bu durumda, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), ligand olarak apolipoprotein B-100'ü tanıyan LDL reseptörüne bağlandıktan sonra endositoz yoluyla tüm çekirdekli hücelere kolesterolünü verir. LDL'nin yaklaşık %70'i karaciğer tarafından alınır. Geri kalan lipoprotein, HDL, karaciğer, bağırsak ve dolaşımdaki öncülerden sentezlenir ve plazma kolesterolünün %20 ila %30'unun taşınmasından sorumludur.

Yüksek yoğunluklu lipoprotein, dokuda esterlenmemiş kolesterolü alır, bunu, HDL'deki ana apolipoprotein olan apolipoprotein A-I yardımıyla lesitin-kolesterol açıl transferaz (LKAT) aktivitesiyle esterleştirir. Kolesterol esterleri daha sonra ya doğrudan HDL ile karaciğere veya dolaylı olarak kolesterol ester transfer proteini (KETP) aktivitesiyle IDL ve LDL'ye transfer edilir.

Lipoprotein metabolizmasındaki bozukluklar (dislipidemi) erken ateroskleroz veya pankreatit ile sonuçlanabilir. Dislipidemiler hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi,

kombine hiperlipidemi ve düşük seviyelerde yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol olarak sınıflandırılabilir.

Dislipidemik durumların çoğu, artmış kardiyovasküler hastalık (KVH) riski ile bağlantılıdır ve KVH'lar birçok ülkede sağlık giderlerinin en büyük nedenini oluşturmaktadır. Dislipidemili hastalara klinik bakımda ilk adım, tanıyı doğru koymaktır. Ancak tanı konduktan sonra prognoz, tedavi seçimi veya genetik tarama testi gerekliliği belirlenebilir.

Geleneksel olarak biyokimya laboratuvarlarında rutin test olarak lipoproteinlerin yapısındaki "trigliserid" ile "kolesterol"lerin miktar analizleri yapılmaktadır. Fakat her iki testin ölçüm prensipleri ile ilgili önemli endişeler - eleştiriler bulunmaktadır ve bu çalışmada dislipidemilerin teşhisinde (hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi) serum kolesterol ester oranı ile serbest gliserol düzeyinin kullanılabilirliği araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lipidler

Lipitler, suda çözünmeyen, ancak organik çözücülerde çözünen çeşitli molekül gruplarından oluşur. İnsan vücudundaki en önemli lipitler kolesterol ve kolesterol esterleri, yağ asitleri, trigliseritler, gliserofosfolipidler, sfingolipidler, safra asitleri, steroid hormonları ve yağda çözünen vitaminlerdir. Lipidler biyomembranların yapılarında bulunurlar (gliserofosfolipidler, sfingolipidler ve kolesterol). Ayrıca hormonlar-hormonların öncülülerinin ve sinyal moleküllerinin yapısına katılma, metabolik yakıt (yağ asitleri), enerji depolama (trigliseritler) ve yağların sindirimi (safra asitleri) gibi birçok fonksiyonları bulunur.¹

Kolesterol, membran akışkanlığı ve geçirgenliğinin korunması için önemli bir moleküldür ve safra asitleri, steroid hormonları ve D vitamini öncüsü olarak hizmet eder. Hücrelerdeki kolesterol homeostazı, kolesterolün diyetle emilimi, safra asitlerine ve sterol hormonlarına metabolize olma ve safra asitleri olarak atılım şeklinde korunur.² Kolesterol, tüm insan hücrelerinde karbonhidrat ve yağların metabolizması sonucu oluşan asetattan sentezlenebilir. Ancak, kolesterolün de novo sentezinin gerçekleştiği ana organlar karaciğer ve bağırsaktır.^{3, 4} Karaciğer ve ekstrahepatik dokular tarafından sentezlenen diyet lipitleri ve endojen lipitler, lipoprotein kompleksleri olarak apolipoproteinler ile dolaşımda taşınır.⁵

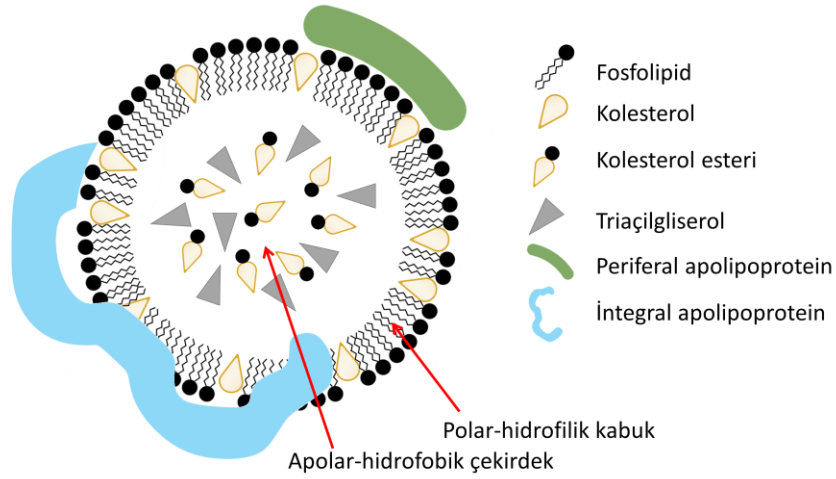
2.1.1. Lipoproteinler

Lipoproteinler, geleneksel olarak ultrasantrifüj ile ayrılan lipoprotein partiküllerinin yoğunluklarındaki farklılıklara göre sınıflandırılırlar. Lipoproteinlerin ana sınıfları şilomikronlar, VLDL, IDL, LDL, lipoprotein (a) [Lp (a)] ve HDL'dir.⁶ Bitişik lipoprotein fraksiyonları ile olası kontaminasyonlara rağmen, ultrasantifügasyon lipoprotein araştırmaları için altın bir standart olarak yerini korumuştur. Elektroforetik

hareketliliklerine göre, lipoproteinler sırasıyla HDL, VLDL ve LDL sınıfları olan α , pre β ve β lipoproteinlere sınıflandırılır. Ayrıca, farklı lipoprotein alt sınıflarının ayrılması için lipoprotein parçacıklarının büyüklüğüne veya bunların immünoafinitesine dayanan kromatografik yöntemler kullanılmıştır. Yüksek çözünürlüklü nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, lipoprotein alt sınıflarını farklı boyutlarına göre ayırmak için kullanılan yeni bir tekniktir.⁷ Bazı küçük boyutlu HDL ve LDL partikülleri özellikle aterojeniktir, bu nedenle bu alt sınıfları ayırma ve tüm partikül popülasyonundaki oranlarını tahmin etme olasılığı kardiyovasküler hastalık (KVH) risk değerlendirmesini iyileştirebilir.^{8,9}

Lipoproteinler, yoğunluk, boyut ve lipit bileşimlerinde farklılık gösteren heterojen bir partikül popülasyonu grubu olduğundan, bunları sınıflandırmanın diğer alternatifi, ana apolipoproteinlerine göre yapılıdır.⁶ HDL dışındaki diğer tüm lipoproteinler, apoB ölçümü ile dolaşımdaki aterojenik lipoprotein partiküllerinin miktarını değerlendirmeyi mümkün kılan apoB 48 (şilomikronlar) veya apoB-100 (VLDL, IDL, LDL, Lp [a]) içerir. HDL dışındaki diğer tüm lipoproteinler, apoB ölçümü ile dolaşımdaki aterojenik lipoprotein partiküllerinin miktarını değerlendirmeyi mümkün kılan apoB 48 (şilomikronlar) veya apoB-100 (VLDL, IDL, LDL, Lp [a]) içerir. HDL parçacıklarının ana apolipoproteinleri apoA-I ve apoA-II'dir. Apolipoproteinler A-I, A-II, C-I, C-II, C-III ve E metabolizma sırasında lipoproteinler arasında değişebilirken, apoB-48 ve apoB-100 değiş tokuş edilemez. Lipoproteinlerin özellikleri detaylı olarak Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Tüm lipoproteinler benzer bir parçacık yapısını paylaşır (Şekil 2.1): fosfolipidler, esterleşmemiş kolesterol ve apolipoproteinler yüzeydedir ve triçilgliseroller, kolesterol esterleri ve diğer nötr lipidler parçacığın çekirdeğinde bulunur.



Şekil 2.1. Lipoprotein yapısının şematik gösterimi.

Apolipoproteinler, lipoproteinlerin metabolizmasını belirler: Lipoprotein taşınmasını ve dokular arasında yeniden dağıtımını yönlendirir, çeşitli enzimler için kofaktörler olarak işlev görür ve lipoproteinlerin yapısını korurlar.⁶

Tablo 2.1. Plazma lipoproteinlerinin apolipoprotein, protein ve lipid içeriği ile yoğunluğu ve partikül büyüklüğü.¹⁰⁻¹³

	Yapısal Protein	Değiştirilebilir apolipoproteinler	Protein (% ağırlık)	Lipid (% ağırlık)	Yoğunluk (g/ml)
Şilomikron	apoB-48	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, E	1-2	99	<0.95
VLDL	apoB-100	C-I, C-II, C-III, E	5-10	91	0.95-1.006
IDL	apoB-100	C-I, C-II, C-III, E	15-20	91-80	1.006-1.019
LDL	apoB-100	Eser miktarda E	18-25	75	1.019-1.063
HDL	apoA-I apoA-II	A-I, A-II, A-IV, C-I, C-II, C-III, E	40-55	44	1.063-1.210
HDL₂	apoA-I apoA-II	A-I (65%), A-II (10%), C(10-15%), E (3-5%)	35-40	59	1.063-1.125
HDL₃	apoA-I apoA-II	A-I (62%), A-II (23%), AIV (trace), C (5%), E (1%)	54-59	40-45	1.125-1.21

2.1.1.1. Lipoproteinlerin metabolizması

Lipoproteinler, lipidleri bağırsaktan ve karaciğerden periferik dokulara taşırlar. Lipoproteinler metabolizmaları sırasında apolipoproteinleri birbirleriyle değiştirirler ve lipit bileşimlerini (apoB-48 ve apoB-100 hariç) modifiye edebilirler.³ VLDL ve LDL parçacıkları, kolesterol, trigliseritler ve diğer lipitleri, ileri kolesterol nakli adı verilen bir süreçte periferik dokulara iletmekte görev alırlar. Buna karşın, HDL'ler, aşırı kolesterolü, ters kolesterol nakli (TKN) adı verilen bir süreçte periferik hücrelerden karaciğere geri taşırlar.¹⁴ Son olarak, tüm lipoproteinler karaciğer, böbrek veya periferik dokularda apolipoprotein-reseptör etkileşimleri veya diğer mekanizmalar yoluyla katabolize edilirler.¹⁵

Tablo 2.2. Plazma lipoproteinlerinin lipit bileşimi. ^{10, 12, 16-19}

	TFL	FK	LFK	SM	NL	TG	KOLE	SKol
Şilomikronlar, (%)	7					86	3	2
VLDL, (%)	18	14	0,8	2	84	55	12	7
IDL, (%)	19	15		4	81	23	29	9
LDL, (%)	27,5	13,8	2,4	5,6	77	5,2	48,9	18,3
LDL (mol/mol LDL)	900	450	80	185	170	170	1600	600
HDL, (%)	33	33,45	0,5-5	5-10	5-12	5-12	30-40	5-10

FK: Fosfatidil kolin; LFK: Lizo-fosfatidil kolin; SM: Sfingomyelin; NL: Nötral lipid; TG: Trigliserid; KOLE: Kolesterol esteri; SKol: Serbest kolesterol

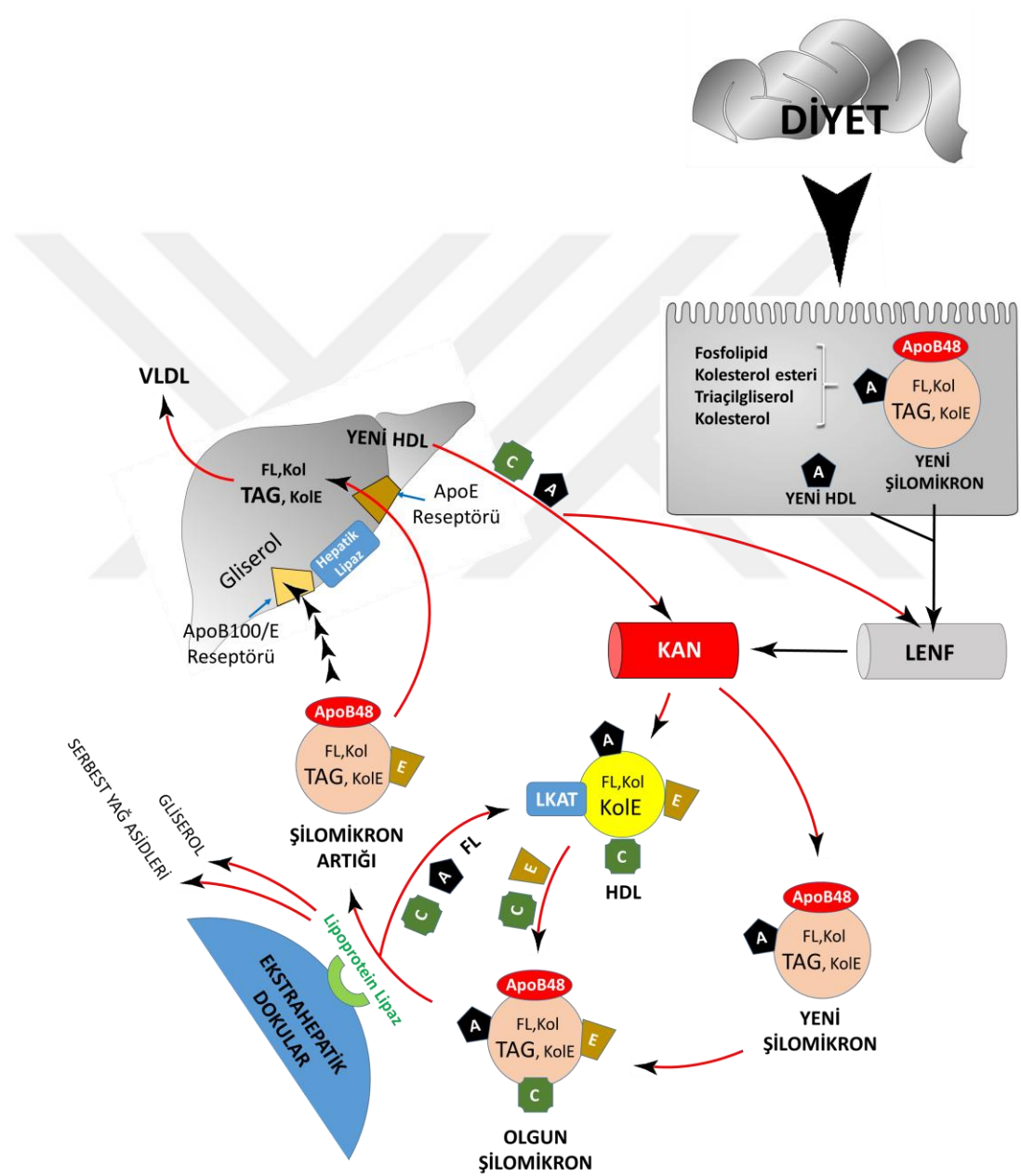
2.1.2. Şilomikronlar, VLDL, IDL, LDL ve HDL

Normal kolesterol metabolizmasında iki metabolik yol vardır.²⁰ İlki, diyet kaynaklarından elde edilen kolesterolü içeren ve daha sonra şilomikron ve şilomikron kalıntılarında karaciğere taşınan ekzojen yoldur (Şekil 2.1). İkinci yol, karaciğerin karbonhidratlardan ve yağ asitlerinden trigliserid (TG) ürettiği ve TG'lerin kolesterol ile birlikte kolesterol esteri (KOLE) olarak ekstrahepatik hücrelere taşınarak apoB-100 içeren lipoproteinlerin ürettiği endojen yoldur (Şekil 2.2). Endojen yol iki yönlü olabilir:

VLDL, IDL ve LDL'nin hepatik lipidleri ve kolesterolü ekstrahepatik dokulara taşıması diğer yandan HDL'nin kolesterolü periferel hücrelerden karaciğere geri taşıması.²¹

2.1.2.1. Şilomikronlar

Lipoproteinler serbest yağ asidi haricindeki lipitler ile kan dolaşımında α - tokoferol, α - ve β -karoten gibi lipitte çözünen maddeleri taşır.



Şekil 2.2. Ekzojen lipidlerin - şilomikronların metabolizması

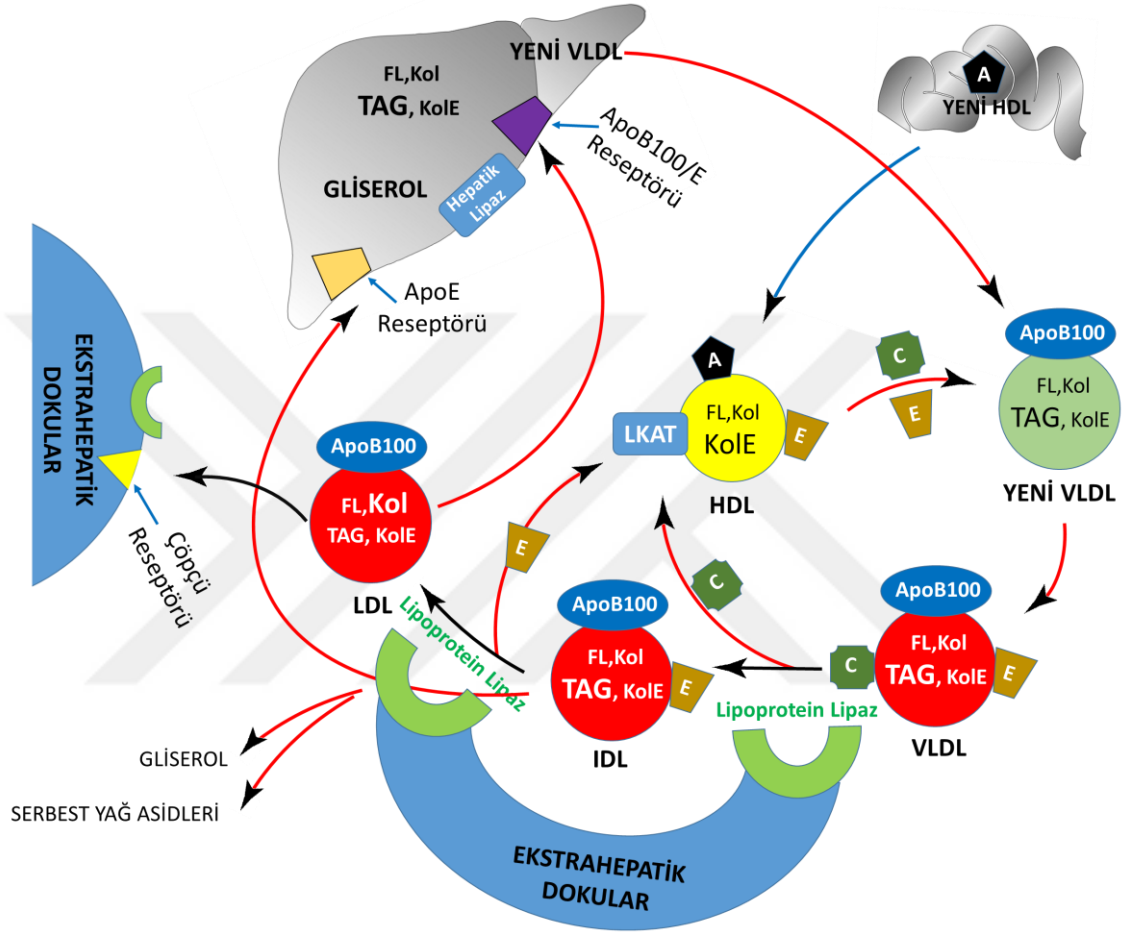
İlk lipoprotein, diyet lipitlerinden ince bağırsakta oluşan şilomikronlardır. Diyetle alınan lipitler, ince barsaklarda pankreatik lipaz ile 2-monoaçıl gliserol ve yağ asidine parçalanır, bağırsak hücreleri tarafından emilir ve hücrelerde yeniden TG'lere birleştirilir. Şilomikronlar, diğer lipoproteinler gibi amfipatik, fosfolipit bakımından zengin, esterleşmemiş kolesterol açısından zengin yüzey ve hidrofobik çekirdekten oluşur. Şilomikron çekirdeğinde TG, KOLE ve ayrıca az miktarda esterleşmemiş kolesterol vardır. Kapillerde lokalize lipoprotein lipaz (LPL), periferik dokularda enerji için kullanılacak veya çok daha büyük ölçüde adipoz dokuda depolanacak olan şilomikron partiküllerinden TG'leri lipolize eder.²² Sonuçta TG'lerinin çoğunu kaybeden şilomikron kalıntıları derhal karaciğerde işlenir ve geri kalan TG'leri, kolesterolü (esterleşmiş ve esterleşmemiş) ve fosfolipitleri ile protein grubunun amino asitleri yeniden kullanılır (Şekil 2.1).²³

2.1.2.2. VLDL, IDL ve LDL

VLDL partikülleri karaciğerde TG ve KOLE'ler ile yüklenir. VLDL'deki KOLE'nin oranı düşükken, majör lipit grubu TG'dir (% 64) (Tablo 2.2). VLDL parçacığının yüzeyi fosfatidilkolinden (FK) ve sfingomiyelinden (SM) oluşur, ancak esterleşmemiş kolesterol de yüzey fosfolipidlerin arasına gömülür. VLDL, yapısındaki TG'lerin çoğunu LPL'nin etkisiyle kaybettikçe yoğunluğu artar ve önce IDL ve son olarak LDL oluşur (Tablo 2.1) (Şekil 2.2).²⁴

LDL lipidomu, hormonların, safra asitlerinin, steroid hormonlarının, D vitamininin ve hücre zarlarının yapısal bir lipitin oluşması için hücrelere dağıttığı KOLE'leri (LDL'nin toplam lipitlerinin yaklaşık % 50'si, Tablo 2) tarafından düzenlenmektedir. LDL'nin çekirdeğinde, esterleşmemiş kolesterol, TG ve yağ asitleri bulunmaktadır. Esterleşmemiş kolesterol LDL parçacığının yüzeyinde de bulunur ve yüzey parçacıkta bulunan toplam esterleşmemiş kolesterolün üçte ikisini içerir.¹⁷ LDL

parçacığının yüzeyi esas olarak FK ve SM'den oluşur. Ayrıca az miktarda fosfatidiletanolamin ve fosfatidilinositol de içerir. Bir LDL parçacığının %25 protein ve %75 lipittir.²⁵



Şekil 2.3. Endojen lipidlerin - VLDL, IDL, LDL ve HDL metabolizması

VLDL, 30-80 nm büyüklüğündedir ve yoğunluğunun 0.95-1.006 g/ml olduğu belirlenmiştir.¹⁰ Lipoprotein 1.019-1.063 g/ml yoğunluğa ve 18-30 nm boyutuna ulaştığında LDL olarak adlandırılır.²⁶

Kolesterolün toplam fosfolipide oranı (Kol/Fl), dolaşımdaki lipoproteinlerde yüzey fosfolipitlerinin içerideki lipitlere oranını tanımlamak için kullanılabilir ve genellikle lipoproteinlerin lipoliz derecesi hesaplanabilir. Bu nedenle dolaşımdaki

lipoproteinlerin değerlerini tartışmak gerekir. VLDL'de, KOL/FL oranı 0.8'dir (Tablo 2.2).²⁷ Chao ve ark.²⁸ LDL'de KOL/FL oranının 2,5 olduğunu ve VLDL ile karşılaştırıldığında KOL oranında bir artış göründüğünü ileri srmetedir.

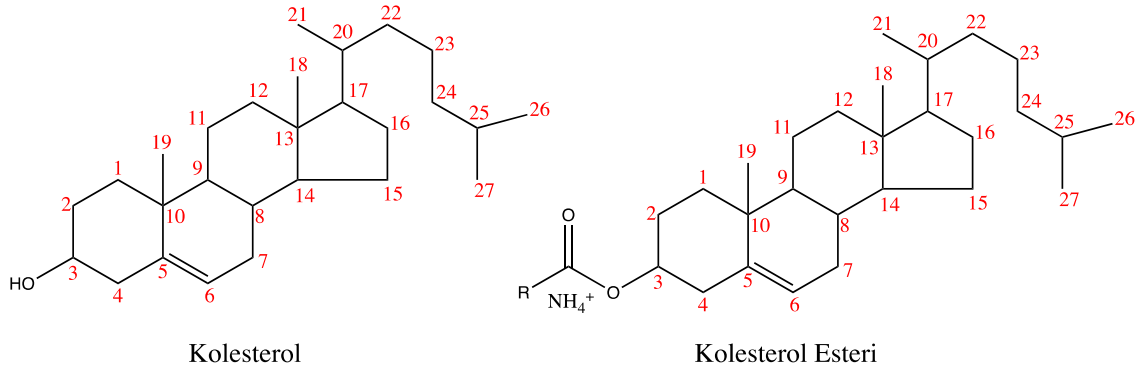
2.1.2.3. HDL

HDL iki Şekilde oluşur. Bunlardan birincisi VLDL parçacıklarından fosfolipid yüzeyi ayrılıp lipoprotein lipazın etkisiyle veya yeni sentezlenen apoA-I'in periferik hücrelerden lipitleri toplamasıyla üretilir. İlk sentezlenen HDL lipid içeriği fakir ve Şekil olarak diskoidaldir. Transmembran kolesterol taşıyıcı, ATP-bağlayıcı kaset A1 (ABKA1) tarafından aracılığı ile periferal hücrelerden esterleşmemiş kolesterol ile fosfolipidleri alarak küresel form kazanır.^{29, 30} Diskoidal HDL'deki esterleşmemiş kolesterol, lesitin-kolesterol ailtransferaz (LKAT) tarafından esterleştirilir ve oluşan KOLE'ler yavaş yavaş bir çekirdek oluşturur. Böylece olgun - küresel HDL partiküllerinin oluşmasına yol açar. Olgun HDL partiküllerinin KOLE'leri daha sonra TG'ler karşılığında kolesterol ester transfer proteini (KETP) tarafından katalize edilen bir reaksiyon ile HDL partiküllerinden VLDL ve IDL partiküllerine transfer edilmektedir.^{31, 32}

Serumdan izole edilmiş olgun HDL lipidomunun neredeyse yarısı fosfolipitlerden oluşur, ancak bu fosfolipid içerikleri HDL alt sınıfları (HDL₂ ve HDL₃) arasında farklılık gösterebilir.¹⁹ Gelişmekte olan HDL'de fosfolipitlerin çoğu FK'dir ve FK/SM oranı 7 olabilmektedir.³³ Olgun HDL'de ise fosfolipid içerikleri HDL sınıfları arasında farklılık gösterir.¹⁸ Fosfolipid içeriği HDL'yi dolaşımdaki fosfolipitlerin ana taşıyıcısı yapar ve fosfolipitlerin % 15'ine kadarı Lizofosfatidilkolin (LizoFK) olabilir.^{18, 19} HDL'deki KOLE'lerin çoğu kolesterol linoleattır ve bu özellikle HDL₃'te zenginleştirilmiştir.³⁴

2.1.3. Lipoproteinlerdeki Temel Lipitler

2.1.3.1. Kolesterol ve Kolesterol Esteri



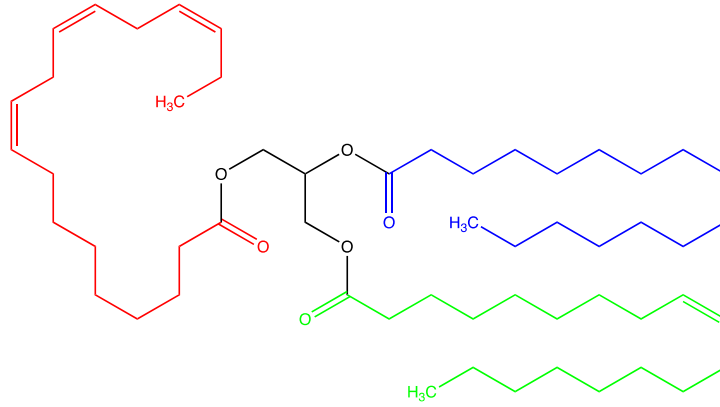
Şekil 2.4. Kolesterol ve kolesterol esterleri

Kolesterol ($C_{27}H_{45}OH$), yapıyı çok sert hale getiren sterollerin tetrasiklik halka yapısına sahiptir. C3'teki hidroksil (-OH) grubu, polarite ve hidrojen bağı için önemlidir ve C17'deki alifatik yan zincir, hidrofobik özelliği artırır. Kolayca kristalize olan lipofilik, neredeyse suda çözünmeyen (1,8 mg/L) mumsu bir maddedir.³⁵

Kolesterol, KE olarak esterleşmiş biçimde taşınır ve depolanır. KOLE'ler, yağ açıl zinciri C3'te hidroksil grubu ile esterleştiğinde oluşur. Esterleşmiş kolesterol, alifatik yağ asidi nedeniyle, esterleşmemiş kolesterolden daha hidrofobiktir. Yağ asidinin uzunluğu hidrofobiklik derecesini belirler. Yüksek hidrofobiklik nedeniyle, KOLE'ler lipoprotein parçacıklarının çekirdeğinde taşınır.³⁶

Kolesterol biyosentez yolu, içinde hidroksi-metil glutaril-CoA redüktazın hız sınırlama aşamasını kontrol ettiği oldukça konservatif çok aşamalı bir yoldur. Bu adım statinler ile inhibe edilebilir ve böylece kolesterol sentezi önlenir.¹

2.1.3.2. Trigliseridler



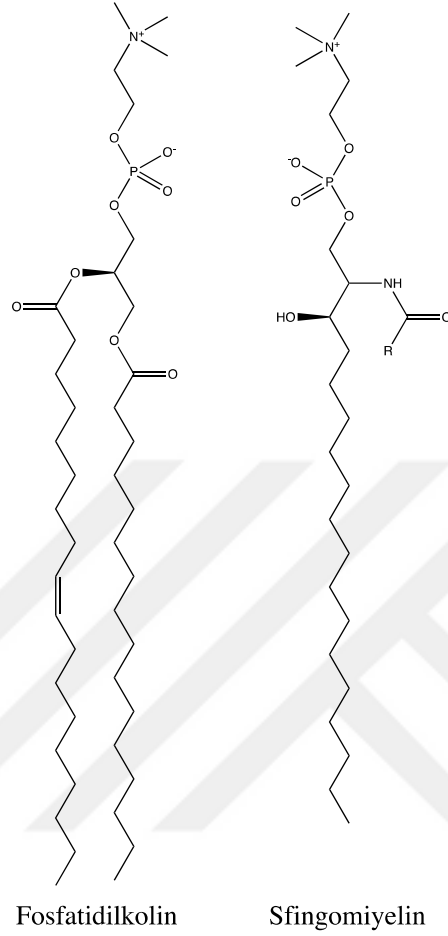
Şekil 2.5. Trigliserid (kırmızı=linolenik, mavi=palmitik, yeşil=oleik trigliserid).

Trigliseritler, esas olarak adipositlerde depolanan, hidrolize edilebilir ve özellikle kalp kasında enerji olarak kullanılabilen depo lipidlerdir. TG'ler, ester bağı ile bağlanmış bir gliserol omurgası ve üç yağ asidi zincirinden oluşur. Nötr lipidler olarak TG'ler oldukça hidrofobiktir. TG'ler insan diyetlerindeki ana yağ formudur. Diyet ile alınan TG'ler, pankreatik lipaz ile bağırsak lümenindeki mono- ve digliseritlere ve yağ asitlerine ayrılır. Daha sonra bağırsak lümeninden emilir ve taşıma için TG'lere tekrar birleştirilir. TG'ler başlangıçta şilomikronlarda karaciğere taşınır ve karaciğerde periferel dokulara taşınacak çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) içine paketlenir.²⁶

2.1.3.3. Fosfolipidler

Fosfolipidler heterojen bir amfipatik lipid grubudur ve düşük yoğunluklu lipoprotein'in toplam lipidlerinin %23'ünü oluştururlar.¹² Ana fosfolipid grupları, TG'lerle aynı gliserol omurgasından, iki yağ açıl yan zincirinden ve fosfat grubu yoluyla gliserol omurgasına bağlanan amfipatik bir baş gruptan oluşan gliserofosfolipidlerdir. Ana gliserofosfolipid grupları FK (Şekil 2.5), fosfatidiletanolamin (FE), fosfatidilinozitol (Fİ) ve fosfatidilserin (FS)'dir. Doğal fosfolipitlerde doymamış yağ asitleri genellikle gliserol

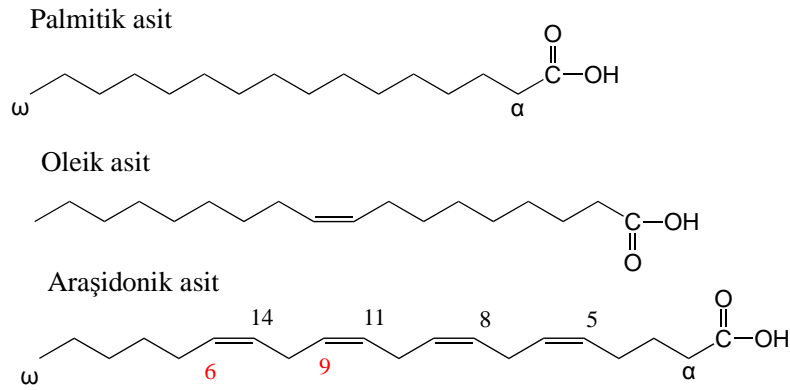
omurgasının sn-2 pozisyonundayken, sn-1 pozisyonu genellikle doymuş bir açil zinciri tarafından işgal edilir.^{37, 38}



Şekil 2.6. Fosfatidilkolin ve sfingomiyelin

Doygunluk derecesi membran sertliğini etkiler.³⁸ Gliserofosfolipid, lizofosfolipidlere indirgenebilir. Gliserofosfolipidler bir açil grubu kaybederek amfipatik baş grubu ve gliserol omurgasına bağlı bir açil zinciri içerir. FK, lizofosfatidilkolin (LFK) ile hidrolize edilebilir, burada sn-2-pozisyonundaki açil zinciri, enzimatik hidroliz veya oksidasyonun bir sonucu olarak hidrolize edilir. SM'ler gliserofosfolipidlere çok benzemektedir, ancak sn-1 açil zinciri yerine sfingosin adı verilen bir aminoalkol içerirler. Gliserofosfolipitlerin baş grubu kolin, serin, etanolamin, inozitol veya gliserol olabilir ve benzer şekilde SM'lerde fosfat grubuna çeşitli baş grupları eklenebilir.¹

2.1.3.4. Yağ asitleri



Şekil 2.7. Palmitik asit, oleik asit ve araşidonik asit

Yağ asitleri, KOLE, TG ve fosfolipitlerin yapı taşlarıdır. Yağ asitleri, genellikle çift sayıda karbon ve sonunda bir karboksil grubu olan 4-32 karbonlu alifatik hidrokarbon zincirleridir. Bunlar çift bağ olmadan doymuş olabilir veya değişen miktarlarda çift bağ ile doymamış olabilir. İnsan fizyolojisindeki en önemli yağ asitleri palmitik asit (16 karbon, çift bağ yok (16:0)), palmitoleik asit (16 karbon, bir çift bağ (16:1)), miristik asit (14:0), stearik asit (18:0), oleik asit (18:1), linoleik asit (18:2), α -linolenik asit (18:3), araşidonik asit (20:4), eikosapentaenoik asit (20:5) ve dokosaheksaenoik asit (22:6). Yağ asitleri lipoproteinlerde de serbest bulunabilir, örneğin düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) % 1'den az serbest yağ asiti içerir.¹²

2.1.3.5. Gliserol

Gliserol prekürsör ve derive lipitler sınıfında olan üç değerli bir alkoldür. Gliserol, FL ve TG'lerin yapı taşıdır. TG'ler, üç yağ asidinin gliserol ile esterleridir ve başlıca adipoz doku ile karaciğerde bulunurlar. Diğer yandan bir veya iki yağ asidinin gliserol ile esterleştirildiği mono - ve diaçilgliseroller de dokularda bulunur. Bunlar sentez ve hidrolizde özellikle önemlidir.

Diğer yandan fosfolipidler membranların ana lipid bileşenleridir. Gliserofosfolipidler yağ asitlerine ve gliserole ek olarak bir fosforik asit kalıntısı içeren lipitler. Sıklıkla azot içeren bazlara ve diğer ek gruplara sahiptirler.²⁶

2.2. Dislipidemiler

Dislipidemiler, plazmada kolesterol açısından zengin kalıntı partiküllerinin birikmesinden kaynaklanan orta ila şiddetli hipertrigliseridemi ve/veya hiperkolesterolemi ile karakterize lipoprotein metabolizması bozukluklarıdır.²⁶

2.2.1. Hiperkolesterolemi

Ulusal Kolesterol Eğitim Panelinin yeni "Yetişkin Tedavi Paneli" ne göre (Adult Treatment Panel - AdTP); Artmış serum kolesterol düzeyi >240 mg/dL olarak bildirilmektedir. Eşik kolesterol düzeyi 200 mg/dL'dir ve arzulanan serum kolesterol düzeyi 200 mg/dL'den azdır.³⁹

Tablo 2.3. Serum kolesterol düzeylerinin sınıflandırılması

Sınıfı	Düzeyi
LDL Kolesterol	
<100 mg/dL	Optimal
100-129 mg/dL	Optimal yakınında / optimalin üstünde
130-159 mg/dL	Sınırdaki yüksek
160-189 mg/dL	Yüksek
≥190 mg/dL	Çok yüksek
Total kolesterol	
<200 mg/dL	Arzulanan
200-239 mg/dL	Sınırdaki yüksek
≥240 mg/dL	Yüksek
HDL kolesterol	
<40 mg/dL	Düşük
≥40 mg/dL	Yüksek

2.2.2. Hipertrigliseridemi

"Yetişkin Tedavi Paneli III"e göre (Adult Treatment Panel III- AdTP III); Çok yüksek serum trigliserid düzeyi > 500 mg/dL, arzulanan serum kolesterol düzeyi ise <200 mg/dL olarak belirlenmiştir (Tablo 2.4).³⁹

Tablo 2.4. Serum trigliserit düzeylerinin sınıflandırılması

Trigliserit Kategorisi	AdTP III Seviyeleri	AdTP III Seviyeleri
Normal	<200 mg/dL	<150 mg/dL
Sınırdaki - yüksek	200-399 mg/dL	150-199mg/dL
Yüksek	400-1000 mg/dL	200-499 mg/dL
Çok yüksek	>1000 mg/dL	≥500 mg/dL

AdTP II'nin zayıf bağımsızlığa dayanan geleneksel tanıma göre yüksek serum trigliserit düzeyleri koroner arter hastalığı riski ile pozitif ilişkili ve tek değişkenli bir parametredir. Daha önceki yıllarda prospektif çalışmaların çok değişkenli analizi, yüksek trigliserit düzeylerinin koroner kalp hastalığı (KKH) için çok az bağımsız risk taşıdığını düşündürmekteydi. Fakat yeni kanıtların gözden geçirilmesinden sonra, AdTP III paneli serum trigliseritleri ve KKH arasındaki bağlantının önceden belirlenenden çok daha güçlü olduğu öne sürülmüştür. Bundan dolayı artık yüksek trigliserit düzeyleri, tek değişkenli analizde ortaya konulduğu gibi, yüksek kardiyovasküler hastalık riski için önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir.⁴⁰⁻⁴²

2.2.3. Kombine Hiperlipidemi

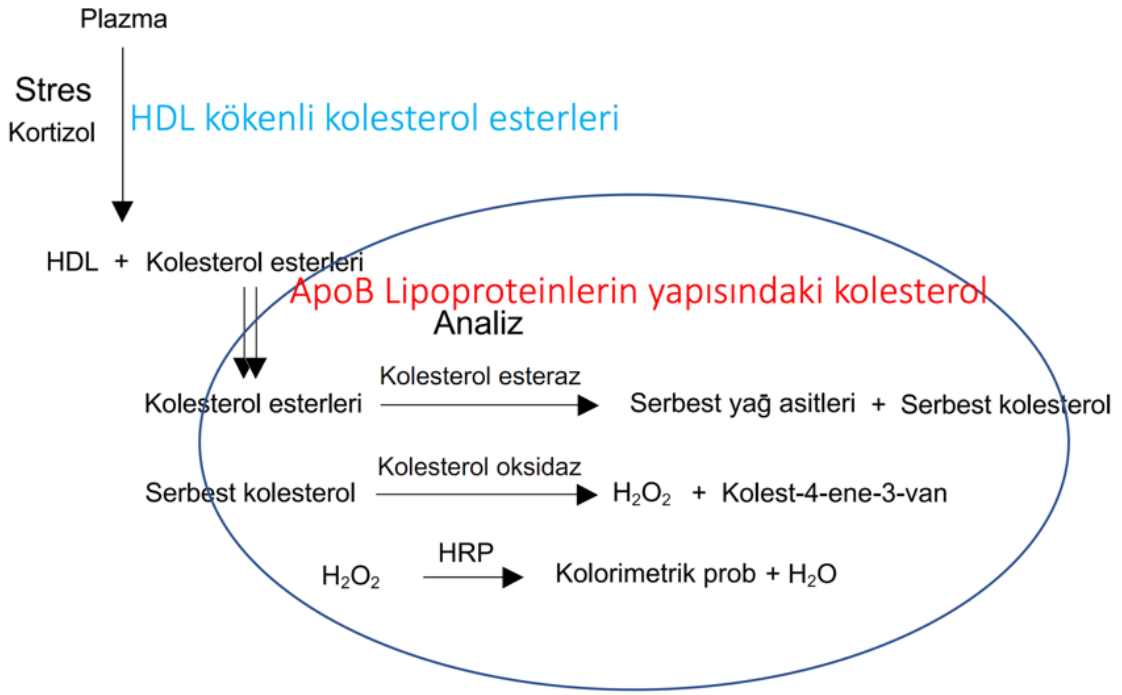
Kombine hiperlipidemi sendromları, hem kolesterol hem de trigliseritlerde artışa neden olur. Kombine hiperlipidemi sendromunun daha yaygın birincil nedenleri arasında ailesel kombine hiperlipidemi (AKH) ve Tip III dislipidemi (disbetalipoproteinemi) bulunur. AKH kombine hiperlipidemiye neden olan muhtemelen en yaygın ailesel sendromdur.⁴³ Bu sendrom ayrıca "ailesel çoklu lipoprotein tipi hiperlipidemi" olarak da adlandırılır. Bu bozuklukta, hastalar ve etkilenen birinci derece akrabaları çeşitli

zamanlarda kesin bir biçimde hiperkolesterolemi, hipertrigliseridemi veya kombine hiperlipidemi gösterebilir.²⁶

2.3. Dislipidemilerin Laboratuvar Değerlendirmesi

Dislipidemi tanısı koymada ve ikincil nedenlerini ortadan kaldırmada dikkatli bir anamnez ve fiziki muayeneye ek olarak, laboratuvar testleri çok önemlidir. Günümüzde lipid bozukluklarının çoğunun kolesterol, trigliseritler, HDL kolesterol ölçümü ve Friedewald denklemi kullanılarak LDL kolesterol ölçümü ile hesaplanabileceği görülmektedir.⁴⁴

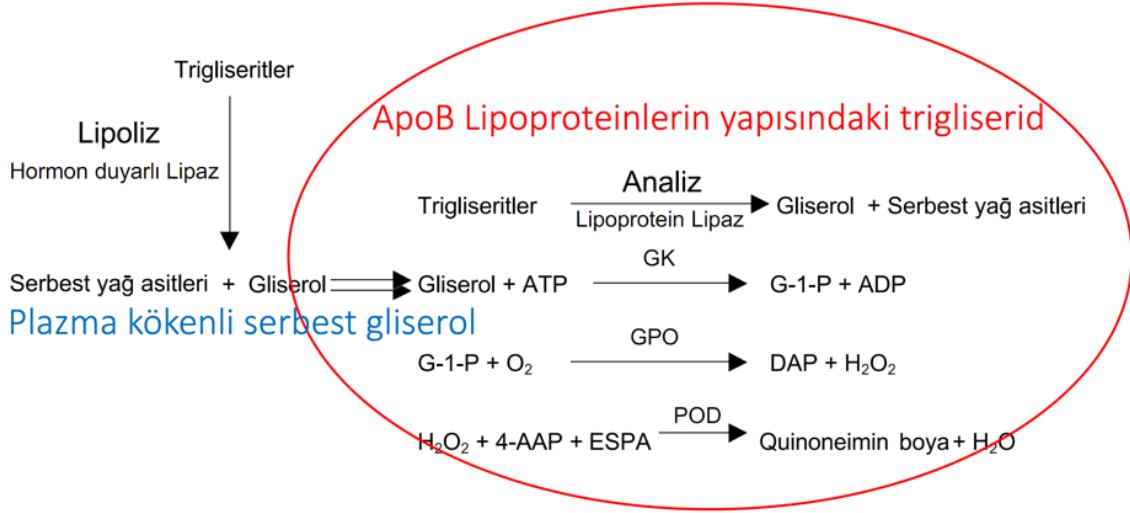
Kolesterol analizinde yaygın olarak total kolesterol ölçülmektedir. Kolesterol esterleri, kolesterol esteraz aktivitesiyle serbest kolesterole ve yağ asidine hidrolize olurlar. Hem serbest kolesterol hem de kolesterol esterinden serbest hale gelen kolesterol, kolesterol oksidaz enzimi ile kolest-4-en-3-van ve hidrojen peroksida oksitlenir. Hidrojen peroksit daha sonra yüksek oranda spesifik bir kolorimetrik prob ile tespit edilir. Kolesterol esterinden gelen serbest kolesterol ile zaten var olan serbest kolesterol bir havuz oluşturmakta, kolesterol oksidaz enzimi havuzdaki bu kolesterolleri kimyasal reaksiyona sokarak renkli bir bileşik oluşturmaktadır. Bu renkli bileşik ise 540 nm dalga boyunda ölçülerek toplam kolesterol analizi yapılmaktadır.⁴⁵⁻⁴⁷



Şekil 2.8. Kolesterol ölçüm prensibi

Testin başında kolesterol esteraz ile örneklerin inkübasyonu kolesteroler arasındaki yapı farkının ortadan kalkmasına neden olur. Bu ise stres gibi aşırı lipid mobilizasyonunda miktarı nispeten sabit SKOL⁴⁸ ile çok fazla artmış KOLE içeren örneğin reaksiyonu ile aşırı SKOL içeren gerçek hiperkolesterolemik örneğin reaksiyonunun aynı olmasına neden olabilmektedir.⁴⁹⁻⁵¹

TG ölçümünde de buna benzer bir durum söz konusudur. Lipoproteinlerin yapısındaki TG'ler önce lipoprotein lipaz ile gliserol ve serbest yağ asitlerine hidrolize edilir. Gliserol daha sonra gliserol kinaz (GK) ile katalize edilen reaksiyondaki adenosin trifosfat (ATP), gliserol-1-fosfat (G-1-P) ve adenosin difosfat (ADP) oluşturarak fosforile edilir. G-1-P daha sonra gliserol fosfat oksidaz (GPO), dihidroksiaseton fosfat (DAP) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) ile oksitlenir. Peroksidaz (POD), H_2O_2 'nin 4-aminoantipirin (4-AAP) ve sodyum N-etil-N-(3-sülfopropil) m-anisidin (SSPA) ile bağlanarak 540 nm'de maksimum bir absorbans gösteren kinonimin boyası oluşumunu katalize eder.⁵²⁻⁵⁵



Şekil 2.9. Trigliserid ölçüm prensibi

Ölçüm esnasında absorbanstaki artış, numunenin trigliserit konsantrasyonu ile değil gerçekte deney tüpündeki gliserol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve serum ve/veya plazma serbest gliserol düzeyi blank olarak kullanılmaz ise diyabet, hemodiyaliz, karaciğer hastalığı, intravenöz çözeltiler veya kan toplama cihazlarının kontaminasyonundan kaynaklanan serbest gliserol, trigliseritin aşırı değerlendirilmesine neden olabilmektedir.¹

Friedewald denklemiyle TKOL, TG ve HDL ölçümünden LDL kolesterol düzeyinin hesaplanması ise aşağıdaki formüle göre yapılmaktadır.⁵⁶

$$\text{LDL (mg/dl)} = \text{Total kolesterol} - \text{HDL Kolesterol} - \frac{\text{Trigliserid}}{5}$$

Öncelikle bu formül 400 mg/dL üzeri tip III dislipidemi yada şilomikron varsa şüphelidir.⁵⁷ Diğer yandan yanlış yüksek trigliserid ölçümüne bağlı olarak LDL düzeyi de yüksek çıkacağı için gliserolün blank olarak bu formülde de kullanılması gerekmektedir.¹

Bu çalışmada dislipidemi (hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi ve karışık hiperlipidemi) oluşturulan erkek ratlarda öncelikle serum kolesterol ester oranı ile serbest gliserol düzeyinin kesin dislipidemi teşhisinde kullanılabilirliğinin belirlenmesi

amaçlanmıştır. Bunun yanında lipid metabolizması ile ilgili enzimlerin (LKAT ve KETP), lipoproteinlerin (LDL, HDL) ve lipid profilinin de (TG, SKOL, SYA, FL) karşılıklı değişimleri ortaya konmuştur.²⁶



3. MATERYAL VE METOT

3.1. DeneY Hayvanları

Araştırmanın hayvan materyalini Atatürk Üniversitesi DeneY Hayvanları Merkezi'nden (ATADEM) temin edilen 70 adet erkek Spraque-Dawley 420 ± 25 gr ağırlığındaki ratlar oluşturdu.

DeneYde kullanılacak olan ratlar uygulamadan 7 gün önce gruplar arası istatistiki fark olmayacak şekilde tartılarak seçildi. Gruplara ayrılan ratlara grup spesifik yem ve su *ad libitum* verildi.

Çalışma, Araştırma Atatürk Üniversitesi Hayvan DeneYleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK; 22.11.2018 tarih ve 219 sayılı karar) tarafından onaylanmış, ve TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (119S165 No'lu proje).

3.2. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar

UV-visible Spektrofotometre : EPOCH, GEN 5 Yazılımlı, BIO-TEK

Soğutmalı Santrifüj : ALLEGRA 32R, BECKMAN-COULTER

Ph Metre : Seven Compact, METTLER TOLEDO

Etüv : Ecocell 55, MMM Group

Vorteks : MS-3, IKA

Otomatik Pipetler : REFERENCE 2, EPPENDORF

Saf Su Cihazı : 2001/2, GFL

Buzdolabı : BOSCH

Hassas Terazı : AS 60/220.X2 PLUS (0.01 MG), RADWAG

Homojenizatör : TISSUELYSER LT, TISSUELYSER II, QIAGEN

İnkübatör : THERMOMIXER C, EPPENDORF

İTK tankı : GENERAL GLASSBLOWING COMPANY

Mini fırın : ARÇELİK

3.3. Çalışmada Kullanılan İlaç

Dekzametazon: Çalışmamızda dekzametazon kaynağı olarak Devamed flakon (3 mg/mL, Topkim İlaç) kullanıldı.

Glukokortikoidler vücuttaki karşı regüle edici hormonlardır ve karbonhidrat, lipit ve protein metabolizması üzerinde geniş etkileri olan yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Glukokortikoidlerin biyolojik etkilerinin mekanizmaları çeşitlidir (örn. Transkripsiyon regülasyonu ve non-genomik etki).^{58, 59} Hiperkortizolemi veya glukokortikoid tedavisi, insanlarda⁶⁰⁻⁶² ve kemirgenlerde dolaşımdaki artan SYA'lar ile ilişkilidir.^{63, 64} Genel olarak, glukokortikoidler kısa süreli (<6 saat) stimülasyonda yağ lipolizini sadece hafifçe artırabilir ancak, glukokortikoidler, çeşitli hormonların adipositlerde normal^{65, 66} ve ileri lipoliz tepkileri üretmesini sağlar; örneğin glukokortikoidler, katekolaminler, tirozinler ve GH'ye yanıt olarak adipositlerin lipolizini artırır.^{67, 68} Bununla birlikte, yapılan bir çalışma, deksametazon ile 24 saat boyunca uzun süreli stimülasyonun adipositlerden gliserol salınımını arttırdığı bildirildiği için bu projede kullanılmıştır.⁶⁹

Uygulanan doz daha önce yapmış olduğumuz "Yumurtacı Tavuklarda Lipid Profiline Stres Göstergesi Olarak Kullanılabilirliğinin Araştırılması" projeden yararlanılarak seçilmiştir.

3.4. Metot

3.4.1. Deneysel Uygulamalar

Tüm ratlar her grupta 10 rat olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Çalışmada Wong ve ark.⁷⁰ tarafından açıklanan dislipidemi oluşturma modelleri kullanıldı.

1. Grup: Kontrol (Sağlıklı); Ratlara 8 hafta süreyle %13 yağ, %20 protein ve %67 karbohidrattan oluşan, metabolize olabilen enerjisi ~3,506 kcal/kg lık kontrol diyeti verildi.

2. Grup: Ratlara 7 gün süreyle %13 yağ, %20 protein ve %67 karbohidrattan oluşan, metabolize olabilen enerjisi ~ 3,506 kcal/kg lık kontrol kontrol diyetine ilave olarak 0,1 mg/kg deksametazon i.m. enjekte edildi.

3. Grup: Ratlara 7 gün süreyle %13 yağ, %20 protein ve %67 karbohidrattan oluşan, metabolize olabilen enerjisi ~ 3,506 kcal/kg lık kontrol kontrol diyetine ilave olarak 0,5 mg/kg deksametazon i.m. enjekte edildi.

4. Grup: Ratlara 7 gün süreyle %13 yağ, %20 protein ve %67 karbohidrattan oluşan, metabolize olabilen enerjisi ~ 3,506 kcal/kg lık kontrol kontrol diyetine ilave olarak 1 mg/kg deksametazon i.m. enjekte edildi.

5. Grup: Ratlara 7 gün süreyle %13 yağ, %20 protein ve %67 karbohidrattan oluşan, metabolize olabilen enerjisi ~ 3,506 kcal/kg lık kontrol kontrol diyetine ilave olarak 2 mg/kg deksametazon i.m. enjekte edildi.

6. Grup: Ratlara 8 hafta süreyle %70 yağ, %15 protein ve %15 karbohidrattan oluşan, metabolize olabilen enerjisi ~ 5,385 kcal/kg lık lipemi diyeti + %10 fruktoz içme suyu ile verildi.

7. Grup: Ratlara 8 hafta süreyle %1 kolesterol ve %1 Na-kolat, %17 yağ, %17 protein ve %66 karbohidrattan oluşan, metabolize olabilen enerjisi ~ 3,739 kcal/kg lık aterojenik diyet + %3 kolesterol / %1 sodyum deoksikolat oral yolla verildi. Tüm gruplara su ad-libitum verildi.

3.4.2. Deney Sonunda Numunelerin Alınması

Denemenin 1. haftasında deksametazon grubundaki, denemenin 8. haftasında ise kontrol grubu, hipertrigliseridemi grubu ve hiperkolesterolemi grubundaki ratların *vena jugularis'* inden sevofloran anestezisi altında LiHeparin içeren tüplere kanları alındı. Alınan kan örnekleri Beckman Coulter Allegra X30 R santrifüj cihazında 3000 rpm'de

+4°C'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek plazmaları çıkarıldı. Plazmalar endorf tüplere porsiyonlanarak analizler yapılana kadar -80°C'deki derin dondurucuda saklandı.

3.5. Çalışmanın Biyokimyasal İncelenmesi

3.5.1. HDL-Kolesterol Düzeyinin Ölçülmesi

HDL-kolesterol düzeyleri (SIGMA, Almanya) kiti (Catalog No: MAK045-1KT) ile ölçüldü.

Ölçüm, renkli bir ürün veren kromojenlerin varlığında kolesterol esteraz ve kolesterol oksidazla reaksiyona girmesi için HDL kolesterolü serbest bırakan deterjan kullanılması esasına dayanmaktadır. Aynı deterjan LDL, VLDL ve şilomikronların yüzeylerine tutunarak kolesterol enzimleri ile reaksiyonunlarını inhibe eder. 600 nm'deki absorbans artışı HDL kolesterol düzeyi ile doğru orantılıdır. Reaksiyon dizisi aşağıda gösterilmiştir.⁷¹

Çalışma Reaktifleri		
Reaktif 1	MES Tamponu (pH 6,5)	6,5 mmol/L
	N-Bis(4-sülfobütil)-3-metilanilin	3 mmol/L
	Polivinil sülfonik asit	50mg/L
	Polietilen-glikol-metil ester	30ml/L
	MgCl ₂	2 mmol/L
	Reaktif 2	MES Tamponu (pH 6,5)
Kolesterol esteraz		5kU/L
Kolesterol oksidaz		20 kU/L
Peroksidaz		5 kU/L
4-Aminoantipirin		0,9 g/L
Deterjan		0,5 %

Deneyin gerçekleştirilmesi

HDL ölçümü prosedürü tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.1. HDL-kolesterol ölçüm prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
R1 (µL)	225	225	225
Standart (µL) 200 mg/dL	--	3	--
Örnek (µL)	--	--	3
Blank (µL)	3	--	--
Karıştırılıp 25°C'de 5 dk. inkübe edildi			
R2 (µL)	75	75	75

Tüpler karıştırıldı ve 5 dakika süreyle 25°C'de inkübe edildi. Süre sonunda tüplerdeki absorbans değerleri 600 nm de ölçüldü.

Standart Konsantrasyonu (Erba, XSYS0061): 65.8 mg/dL

$$\text{HDLk (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ Örnek} - (A) \text{ Blank}}{(A) \text{ Standard} - (A) \text{ Blank}} \times \text{Std. kons.}$$

3.5.2. LDL-Kolesterol Düzeyinin Ölçülmesi

LDL-kolesterol düzeyleri (SIGMA, Almanya) kiti (Catalog No: MAK045-1KT) ile ölçüldü.

Yöntem renkli bir ürün veren kromojenlerin varlığında kolesterol esteraz ve kolesterol oksidazla reaksiyona girmesi için LDL kolesterolü serbest bırakan deterjan kullanılmasına dayanmaktadır. Aynı deterjan kolesterol enzimlerinin LDL, VLDL ve şilomikronlar lipoproteinlerle reaksiyonunu onların yüzeylerine tutunarak inhibe eder. 600 nanometredeki absorbans artışı LDL kolesterol düzeyi ile doğru orantılıdır.^{72, 73}

Çalışma Reaktifleri		
Reaktif 1	MES Tamponu (pH 6,5)	50 mmol/L
	4-Aminoantipirin	0,9 g/L
	Polivinil sülfonik asit	50mg/L
	Polietilen-glikol-metil eter	30ml/L
	Peroksidaz	5 kU/L
	Kolesterol esteraz	5kU/L
	Kolesterol oksidaz	20 kU/L
	Deterjan	
	Reaktif 2	MES Tamponu (pH 6,5)
Deterjan		
N-Bis(4-sülfobütil)-3-metilanilin	3 mmol/L	

Deneyin gerçekleştirilmesi

LDL ölçümü için örnek ve standartlar aşağı tablodaki gibi tüplere kondu

Tablo 3.2. LDL-kolesterol ölçüm prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
R1 (µL)	300	300	300
Standart (µL) 200 mg/dL	--	4	--
Örnek (µL)	--	--	4
Blank (µL)	4	--	--
Karıştırılıp 25°C'de 5 dk. inkübe edildi			
R2 (µL)	100	100	100

Tüpler karıştırıldı ve 5 dakika süreyle 25°C'de inkübe edildi. Süre sonunda tüplerdeki absorbans değerleri 600 nm de ölçüldü.

Standart Konsantrasyonu (Erba, XSYS0061): 127.9 mg/dL

$$\text{LDLk (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ Örnek} - (A) \text{ Blank}}{(A) \text{ Standard} - (A) \text{ Blank}} \times \text{Std. kons.}$$

3.5.3. Trigliserit Analizi

Trigliserid düzeyleri (SIGMA, Almanya) kiti (Catalog No: T2449) ile ölçüldü.

Trigliserid, lipoprotein lipaz tarafından gliserol ve yağ asitlerine hidrolize edilir. Daha sonra gliserol, gliserol kinaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla adenozin trifosfat tarafından gliserol -3-fosfata ve adenozin difosfata fosforile edilir. Gliserol-3-fosfat daha sonra gliserolfosfat oksidaz tarafından dihidroksiaseton fosfat ve hidrojen peroksite dönüştürülür. Daha sonra hidrojen peroksit, peroksidaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla kırmızı renkli kinonimin boyası üretmek üzere 4-aminoantipirin ve paraklorofenol ile reaksiyona girer. 540 nanometredeki absorbans artışı trigliserid düzeyi ile doğru orantılıdır.^{52-55, 74}

Çalışma Reaktifleri

Trigliserid Reaktifi	Lipaz (mikrobiyal)	250,000 ünite/L
	Sodyum azid	0.05%
Serbest Gliserol Reaktifi	ATP	0.75 mM
	Magnezyum tuzu	3.75 mM
	4-Aminoantipirin	0.188 mM
	N-Etil-N-(3-sülfopropil) m-anizidin, sodyum tuzu	2.11 mM
	Gliserol Kinaz (mikrobiyal)	1,250 ünite/L
	Gliserol Fosfat Oksidaz (mikrobiyal)	2,500 ünite/L
	Peroksidaz (horseradish)	2,500 ünite/L
	Sodyum azid	0.05%
	Tampon, pH 7.0 ± 0.1	

Serbest Gliserol Reaktifi ve Trigliserid Reaktiflerinin Hazırlanması: Serbest gliserol reaktifi 40 mL, trigliserid reaktifi 10 mL distile su ile çözüldü. Koyu renkli şişede ve +4°C'de saklandı.

Trigliserid Çalışma Reaktifi: 40 mL hazırlanmış Serbest Gliserol Reaktifi ile 10 mL hazırlanmış trigliserid reaktifi karıştırılarak hazırlandı. Koyu renkli şişede ve +4°C'de saklandı.

Standart: Serbest Triolein Standartı (Katalog Numarası G7793) 250 mg/dL.

Deneyin gerçekleştirilmesi

Trigliserid ölçümü için örnek ve standartlar aşağı tablodaki gibi tüplere kondu

Tablo 3.3. Trigliserit ölçüm prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
Reaktif (mL)	1.0	1.0	1.0
Standart (µL) 200 mg/dL	--	10	--
Örnek (µL)	--	--	10
Blank (µL)	10	--	--

Tüpler karıştırıldı ve 10 dakika süreyle oda sıcaklığında beklendi. Süre sonunda tüplerdeki absorbans değerleri 540 nm'de ölçüldü.

Örneklerdeki trigliserid düzeyleri, konsantrasyonu bilinen triolein standartına ait absorbans değeri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Trigliserid (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ Örnek} - (A) \text{ Blank}}{(A) \text{ Standart} - (A) \text{ Blank}} \times 250 \text{ (Std. kons.)}$$

3.5.4. Serbest Gliserol Analizi

Serbest-gliserol düzeyleri (SIGMA, Almanya) kiti (Catalog No: F6428) ile ölçüldü.

Serbest gliserol, gliserol kinaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla adenozin trifosfat tarafından gliserol -3-fosfata ve adenozin difosfata fosforile edilir. Gliserol-3-fosfat daha sonra gliserolfosfat oksidaz tarafından dihidroksiaseton fosfat ve hidrojen peroksite dönüştürülür. Daha sonra hidrojen peroksit, peroksidaz tarafından katalize edilen bir reaksiyonla kırmızı renkli kinonimin boyası üretmek üzere 4-aminoantipirin ve

paraklorofenol ile reaksiyona girer. 540 nanometredeki absorbans artışı trigliserid düzeyi ile doğru orantılıdır.⁵²⁻⁵⁵

Çalışma Reaktifleri

Serbest Gliserol Reaktifi	ATP	0.75 mM
	Magnezyum tuzu	3.75 mM
	4-Aminoantipirin	0.188 mM
	N-Etil-N-(3-sülfopropil) m-anizidin, sodyum tuzu	2.11 mM
	Gliserol Kinaz (mikrobiyal)	1,250 ünite/L
	Gliserol Fosfat Oksidaz (mikrobiyal)	2,500 ünite/L
	Peroksidaz (horseradish)	2,500 ünite/L
	Sodyum azid	%0.05
	Tampon, pH 7.0 ± 0.1	

Serbest Gliserol Reaktifi (Çalışma Reaktifi) Hazırlanması: Serbest gliserol reaktifi 40 mL distile su ile çözüldü. Koyu renkli şişede ve +4°C'de saklandı.

Serbest Gliserol Reaktif Blanki: 4 mL hazırlanmış Serbest Gliserol Reaktifi ile 1 mL distile su karıştırılarak hazırlandı. Koyu renkli şişede ve +4°C'de saklandı.

Standart: Serbest Gliserol Standartı (Katalog Numarası G7793) 250 mg/dL.

Deneyin gerçekleştirilmesi

Gliserol ölçümü için örnek ve standartlar aşağı tablodaki gibi tüplere kondu

Tablo 3.4. Serbest gliserol ölçüm prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
Reaktif (mL)	1.0	1.0	1.0
Standart (µL) 250 mg/dL	--	10	--
Örnek (µL)	--	--	10
Blank (µL)	10	--	--

Tüpler karıştırıldı ve 10 dakika süreyle oda sıcaklığında beklendi. Süre sonunda tüplerdeki absorbans değerleri 540 nm'de ölçüldü.

Örneklerdeki serbest gliserol düzeyleri, konsantrasyonu bilinen gliserol standartına ait absorbands değeri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Serbest gliserol (mg/dl)} = \frac{(\text{A}) \text{ Örnek} - (\text{A}) \text{ Blank}}{(\text{A}) \text{ Standard} - (\text{A}) \text{ Blank}} \times 250 (\text{Std. kons.})$$

3.5.5. Gerçek Triglicerid Konsantrasyonunun Hesaplanması

Gerçek Triglicerid Konsantrasyonu (mg/dL) : Ölçülen Triglicerid Konsantrasyonu (mg/dL) - Serbest Gliserol Konsantrasyonu (mg/dL)⁷⁵

3.5.6. Total Kolesterol Analizi

Total-kolesterol düzeyleri (SIGMA, Almanya) kiti (Catalog No: MAK043) ile ölçüldü.

Bu testte önce kolesterol esterleri kolesterol esterazla hidroliz edilerek serbest kolesterol elde edilir. Kolesterol oksidaz, oksijen kullanarak serbest kolesterolü oksitler ve H₂O₂ oluşumunu sağlar. H₂O₂, çeşitli bileşiklerle reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturur. Meydana gelen renkli karışım 500 nm'de okunur. 500 nanometredeki absorbands artışı kolesterol düzeyi ile doğru orantılıdır.^{45-47, 76}

Çalışma Reaktifleri

Reaktif 1	Good's Buffer	50 mmol/L
	Fenol	5 mmol/l
	4-Aminoantipirin	0.3 mmol/l
	Kolesterol esteraz	≥ 200 U/l
	Kolesterol oksidaz	≥ 50 U/l
	Kolesterol esteraz	5kU/L
	Peroksidaz	≥ 3 kU/l
Reaktif 2	Standart	200 mg/dL

Deneyin gerçekleştirilmesi

Total kolesterol ölçüm prosedürü tablo 3.6'da gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Total kolesterol ölçüm prosedürü

	Kör	Standart	Örnek
Reaktif (mL)	1.0	1.0	1.0
Standart (µL) 200 mg/dL	--	10	--
Örnek (µL)	--	--	10
Blank (µL)	10	--	--

Tüpler karıştırıldı ve 10 dakika süreyle oda sıcaklığında beklendi. Süre sonunda tüplerdeki absorbans değerleri 505 nm'de ölçüldü.

Standart konsantrasyonu: 200 mg/dL

Örneklerdeki total kolesterol düzeyleri, konsantrasyonu bilinen kolesterol standartına ait absorbans değeri kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\text{Total Kolesterol (mg/dl)} = \frac{(A) \text{ Örnek} - (A) \text{ Blank}}{(A) \text{ Standard} - (A) \text{ Blank}} \times 200 \text{ (Std. kons.)}$$

3.5.7. KETP Ekspresyon Analizi

KETP-ekspresyon düzeyleri (Bioassay Technology Laboratory, Çin) kiti (Catalog No: E0198Ra) ile ölçüldü.

Bu ölçüm bir Enzime Bağlı İmmünosorbent (ELISA) analizidir. Plakalar önceden, Rat KETP antikoru ile kaplanmıştır. Numunede bulunan KETP, kuyucuklar üzerine kaplanmış antikorlara bağlanır ve sonra biyotinlenmiş rat KETP antikoru eklenerek numunedeki KETP'ye bağlanır. Daha sonra Streptavidin-HRP eklenir ve biyotinlenmiş KETP antikoruna bağlanır. İnkübasyondan sonra bağlanmamış Streptavidin-HRP yıkama basamağı sırasında yıkanıp uzaklaştırılır. Sonrasında substrat çözeltisi eklenir ve rat KETP miktarı ile orantılı olarak renk oluşur. Reaksiyon, asidik durdurma çözeltisi ilave edilerek sonlandırılır ve absorbans, 450 nm'de ölçülür.⁷⁷⁻⁸⁰

Standartların Hazırlanması

Tüm reaktifler kullanılmadan önce oda sıcaklığına getirildi.

Standart solüsyonları hazırlamak için stok standart solüsyonu (64 ng/mL) seri halde aşağıdaki tabloya göre standart seyreltici ile sulandırıldı. Seyreltme yapmadan önce standart hafifçe çalkalayarak 15 dakika bekletildi. Standart seyreltici blank olarak kullanıldı (0 ng / ml):

Tablo 3.7. KETP standartlarının hazırlanması

Standart	Kuyucuktaki son konsantrasyon	Standart dilüsyonu
Stok	64ng/ml	
Standard 5	32ng/ml	120µL Stok Standard + 120µL Standart
Standard 4	16ng/ml	120µL Standard 5 + 120µL Standart
Standard 3	8ng/ml	120µL Standard 4 + 120µL Standart
Standard 2	4ng/ml	120µL Standard 3 + 120µL Standart
Standard 1	2ng/ml	120µL Standard 2 + 120µL Standart

Yıkama Tamponu:

20 ml yıkama tamponu konsantresi (25x) 475 ml distile su içerisinde çözüldü ve manyetik karıştırıcı üzerinde içerisindeki kristaller tamamen eriyene kadar yavaşça karıştırıldı.

Test Prosedürü:

1. Deney öncesi tüm reaktifleri oda sıcaklığına getirildi.
2. Standart kuyucuklarına 50'şer µL standart solüsyonları eklendi.
3. Örnek kuyucuklarına önce 40 µL plazma, ve sonrasında 10 µL anti-KETP antikoru eklendi.
4. Örnek kuyucuklarına ve standart kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP eklendi (boş kontrol kuyusu hariç).

5. Plaka üzeri koruyucu film ile kapatıldı ve karıştırmalı inkübatörde 37°C'de 60 dakika süreyle inkübe edildi.
6. Süre sonunda plaka üzerindeki koruyucu film çıkarıldı ve plaka ELİSA yıkayıcı ile her defasında 300 µL yıkama tamponu kullanılarak 5 kez yıkandı.
7. Yıkanmış plakadaki her bir kuyuya sırasıyla 50 µL kromojen A ve hemen arkasından 50 µL kromojen B çözeltileri eklendi.
8. Plaka üzeri koruyucu film ile kapatıldı ve karıştırmalı inkübatörde 37°C'de 10 dakika süreyle inkübe edildi.
9. Süre sonunda her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve
10. Durdurma çözeltileri eklendikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaka okuyucu kullanarak her kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlendi.

Sonuçların Hesaplanması:

Standartların, dikey (Y) eksenindeki OD'lerine, yatay (X) ekseninde karşılık gelen konsantrasyon düzeyleri kullanılarak standart bir eğri oluşturuldu ve grafik üzerindeki noktalardan geçen en uygun eğri çizildi. Eğrinin formülüne göre örneklerdeki KETP ekspresyon düzeyleri belirlendi.

3.5.8. LKAT Aktivite analizi

LKAT aktivite analizi (SIGMA, Almanya) kiti (Catalog No: MAK107-1KT) ile ölçüldü.

1x Tespit Solüsyonu hazırlanması:

-Gereken toplam hacim (Th) [kuyucukların toplam sayısı + 6] x 100 µL

-LKAT Tespit Solüsyonu Hacmi (100x)

[Kuyucukların toplam hacmi (A2 dan Th)] x 0.01

-Gerekli 1X LKAT Ölçüm Tamponu Hacmi [Kuyucukların toplam hacmi (A'dan Th)] x 0.99

Açıltransferaz reaksiyon karışımı hazırlanması

1x LKAT "Reaksiyon Karışımı" hazırlandı:

-Gereken toplam hacim (Th) [kuyucukların toplam sayısı + 4] x 25 µL

-LKAT Reaksiyon Tamponu Hacmi (5x) [Kuyucukların toplam hacmi (A2 dan Th)] x 0.02

-Gereken akseptör substrat hacmi [Ampirik olarak kullanılan enzime dayalı belirlenir](µL)

-Gerekli 1X LKAT Ölçüm Tamponu Hacmi

[Kuyucukların toplam hacmi (A2 dan Th)] x 0.98 – [Gerekli substrat miktarı]

Yukarıdaki B, C ve D'de hesaplanan uygun reaktif hacimlerini birleştirerek 1x reaksiyon karışımı hazırlandı.

Reaksiyon kuyucuklarının doldurulması

- Test Numune Kuyucukları = 25 µL örnek.
 - Blank Kuyucukları = 25 µL 1x LKAT Ölçüm Tamponu.
 - Pozitif Kontrol = 50 µL 1x Pozitif kontrol.
 - Blank Pozitif Kontrol = 50 µL 1x LKAT Ölçüm Tamponu.
1. Blank ve örnek kuyucuklarına 25 µL 1x reaksiyon karışımı eklendi.
 2. Plaka üzeri koruyucu film ile kaplandı.
 3. 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi.
 4. Her kuyucuğa 50 µL buz soğukluğunda izopropil alkol eklendi.
 5. Her kuyucuğa 100 µL 1x tespit solüsyonu eklendi.
 6. Plaka üzeri koruyucu film ile kaplandı ve çalkalamadan oda sıcaklığında 10 dakika süreyle inkübe edildi.

7. Floresan mikropilaka okuyucuda Ex/Em = 380/520 nm'de okundu.⁸¹⁻⁸³

3.5.9. Kolesterol Ester Oranının Belirlenmesi (YPİTK Metod)

Bu işlem, 20x10 cm Silika Jel 60 YPİTK plakası kullanılarak gerçekleştirildi. 1 ml plazma üzerine 1 ml n-hekzan/izo-propanol (2:1 (h/h)) karışımı eklendikten sonra tüplerin kapağı kapatılarak şiddetli bir biçimde vortekslendi ve on dakika beklendikten sonra tekrar vortekslendi. Bu işlem 2 defa daha tekrar edildi.⁸⁴ Vortekslenen tüpler 5000 xg'de 10 dk süreyle santrifüj edilerek üst faz (hekzan fazı) lipid standartları ile birlikte (kolesteril oleat, triolein, palmitat, serbest kolesterol, dipalmitoilfosfatidilkolin) YPİTK plakalarına yüklendi. Plakalara yüklenen lipid sınıfları hekzan: dietileter: asetik asit (80:20:2 (h/h/h)) karışımında 7 cm yürütülüp, oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan bu plakalar üzerine %8 H₃PO₄ içerisindeki %3'lük CuSO₄ püskürtüldü ve 150°C'deki etüvde yaklaşık 10 dk süreyle yakılarak lipid bantları görünür hale getirildi. YPİTK plakaları Epson Perfection V700 foto-tarayıcı ile fotoğrafı alındıktan sonra, her bir örneğe ait lipid bantlarının kapladığı alan Phoretix 1D (TL120) yazılımı kullanılarak tespit edildi ve toplam karışımdaki % olarak ifade edildi.⁸⁵

3.6. İstatistik Analiz

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 20.0 yazılım programı kullanılarak yapılmıştır. Bütün ölçümlerde istatistiksel farklılıklar ve önem seviyeleri "One-way Analysis of Variance (ANOVA)" testi ile belirlenmiş ve çoklu karşılaştırmalarda Tukey testi uygulanmıştır. Sonuçlar Ortalama \pm SS olarak verildi, istatistik önem derecesi P<0.05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Spektrofotometrik Bulgular

Tablo 4.1. Deneme grubu hayvanlarına ait plazma sonuçları.

	KONT	0.1	0.5	1	2	HTG	HKOL
GTG, mg/dL	164.02±16.70 ^b	155.16±13.00 ^b	149.08±23.00 ^b	148.16±17.20 ^b	135.78±17.80 ^b	247.70±36.10 ^a	225.84±37.70 ^a
ÖTG, mg/dL	172.40±15.00 ^d	190.20±15.30 ^{cd}	202.00±17.30 ^{cd}	211.00±16.20 ^c	209.40±13.50 ^c	301.00±44.60 ^a	261.00±36.50 ^b
SGLİ, mg/dL	8.39±2.06 ^e	35.06±5.82 ^d	52.92±9.09 ^c	62.84±5.00 ^b	73.64±7.40 ^a	53.30±9.79 ^c	35.17±4.69 ^d
TKOL, mg/dL	140.77±10.37 ^{de}	146.83±13.62 ^d	178.53±9.81 ^c	206.12±12.04 ^b	209.11±13.97 ^b	124.81±11.96 ^c	302.60±12.53 ^a
LDL, mg/dL	70.06±4.79 ^e	83.62±8.09 ^d	91.41±5.67 ^{cd}	97.24±7.69 ^{bc}	106.28±9.49 ^b	51.67±5.07 ^f	152.57±12.68 ^a
HDL, mg/dL	34.89±2.96 ^e	59.95±5.11 ^d	71.53±5.96 ^c	79.85±7.06 ^{bc}	83.73±7.17 ^b	28.76±2.01 ^e	111.06±9.71 ^a
KETP, ng/ml	0.43±0.076 ^d	1.16±0.285 ^c	1.62±0.206 ^b	1.67±0.276 ^b	1.79±0.221 ^{ab}	0.39±0.059 ^d	2.02±0.298 ^a
LKAT, nmol/ml	40.46±3.98 ^e	54.46±5.02 ^d	68.02±4.82 ^c	77.52±5.54 ^b	79.08±6.62 ^b	35.56±4.81 ^e	105.56±11.00 ^a
KOLE, %	20.45±1.368 ^f	25.01±1.367 ^e	32.93±1.749 ^c	36.98±1.400 ^b	39.82±2.043 ^a	27.65±1.263 ^d	32.53±1.669 ^c
TG, %	47.28±2.137 ^a	42.16±2.012 ^b	37.82±1.895 ^c	33.13±2.187 ^d	26.20±1.620 ^e	48.52±2.357 ^a	23.49±1.505 ^f
SYA, %	1.98±0.418 ^c	4.99±0.695 ^b	5.60±0.756 ^b	6.42±0.691 ^a	6.90±0.574 ^a	2.09±0.352 ^c	1.72±0.540 ^c
SKOL, %	10.53±0.928 ^b	6.21±0.654 ^c	6.12±0.710 ^c	4.82±0.560 ^d	4.05±0.592 ^d	7.20±0.539 ^c	29.16±1.547 ^a
FL, %	19.76±1.075 ^b	21.62±1.771 ^a	17.54±1.125 ^c	18.65±1.080 ^{bc}	23.04±1.597 ^a	14.54±1.180 ^d	13.11±0.929 ^d

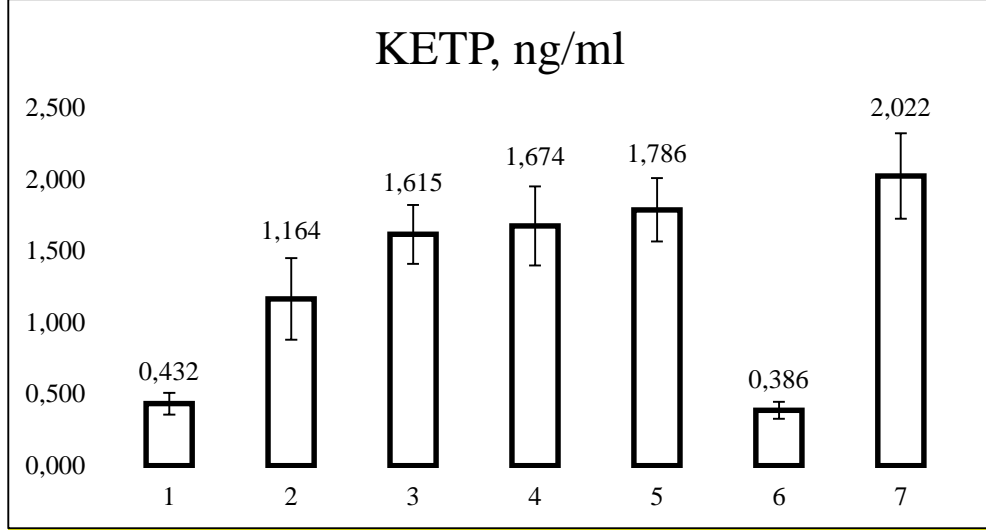
*Aynı satırdaki farklı üstel harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (P<0.05).

Tablo 4.2. Çalışmada ölçülen parametrelerin birbiri ile korelasyonu

		TKOL	HDL	LDL	KOLE	TG	SYA	SKOL	FL	LKAT	KETP	SGLİ	ÖTG	GTG
TKOL	Korelasyon	1	,910**	,943**	,543**	-,884**	,011	,708**	-,316**	,923**	,803**	,170	,164	,091
	Önem		,000	,000	,000	,000	,925	,000	,008	,000	,000	,158	,175	,452
HDL	Korelasyon		1	,921**	,658**	-,912**	,281*	,504**	-,101	,943**	,914**	,305*	,018	-,118
	Önem			,000	,000	,000	,019	,000	,404	,000	,000	,010	,880	,329
LDL	Korelasyon			1	,476**	-,886**	,050	,684**	-,198	,906**	,793**	,109	,024	-,024
	Önem				,000	,000	,684	,000	,100	,000	,000	,370	,843	,842
KOLE	Korelasyon				1	-,754**	,648**	-,104	,056	,648**	,731**	,817**	,168	-,196
	Önem					,000	,000	,393	,646	,000	,000	,000	,166	,104
TG	Korelasyon					1	-,323**	-,420**	,025	-,905**	-,863**	-,419**	-,034	,154
	Önem						,006	,000	,835	,000	,000	,000	,778	,204
SYA	Korelasyon						1	-,642**	,622**	,228	,472**	,655**	-,345**	-,648**
	Önem							,000	,000	,058	,000	,000	,003	,000
SKOL	Korelasyon							1	-,630**	,541**	,283*	-,402**	,297*	,485**
	Önem								,000	,000	,017	,001	,013	,000
FL	Korelasyon								1	-,172	,001	,139	-,624**	-,701**
	Önem									,155	,991	,251	,000	,000
LKAT	Korelasyon									1	,865**	,288*	,070	-,058
	Önem										,000	,016	,565	,634
KETP	Korelasyon										1	,439**	-,031	-,230
	Önem											,000	,796	,056
SGLİ	Korelasyon											1	,273*	-,170
	Önem												,022	,159
ÖTG	Korelasyon												1	,901**
	Önem													,000
GTG	Korelasyon													1
	Önem													

*Aynı satırdaki farklı üstel harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (P<0.05).

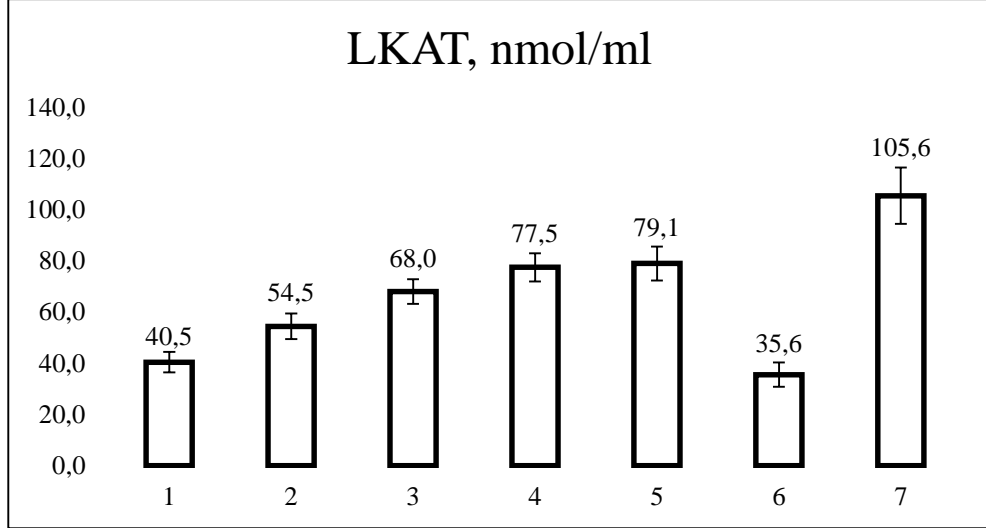
**Aynı satırdaki farklı üstel harfler gruplar arası farklılığı göstermektedir (P<0.01).



Şekil 4.1. Plazma KETP ekspresyon düzeylerinin deneme gruplarına göre değişimi

Plazma KETP ekspresyonunun en fazla hiperkolesterolemi en az ise hipertrigliseridemi grubunda olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$). Kontrol grubundaki hayvanların KETP ekspresyon düzeyleri ile dekzametazon verilen gruplardaki KETP ekspresyon düzeyleri bu iki grup arasında yer almıştır (Tablo 4.1, Şekil 4.1).

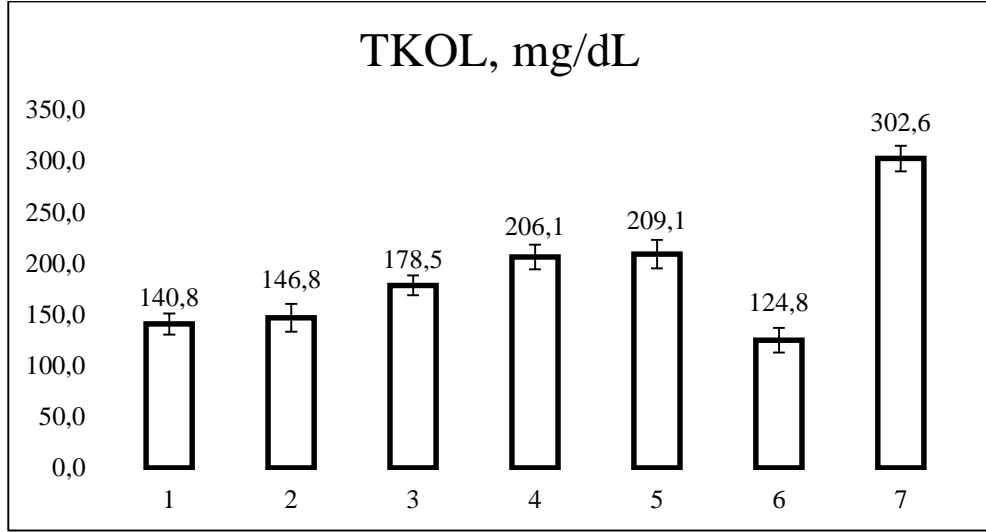
Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma KETP ekspresyonunun arttığı, artan KETP ekspresyonunun ise plazma HDL-LDL, TKOL ile lipolizin göstergesi olan SGLİ düzeyleri ve LKAT aktivitesi ile önemli düzeyde ($P<0.01$), plazma SKOL yüzdesi ile de orta düzeyde önemli ($P<0.05$) pozitif ilişki olduğu, plazma ÖTG yada GTG konsantrasyonları ile ise ilişkili olmadığı görüldü (Tablo 4.2).



Şekil 4.2. Plazma LKAT enzim aktivitesinin deneme gruplarına göre değişimi

Plazma LKAT enzim aktivitesinin en fazla kolesterol en az ise trigliserid grubunda olduğu tespit edilmiştir ($P<0.001$). Kontrol grubundaki hayvanların LKAT enzim aktivitesi ile dekzametazon verilen gruplardaki LKAT enzim aktivitesi bu iki grup arasında yer almıştır (Tablo 4.1 Şekil 4.2).

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma LKAT enzim aktivitesinin arttığı, artan LKAT aktivitesinin ise plazma HDL-LDL, TKOL düzeyleri, plazma KOLE, SKOL oranları ve KETP ekspresyonu ile önemli düzeyde ($P<0.01$), lipolizin göstergesi olan plazma SGLİ düzeyi ile de orta düzeyde ($P<0.05$) pozitif ilişkili olduğu ancak plazma ÖTG yada GTG konsantrasyonları ile ilişkili olmadığı görüldü (Tablo 4.2).

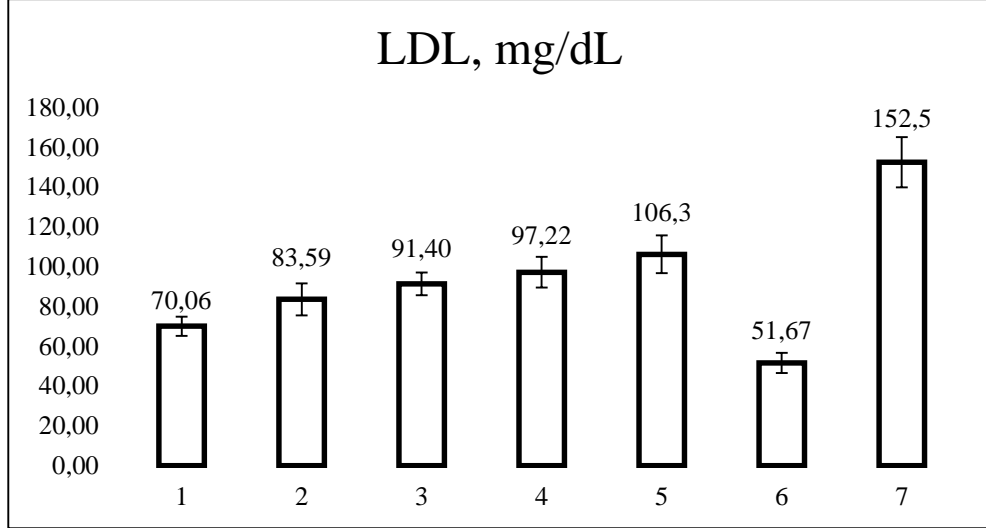


Şekil 4.3. Plazma TKOL konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi

Plazma TKOL konsantrasyonunun en fazla hiperkolesterolemi grubunda en az ise hipertrigliseridemi grubunda olduğu tespit edildi (Tablo 4.1, Şekil 4.5). Karışık hiperlipidemi gruplarından 0.1 ve 0.5 mg/kg dekzametazon verilen gruplardaki rat plazma TKOL düzeyleri hiperkolesterolemi için AdTP tarafından belirlenen 200 mg/dL eşik değerinin altında kalırken, 1 ve 2 mg/kg dekzametazon verilen gruplardaki rat plazma TKOL düzeyleri ise eşik değeri aşmıştır.

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma TKOL konsantrasyonunun giderek arttığı, deneme sonunda hipertrigliseridemi grubundan fazla, hiperkolesterolemi grubundan ise az bir değer aldığı ($P < 0.001$) görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.5).

Bununla birlikte plazma TKOL konsantrasyonunun plazma SKOL ve KOLE oranları ile LKAT aktivitesi, KETP ekspresyonu, HDL ve LDL düzeyleri ile önemli düzeyde pozitif ilişkili ($P < 0.01$) olduğu, plazma SGLİ düzeyi ile ilişkisinin olmadığı ($P > 0.05$) tespit edildi (Tablo 4.2).

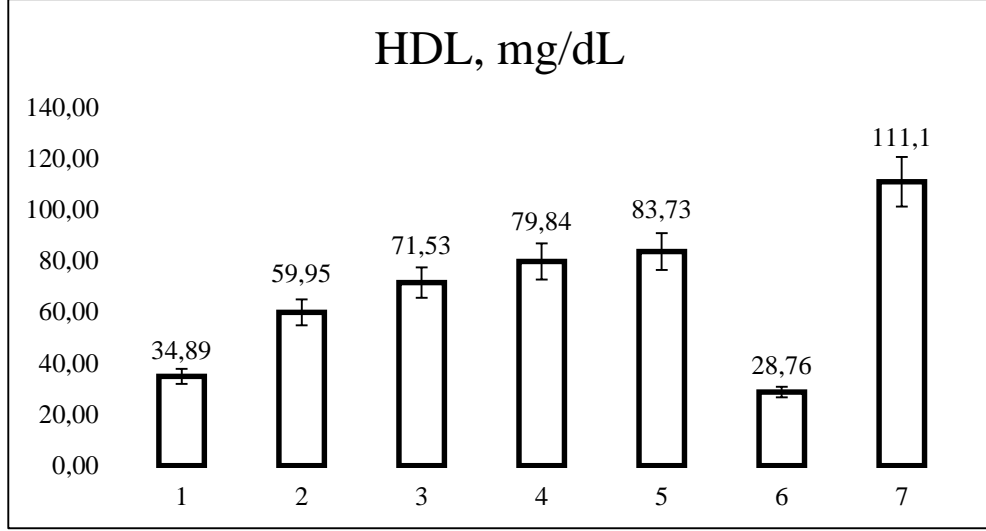


Şekil 4.4. Plazma LDL konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi

Plazma LDL konsantrasyonunun en fazla hiperkolesterolemi grubunda en az ise hipertrigliseridemi grubunda olduğu tespit edildi (Şekil 4.6).

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma LDL konsantrasyonunun giderek arttığı, deneme sonunda hipertrigliseridemi grubundan fazla, hiperkolesterolemi grubundan ise az bir değer aldığı ($P<0.001$) görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.6).

Bununla birlikte plazma LDL konsantrasyonunun plazma SKOL ve KOLE yüzdeleri ile plazma LKAT aktivitesi, KETP ekspresyonu, plazma HDL, TKOL düzeyleri ile önemli düzeyde pozitif ilişkili ($P<0.01$) olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).

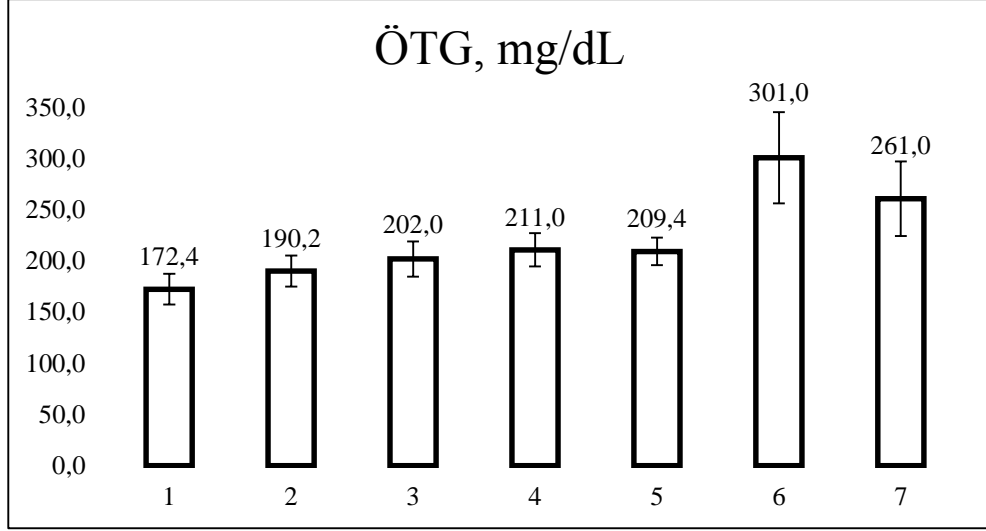


Şekil 4.5. Plazma HDL konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi

Plazma HDL konsantrasyonunun en fazla hiperkolesterolemi grubunda en az ise hipertrigliseridemi grubunda olduğu tespit edildi (Şekil 4.7).

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma HDL konsantrasyonunun giderek arttığı, deneme sonunda hipertrigliseridemi grubundan fazla, hiperkolesterolemi grubundan ise az bir değer aldığı ($P<0.001$) görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.7).

Bununla birlikte plazma HDL konsantrasyonunun plazma SKOL ve KOLE oranları ile plazma LKAT aktivitesi, KETP ekspresyonu, plazma LDL, TKOL düzeyleri ile önemli düzeyde ($P<0.01$) pozitif ilişkili olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).



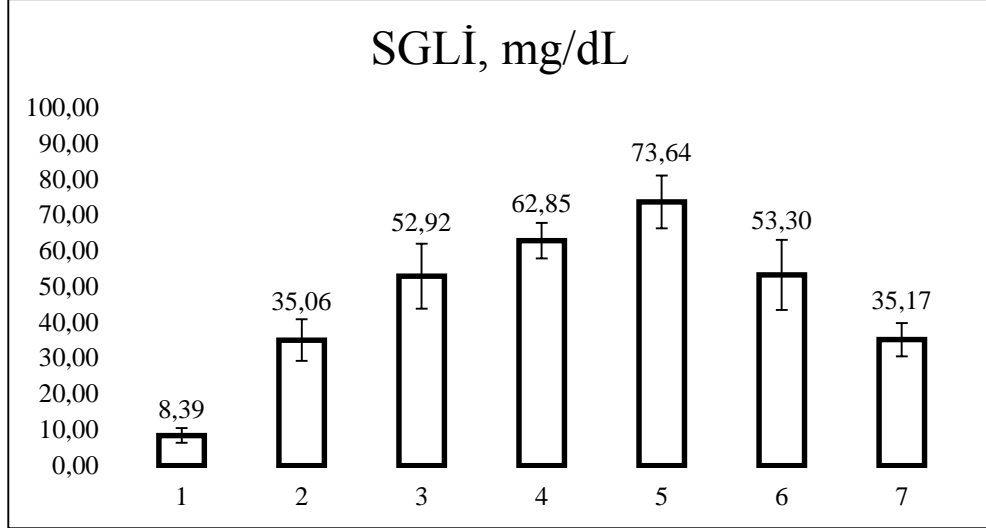
Şekil 4.6. Ölçülen plazma TG konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi

Plazma ölçülen TG konsantrasyonunun en fazla hipertrigliseridemi grubunda en az ise kontrol grubunda olduğu tespit edildi (Şekil 4.8).

Karışık hiperlipidemi gruplarından 0.1 mg/kg dekzametazon verilen gruptaki rat plazma ÖTG düzeyi hipertrigliseridemi için AdTP tarafından belirlenen 200 mg/dL eşik değerinin altında kalırken, 0.5, 1 ve 2 mg/kg dekzametazon verilen gruptaki rat plazma ÖTG düzeyleri ise eşik değeri aşmıştır (Tablo 4.1, Şekil 4.8).

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma ÖTG konsantrasyonunun giderek arttığı fakat deneme sonunda hem hipertrigliseridemi grubundan hem de hiperkolesterolemi grubundan daha az bir değer aldığı ($P<0.001$) görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.8).

Bununla birlikte plazma ÖTG konsantrasyonunun plazma SYA oranı ile önemli ölçüde negatif ilişkili ($P<0.01$) olduğu, plazma KOLE oranı ve plazma SGLİ konsantrasyonu ile orta düzeyde pozitif ilişkili ($P<0.05$) olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).

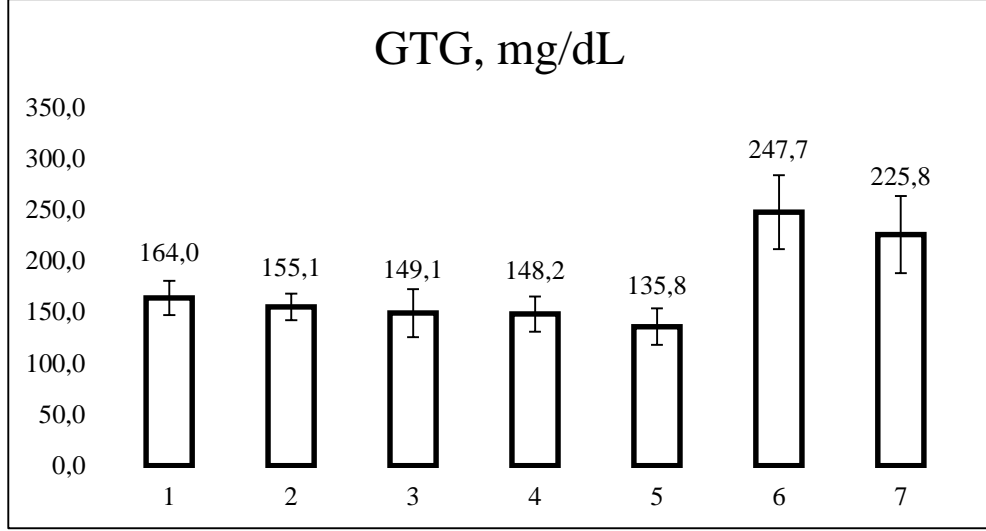


Şekil 4.7. Plazma SGLİ konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi

Plazma SGLİ konsantrasyonunun en fazla 2 mg/kg dekzametazon verilen grupta olduğu en az ise kontrol grubunda olduğu tespit edildi (Şekil 4.9).

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma SGLİ konsantrasyonunun giderek arttığı, deneme sonunda hem hipertrigliseridemi grubundan hem de hiperkolesterolemi grubundan fazla bir değer aldığı, kontrol grubunun ise ~7 katı bir değere ulaştığı ($P<0.001$) görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.9).

Bununla birlikte plazma SGLİ konsantrasyonunun plazma KOLE ve SYA oranları, KETP ekspresyonu ile önemli düzeyde pozitif ($P<0.01$), LKAT aktivitesi, ÖTG konsantrasyonu ve HDL düzeyi ile orta düzeyde önemli pozitif ilişkisi ($P<0.05$) olduğu tespit edildi. Bunun yanında plazma SKOL oranı ile önemli düzeyde negatif ilişkili ($P<0.01$) olduğu görüldü (Tablo 4.2).



Şekil 4.8. Gerçek plazma TG konsantrasyonlarının deneme gruplarına göre değişimi

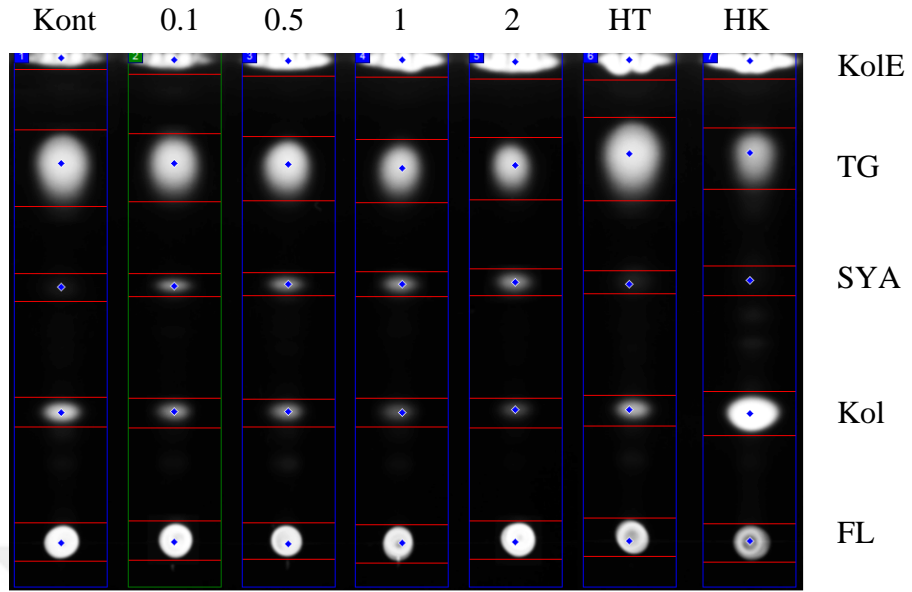
Plazma GTG konsantrasyonunun en fazla hipertrigliseridemi grubunda en az ise 2 mg/kg dekzametazon verilen grupta olduğu tespit edildi (Şekil 4.10).

Karışık hiperlipidemi gruplarından hiçbir hayvanın GTG düzeyinin AdTP tarafından belirlenen 200 mg/dL eşik değerinin üstünde olmadığı tespit edildi (Tablo 4.1, Şekil 4.10).

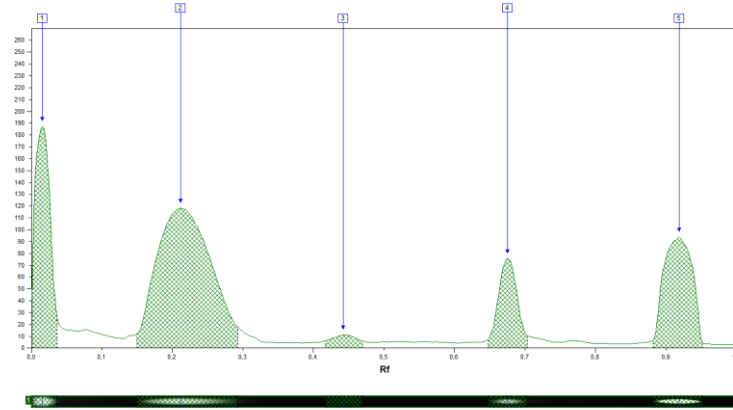
Karışık hiperlipidemi grubunda, uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma GTG konsantrasyonunun giderek azaldığı ve deneme sonunda hem hipertrigliseridemi hem de hiperkolesterolemi gruplarından çok daha az bir değer aldığı ($P<0.001$) görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.10).

Bununla birlikte plazma GTG konsantrasyonunun plazma ÖTG ve TKOL konsantrasyonu ile önemli düzeyde pozitif ilişkili ($P<0.01$) olduğu, plazma SYA oranı ile orta düzeyde negatif ilişkili ($P<0.05$) olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).

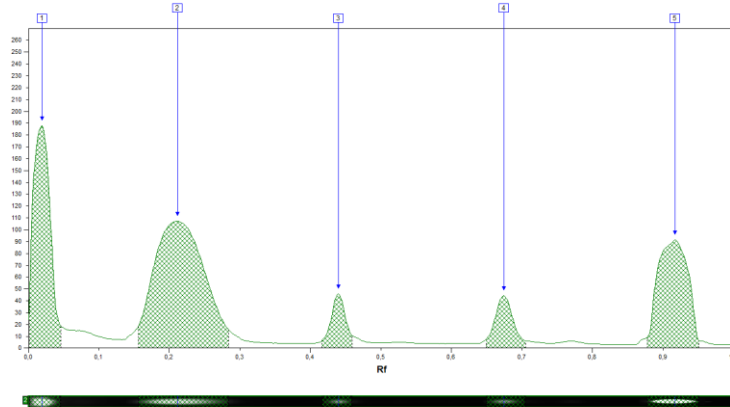
4.2. Kromatografik Bulgular



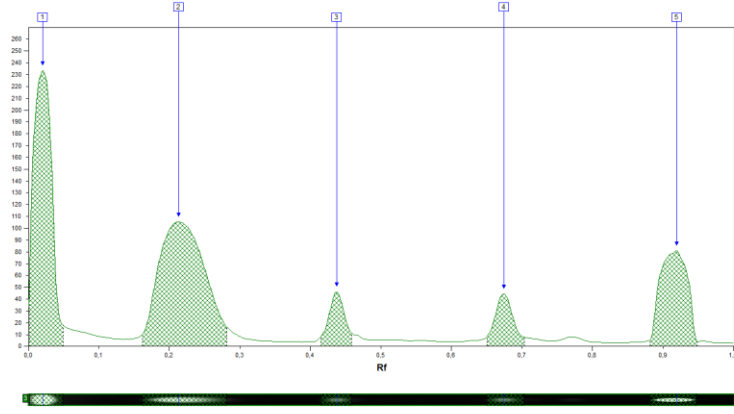
Şekil 4.9. Deneme sonu rat plazma lipid YPİT kromatogramı



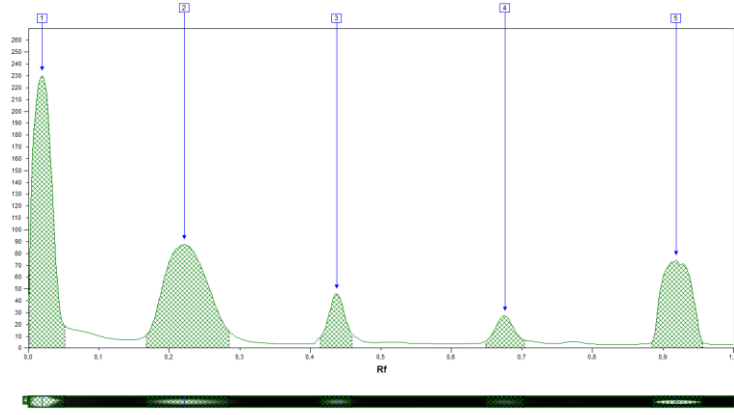
Şekil 4.10. Kontrol grubu plazma lipid YPİT dansitogramı



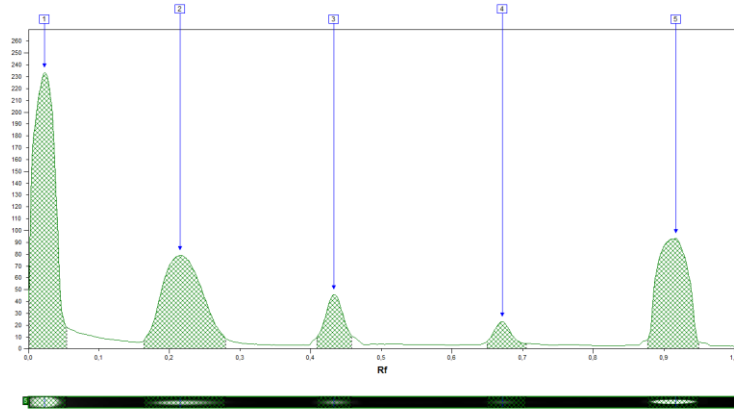
Şekil 4.11. 0.1 mg/kg dekzametazon grubu plazma lipid YPİT dansitogramı



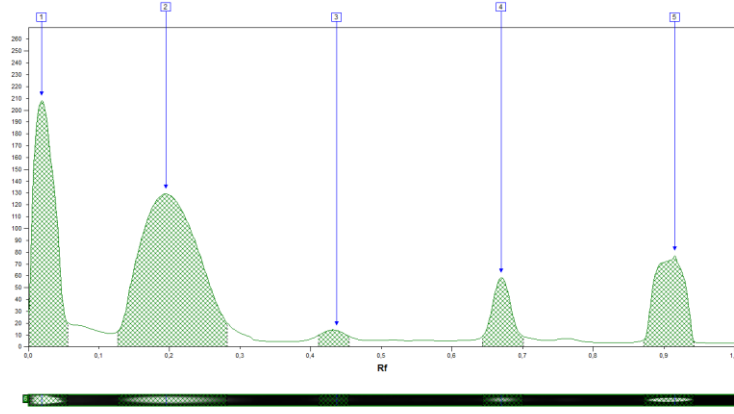
Şekil 4.12. 0.5 mg/kg dekzametazon grubu plazma lipid YPİT dansitogramı



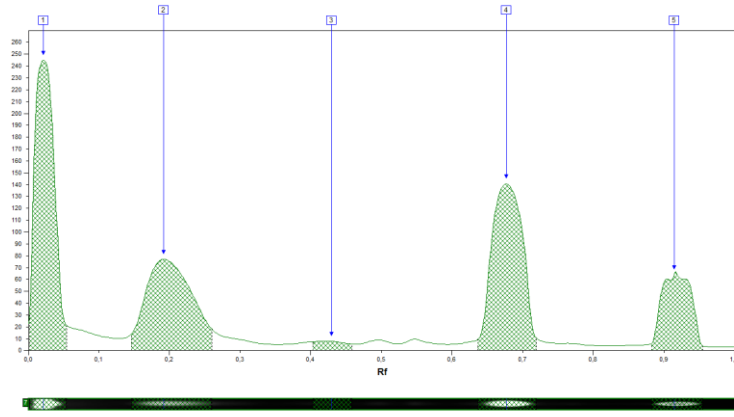
Şekil 4.13. 1 mg/kg dekzametazon grubu plazma lipid YPİT dansitogramı



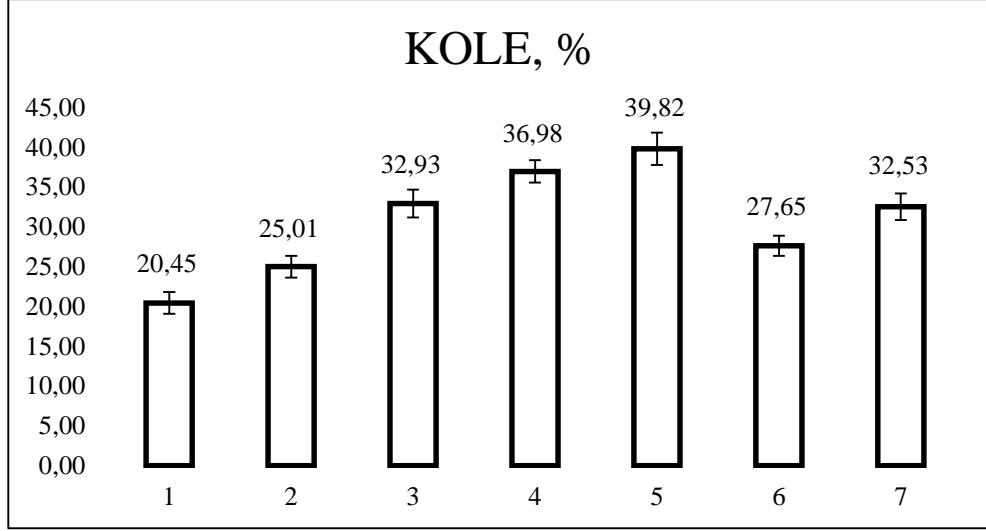
Şekil 4.14. 2 mg/kg dekzametazon grubu plazma lipid YPİT dansitogramı



Şekil 4.15. Hipertrigliseridemi grubu plazma lipid YPİT dansitogramı



Şekil 4.16. Hiperkolesterolemi grubu plazma lipid YPİT dansitogramı

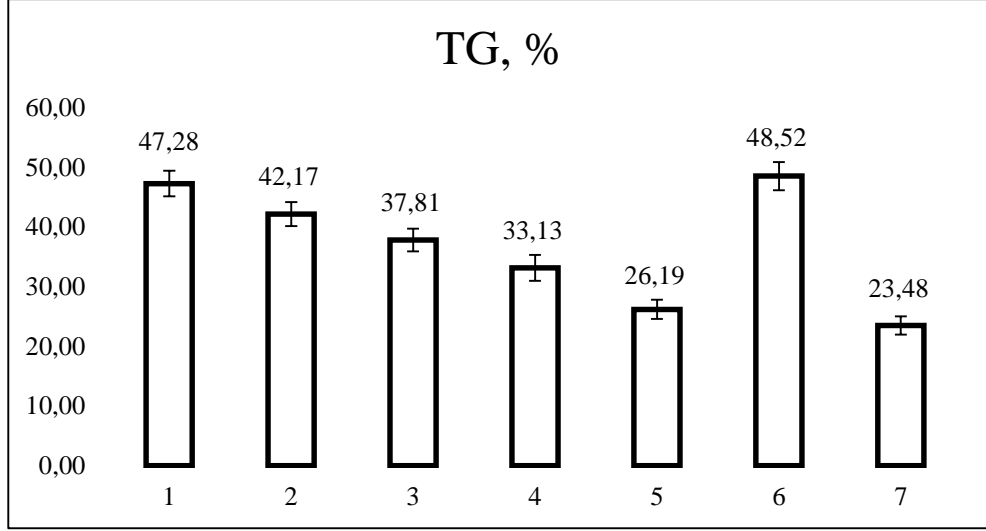


Şekil 4.17. Plazma toplam yağı içerisindeki KOLE oranının deneme gruplarına göre değişimi

Plazma toplam yağı içerisindeki KOLE oranının en fazla 2 mg/kg deksametazon verilen grupta, en az ise kontrol grubunda olduğu tespit edildi (Şekil 4.32).

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan deksametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma KOLE oranının giderek arttığı ve deneme sonunda kontrol grubunun ~2 katına yakın bir değer aldığı ($P<0.001$) görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.32).

Bununla birlikte plazma KOLE oranının plazma SYA oranı, plazma LKAT aktivitesi, KETP ekspresyonu ve lipolizin göstergesi SGLİ konsantrasyonu ile önemli düzeyde pozitif ($P<0.01$), plazma TG oranı ile önemli düzeyde negatif ($P<0.01$) ilişkili olduğu, plazma TKOL düzeyi ile ise bir ilişkisi olmadığı tespit edildi (Tablo 4.2).

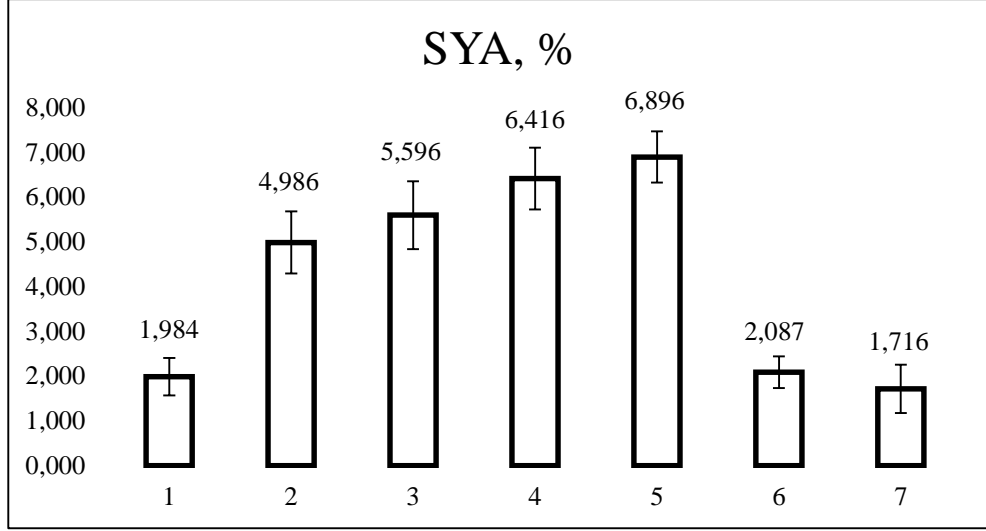


Şekil 4.18. Plazma toplam yağı içerisindeki TG oranının deneme gruplarına göre değişimi.

Plazma toplam yağı içerisindeki TG oranının en fazla hipertrigliseridemi grubunda en az ise hiperkolesterolemi grubunda olduğu tespit edildi (Şekil 4.33).

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma TG oranının giderek azaldığı ve deneme sonunda kontrol grubundan ~%50 daha az bir değer aldığı ($P<0.001$) görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.33).

Bununla birlikte TG oranının plazma SKOL oranı, plazma KETP ekspresyonu ve LKAT aktivitesi ve lipolizin göstergesi SGLİ konsantrasyonu ile önemli düzeyde negatif ($P<0.01$) ilişkili olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).

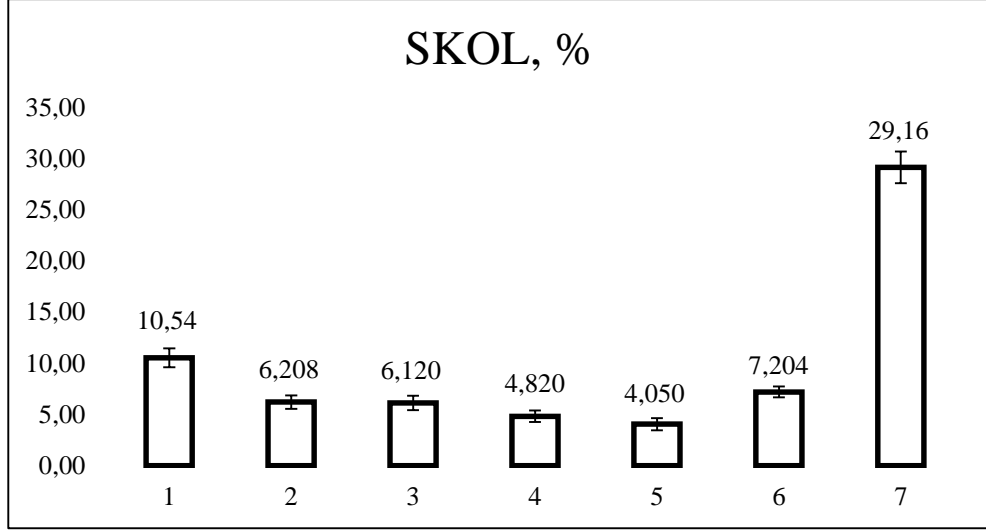


Şekil 4.19. Plazma toplam yağı içerisindeki SYA oranının deneme gruplarına göre değişimi

Plazma toplam yağı içerisindeki SYA oranının en fazla 2 mg/kg dekzametazon verilen grupta en az ise hiperkolesterolemi grubunda olduğu tespit edildi (Şekil 4.34).

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma SYA oranının giderek arttığı ve deneme sonunda kontrol grubunun ~3 katına yakın bir değer aldığı ($P < 0.001$) görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.34).

Bununla birlikte SYA oranının plazma SKOL oranı ile negatif, plazma ÖTG, GTG konsantrasyonları, KETP ekspresyonu, ve lipolizin göstergesi SGLİ konsantrasyonu ile önemli düzeyde pozitif ($P < 0.01$) ilişkili olduğu, LKAT aktivitesi ile bir ilişkisinin olmadığı tespit edildi (Tablo 4.2).

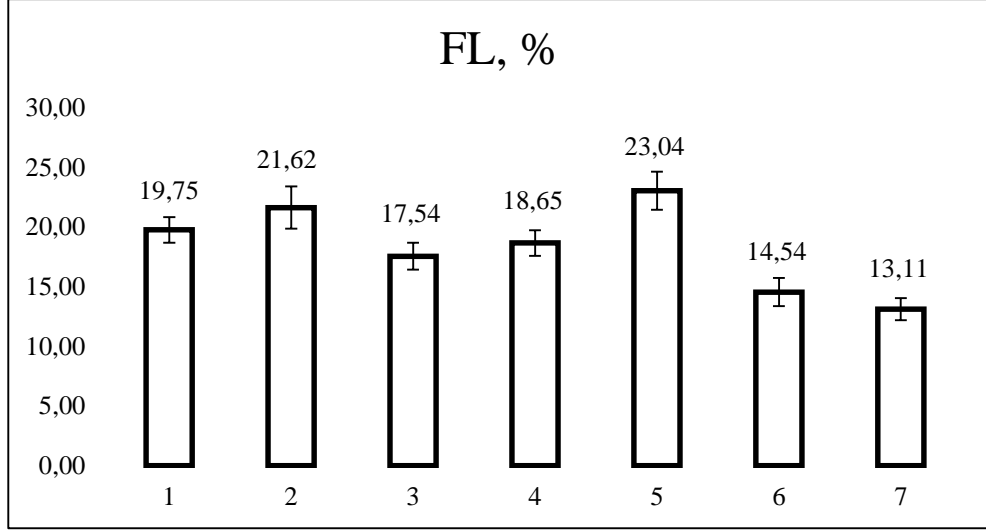


Şekil 4.20. Plazma toplam yağı içerisindeki serbest KOL oranının deneme gruplarına göre değişimi

Plazma toplam yağı içerisindeki SKOL oranının en fazla hiperkolesterolemi grubunda en az ise 2 mg/kg dekzametazon verilen grupta olduğu tespit edildi (Şekil 4.35).

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma SKOL oranının giderek azaldığı ($P < 0.001$) görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.35).

Bununla birlikte plazma SKOL oranının plazma LKAT aktivitesi, plazma GTG, HDL, LDL, TKOL konsantrasyonları ile önemli düzeyde pozitif ($P < 0.01$), ÖTG konsantrasyonu ve KETP ekspresyonu ile orta düzeyde önemli pozitif ($P < 0.05$) ilişkili olduğu, plazma TG ile SYA oranları ve lipolizin göstergesi SGLİ konsantrasyonu ile ise önemli düzeyde negatif ilişkili ($P < 0.01$) olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).



Şekil 4.21. Plazma toplam yağı içerisindeki fosfolipid oranının deneme gruplarına göre değişimi

Plazma toplam yağı içerisindeki FL oranının en fazla 2 mg/kg dekzametazon verilen grupta en az ise hipertkolesterolemi grubunda olduğu tespit edildi (Şekil 4.36).

Karışık hiperlipidemi grubunda uygulanan dekzametazon konsantrasyonuna bağlı olarak plazma FL oranının dalgalı bir seyir izlediği görüldü (Tablo 4.1, Şekil 4.36).

Bununla birlikte plazma FL oranının plazma ÖTG ve GTG konsantrasyonu ile önemli düzeyde pozitif ($P<0.01$), plazma TKOL düzeyi ve SKOL oranı ile ise önemli düzeyde negatif ilişkili ($P<0.01$) olduğu tespit edildi (Tablo 4.2).

5. TARTIŞMA

Dislipidemi terimi, hem hiperlipidemi hem de hipolipidemi dahil olmak üzere lipit profilinin bozulmasına karşılık gelir. Klinik pratikte en sık görülen dislipidemiler hiperlipidemilerdir. Bu dislipidemik durumların çoğu, artmış kardiyovasküler hastalık (KVH) riski ile bağlantılıdır.⁸⁶ KVH nedeni ile Avrupa'da her yıl 4 milyondan fazla kişi hayatını kaybetmektedir. Avrupa'da 2009 yılında KVH ile bağlantılı sağlık maliyetleri 106 milyar euro miktarında olup, birlikteki toplam sağlık harcamalarının %9'una karşılık gelmektedir.⁸⁷

Dislipidemilerde adlandırma oldukça basittir: Hiperkolesteremi yüksek LDL-kolesterol (LDL) seviyelerine bağlı olarak sadece plazma total kolesterolü yükseldiğinde, hipertrigliseridemi sadece plazma TG düzeyi yükseldiğinde, kombine veya karışık hiperlipidemi ise her iki lipid parametresinin plazmada yükseldiğinde kullanılır.⁸⁸

Ailesel kombine hiperlipidemi (AKH), erken başlangıçlı koroner arter hastalığının (KAH) da önemli bir nedeni ve yaygın şekilde (1:100) görülen bir dislipidemi formudur. Yüksek TG, LDL (veya ikisi de aynı anda) düzeyleri AKH'ya neden olmaktadır. Hastalığın fenotipinde aile bireyleri arasında dahi değişiklik gözlemlenmektedir.⁸⁹

Heterozigot Ailesel hiperkolesterolemi (HeAH) PCSK9 genindeki bir fonksiyon kazanımı mutasyonundan ya da LDLR veya apoB genlerindeki fonksiyon kaybı mutasyonlarından ileri gelen monogenik bir hastalıktır; HeAH'nin klinik tanısı hiperkolesterolemi veya LDL düzeyine, hastanın KVH ile ilgili klinik ve erken KVH ile ilgili aile öyküsüne dayanır. Yetişkin bir aile üyesinde plazma total kolesterolü ≥ 310 mg/dL (8 mmol/L) üzerindedir. Bireylerin çoğunda, olguların LDL veya TKOL analiziyle saptanması mümkündür.⁹⁰

Homozigot Ailesel Hiperlipidemi (HoAH) hayatı tehdit edici ve nadir görülen bir hastalıktır. Klinik tablo >500 mg/dL (13 mmol/L) TKOL düzeyi ile birlikte, 20 yaşından önce aort stenozu ve koroner arter hastalığı (KAH) ortaya çıkmakta ve 30 yaşından önce ölüm gerçekleşmektedir. HoAH görülmesinin 1/160.000 –1/300.000 olduğu öngörülmektedir.⁹¹

Çocuklarda Ailesel Hiperlipidemi (ÇAH) tanısı, erken başlangıçlı KAH, yüksek KOL ile ilgili aile öyküsü ve/veya yüksek LDL dahil fenotipik ölçütlere dayalı olarak pozitif genetik test sonuçlarıyla birlikte belirlenmektedir. Testin çocukluk çağında yapılması LDL'ye dayalı olarak AH ile AH dışındaki durumlar arasında ayırım yapmak için optimaldir. Erken yaşta KVH veya yüksek KOL ile ilgili aile geçmişi bulunan çocuklarda eşik değer olarak ≥ 160 mg/dL (4.0 mmol/L) TKOL düzeyi kullanılabilir. Ebeveynlerde daha önceden bilinen bir genetik kusur saptanması halinde tanısal TKOL düzeyi ≥ 130 mg/dL (3.5 mmol/L) olmalıdır.⁹²

Ailevi disbetalipoproteinemi (kalıntı uzaklaştırma hastalığı; tip III hiperlipoproteinemi) sıklıkla otozom çekinik kalıtım gösteren ve az görülen bir hastalıktır. Şilomikron kalıntılarının ve IDL'nin karaciğerden temizlenmesi için ApoE oldukça önemlidir. ApoE2'nin karaciğere E3 veya E4 izoformlarından bağlanması zordur. Yine de, aynı anda bir dislipidemiye bir neden yoksa genellikle apoE2 homozigotluğu ailesel disbetalipoproteinemiye neden olmamaktadır. Ailesel disbetalipoproteinemi TG (620-880 mg/dL (7-10 mmol/L),) ve TKOL (270- 386 mg/dL (7-10 mmol/L)) yüksekliği ile karakterizedir.^{93,94}

VLDL sentezi ve atımını etkileyen fazla sayıda genin poligenik etkisi ile TG düzeyleri (2.0–10.0 mmol/L veya 177-880 mg/dL) yükselir. Günümüze kadar kadar, şilomikron katabolizmasının bozulması nedeniyle serum TG düzeyinde ciddi yükselmeye yol açan monogenik etki gösteren altı gendeki (LPL, apoC2, apoA5, LMF1, GPIHBP1

ve GPD1) mutasyonlar belirlenmiştir. Şilomikron ve VLDL katabolizmasında ciddi bir hasar oluşması TG düzeyinin >1000 mg/dL (11.2 mmol/L) kadar çıkmasına ve şiklomikronemiye neden olabilmektedir.^{95, 96}

Dislipidemili hastalara klinik bakımda ilk adım, tanıyı doğru koymaktır. Anca tanı konduktan sonra prognoz, tedavi seçimi veya genetik tarama testi gerekliliği belirlenebilir. Geleneksel olarak biyokimya laboratuvarlarında rutin test olarak lipoproteinlerin yapısındaki TG ile TKOL miktar analizleri yapılmaktadır.

Klinik olarak bildirilen TG konsantrasyonları, birim plazma hacmi başına tüm lipoproteinlerde (ör., mg/dL veya mmol/L) taşınan TG moleküllerini ifade eder ve 2001 yılında Ulusal Kolesterol Eğitim Programı (NCEP) Yetişkin Tedavisi Paneli tarafından serum konsantrasyonlarına göre sınıflandırılmaktadırlar.⁹⁷ III normal olarak <150 mg/dl, sınırda yüksek 150-199 mg/dl, yüksek 200-499 mg/dl ve çok yüksek ≥ 500 mg/dl.⁹⁸ Son zamanlarda Endokrin Derneği bazı kategorileri yeniden tanımlamıştır; normal <150 mg/dl, hafif 150-199 mg/dl, orta 200-999 mg/dl, şiddetli 1000-1999 mg/dl ve çok şiddetli ≥ 2000 mg/dl.⁹⁹

1959'da, Albrink ve Man¹⁰⁰ TG'lerin metabolizmasındaki bir hatanın KVH'da etkisi olan lipid anormalliği olduğunu öne süren ilk kişilerdi. O günden sonra, TG'lerin, dislipidemi ve dislipoproteinemilerdeki klinik önemi oldukça fazla bir şekilde tartışılmış, ancak 262.525 hastayı kapsayan 29 çalışmayı içeren çok büyük bir meta analizi, TG konsantrasyonu ile KVH riski arasında güçlü ve son derece anlamlı ilişkiyi göstermiştir.¹⁰¹ Ek çalışmalar, yaklaşık 175-900 mg/dl TG konsantrasyonlarını daha yüksek KVH riski ile ilişkilendirirken, 900 mg/dLden yüksek seviyeler akut pankreatit ve muhtemelen KVH oluşumu için artmış bir risk olduğunu göstermektedir.¹⁰²

Lipit/lipoproteinler ile ilgili çok sayıdaki profesyonel topluluk, aterosklerotik kardiyovasküler hastalık ve pankreatit riskini değerlendirmek için yüksek TG'li

hastalarda TG ölçümünü¹⁰³ ve tedavi hedefleri olarak HDL dışı veya aterojenik partikül sayısını kullanmayı savunmaktadır.¹⁰⁴⁻¹⁰⁸

TG ölçümü için gerçek bir referans metod veya kesin bir metot yoktur. Kullanılan en yaygın metod enzimatik metottur.¹⁰⁹ Enzimatik yöntemle göre trigliseritler serumdaki SGLİ miktarı olarak ölçülür, bu nedenle ölçüm sonuçlarına mono (MAG) ve digliseritler (DAG) de dahil edilir.⁵⁷ Yine numunedeki SGLİ, enzimatik yöntemlerde hatalı sonuçlara neden olabilir.¹¹⁰ Bu nedenle, gliserol, MAG ve DAG'a bağlı TG miktarında artış, LDL'de yanlış yükselmeye neden olacaktır.¹⁰⁹

Bir çok laboratuvar gliserol körlemeyi kullanmamaktadır. Avrupa Ateroskleroz Derneği Uzlaşma Paneli,⁹³ TG ölçümlerinde gliserol düzeyinin yaratacağı olumsuzluğuna dikkat çekmektedir.^{93, 99, 111} Fakat tablo 1'de de görüldüğü gibi ABD'nin önde gelen laboratuvarlarından sadece bir tanesi, o da trigliserit düzeyi ≥ 400 mg/dl olduğunda gliserol körleme yapmaktadır.⁸⁷

Tablo 5.1. ABD'nin önde gelen gelişmiş laboratuvarlarını ve gliserol körleme kullanımını

Laboratuvar	Yer	Gliserol körleme
Atherotech®	AL,USA	Hayır
Berkeley HeartLab / Görev	CA,USA	Hayır
Cleveland HeartLa™	OH,USA	Talep üzerine
Sağlık Teşhis Laboratuvarı	VA,USA	Evet [†]
LipoScience	NC,USA	Talep üzerine [‡]
Spectracell Laboratuvarları	TX,USA	Hayır
Mayo Tıp Laboratuvarları	MN,USA	Talep üzerine

[†]Refleks testi: trigliserit düzeyi ≥ 400 mg/dl olduğunda gliserol körleme rutin olarak yapılmaktadır.

[‡]Nükleer manyetik rezonans ile gerçekleştirilir.¹⁰⁹

Gliserol körleme düşük maliyetlidir, çünkü sadece tek bir reaksiyon hücresi gerektirir, ancak reaksiyon süresi arttırılır, bu da verimi etkileyebilir.¹⁰⁹ Ayrıca enzimatik yöntemle trigliserit ölçümleri için kan örnekleri, numunede TG konsantrasyonunu arttırabilecek şilomikronlardan kaçınmak için en az dokuz saat aç kaldıktan sonra

alınmalıdır. Friedewald denkleminde trigliseritlerin çoğunun VLDL fraksiyonunda olduğu varsayılır, bu nedenle prandiyal şilomikronlar bol olduğunda bu denklemin kullanılmaması gerekir.⁷²

Yapılan literatür çalışmasında plazma SGLİ düzeyinin artmasına ve klinik önemine yönelik birbirlerinden oldukça farklı mekanizmalar öne sürülmüştür. Bu mekanizmalardan ilki hücrelerdeki gliserol kinaz eksikliğinin pseudohipertrigliseridemi teşhisine neden olmasıdır.¹¹²⁻¹¹⁶ TG'ler, yağ asidinin gliserole esterleştirildiği büyük, karmaşık moleküllerdir. Benzer şekilde, fosfolipidler gliserole esterleştirilmiş iki yağ asidine sahiptir. Gliserol, TG veya FL sentezi için kullanılmazsa, glukoneogenez veya glikoliz yollarına girer. Bu işlem, gliserol, gliserol kinaz enzimi yoluyla gliserol-3-fosfata dönüştürüldüğünde meydana gelir. Kullanılmayan gliserol plazma serbest gliserol düzeyinin artmasına neden olarak pseudohipertrigliseridemiye neden olmaktadır.¹¹²

Diğer bir mekanizma ise, bizim çalışmamızdaki mekanizmaya benzer bir açlık durumu yaratan “Fruktoz-1,6-fosfataz” enzim yetersizliğidir. Fruktoz 1-fosfataz, fruktoz-1,6-bisfosfatın fruktoz-6-fosfata ve inorganik fosfata hidrolizine neden olan ve glukoneogenezin düzenlenmesinde rol oynayan temel enzimdir. Bu enzim, karaciğer ve böbrekte maksimum aktiviteye sahiptir ve aynı zamanda dokulardan eksprese edilebilir.¹¹⁷ FBP1 geni içindeki mutasyonlardan kaynaklanan glukoneogenetik fruktoz-1,6-bifosfataz (FBP) enzim eksikliği, uzun süreli açlık, kusma gibi katabolik koşulların neden olduğu tekrarlayan hipoglisemi, ketoz ve laktik asidoz atakları ile karakterizedir, ve glikoz infüzyonlarına hızlı yanıt verir.¹¹⁸ Bu enzimin akut metabolik dekompanzasyon fazı sırasında geçici psödohipertrigliseridemi tespit edilmiştir.¹¹⁹

Farklı bir yaklaşım olarak fazla oral gliserol alımı pseudotrigliserideminin bir başka sebebi olarak gösterilmektedir. TG'lerin laboratuvar değerlendirmesi, gliserol ve yağ asidine enzimatik degradasyonuna dayanır. Daha sonra bir seri enzimatik reaksiyonla

gliserol miktar analizi yapılmaktadır. Fakat bu durumda gliserol seviyelerindeki herhangi bir değişiklik TG sonucunu değiştirmektedir. Oral gliserol alımı, kan gliserol düzeylerini artırarak TG düzeyinin yükselmesine benzer bir sonuç üretebilir.¹²⁰ Bu durum alkol replasman tedavisi için gliserol alan hastada ortaya çıkmıştır. Bu bayan aynı zamanda sağlıklı bir cilt için de gliserol almaktaymış. Yine glokom tedavisi için oral gliserol kullanan hastada da pseudohipertrigliseridemi tespit edilmiştir.¹²¹

Potansiyel hipergliseroleminin diğer yerleşik nedenleri arasında gliserol içeren intravenöz ilaçlar, propofol, gliserin fitilleri ve periton diyaliz solüsyonları, heparin infüzyonları yer alır.¹²¹⁻¹²⁸ Yine numunelerin pre-analitik dönemde fazla bekletilmesi, serum gliserol, monodigliseritler ve digliseritlerde de artışa neden olabilir.¹²⁶

Ancak en kesin yorumlardan biri olan Mayo klinik tarafından yapılmış ve web sitesindeki bu yoruma göre “ tip 2 diabetes mellitus, hipertiroidizm, obez olanlar veya gliserol ile oral veya parenteral destek alan hastaların dolaşımında biraz daha yüksek serbest gliserole sahip olabildiği, ancak bu artışın trigliserit sonuç yorumlamasını etkilemesi muhtemel olmadığı” öne sürülmektedir.¹²⁹ Fakat ticari kit üreticisi bir firmanın hali hazırdaki serum trigliserid ölçüm kitinde “True Serum Triglyceride Concentration” metodu vardır.¹³⁰ Son bir not olarak bir numunede bulunan bazı kimyasallar (askorbik asit ve bilirubin gibi) hidrojen peroksiti tüketebilir ve dolaylı TG ölçümü sırasında hatalar oluşabilir.¹³¹

Sunulan bu çalışmada şiddetli hipertrigliseridemi vakalarında mevcut TG test kitinin hipertrigliseridemiye doğru teşhis ettiği (doğru pozitif) görülmüştür ve Mayo klinik yorumlarına paralel olarak plazma SGLİ miktarının yüksek hiperlipidemi teşhisini etkilemediği belirlenmiştir. Ancak, hiperlipidemi tanısında önemli ve/veya kritik düzey olan 200 mg/dL eşik değer (AdTP II Seviyelerine göre) hemen altındaki TG düzeyini pseudotrigliseridemi (yanlış pozitif) teşhisine sebep olabilecek kadar yükseltebildiğini

göstermiştir. Bu durum özellikle Avrupa Ateroskleroz Derneği Uzlaşma Paneli tarafından da önemle belirttiği "TG ölçümlerinde gliserol düzeyinin yarattığı olumsuz bir durum"un ta kendisi olmuştur. Diğer yandan bu tezde dekzametazon enjeksiyonuyla (strese bağlı) oluşturulan lipolitik durumun "Gliserol Kinaz" ve/veya "Fruktoz-1,6-fosfataz" yetersizliği sonucu oluşan (açlığa bağlı) lipolitik duruma benzer bir pseudohipertrigliseridemiye neden olabildiği tespit edilmiştir.

Elli yıldan daha fazla bir süre boyunca Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC)'nin KOL ölçümleri için referans yöntemi Abell-Kendall kolorimetrik yöntemin bir modifikasyonu olmuştur.¹³² Bu yöntemde ilk olarak lipoproteinlerin sabunlaştırılmasıyla yapılarındaki KOLE'ler alkollü potasyum hidroksite geçer. Daha sonra hekzan ekstraksiyonu yapılarak ekstraktta kolorimetrik ölçüm için Liebermann-Burchard reaktifi kullanılarak kromofor oluşturulur.¹³³ Liebermann ve Burchard¹³⁴ 1890'lerde, safra taşlarındaki KOL ile karakteristik bir renk veren sülfürik asit, asetik asit ile asetik anhidrit karışımını keşfetmiştir. Ne yazık ki, güçlü asitlerin kullanıldığı kolorimetrik yöntemler kolayca standartlaştırılmamakta ve otomatik klinik kimya analizörleri için uygun olmamaktadır. Bununla birlikte, doksan yıl boyunca KOL ölçümleri klinik laboratuvarlardaki bu tehlikeli metoda dayanmaktaydı.¹³⁵

Serum kolesterolünün analizindeki bir sonraki aşama, 1970'lerin başlarında, spesifik enzimatik reaktiflerin keşfedilmesi olmuştur.^{133, 135} Normalde KOL serumda SKOL ve/veya KOLE biçimde ve farklı lipoprotein fraksiyonları arasında dağıtılmıştır. Bu nedenle, analiz için gerekli SKOL'ü elde etmek için öncelikle KOLE'ler kolesterol esteraz enzimi tarafından SKOL'e hidrolize edilmelidir. Bir sonraki aşamada, SKOL kolestenona oksitlenir ve hidrojen peroksit açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan bu hidrojen peroksit daha sonra bir reaksiyonda renkli bir bileşik oluşturmakta, bu renkli bileşik ise 540 nm dalga boyunda ölçülerek TKOL analizi yapılmaktadır.^{45-47, 133, 135}

Kolesterol ölçümü ile ilgili ilk endişeler metodoloji ile ilgili olup 1950'lerde ortaya çıkmış ve bu sebepten dolayı CDC 1950'lerin sonunda bir kolesterol metodoloji geliştirme laboratuvarı ve standardizasyon ofisi kurmuştur.¹³⁵ O zamandan beri CDC, laboratuvarlar ve reaktif üreticileri için bir “Lipid Standardizasyon Programı” belirlemiş ve Kolesterol Referans Yöntemi Laboratuvar Ağı (Cholesterol Reference Method Laboratory Network (CRMLN)), CDC tarafından standartlaştırılan Abell-Kendall KOL referans yöntemini kullanmaya devam etmiştir. Rutin analiz için birçok laboratuvar, enzimatik ölçüm temelli ticari KOL kantitatif ölçüm test kitleri ile çalışan portatif test cihazlarını (POCT) ve otomatik analizörleri kullanmaktadır.^{136, 137} Enzimatik tahlillerin KOL tayini için kesinlikle seçici olmayabileceği belirtilmelidir çünkü, kolesterol oksidaz diğer sterollerle de reaksiyona girebilir.¹³⁸ Yine TG ölçümünde olduğu gibi, bir numunede bulunan bazı kimyasallar (askorbik asit ve bilirubin gibi) hidrojen peroksiti tüketebilir ve dolaylı KOL ölçümü sırasında hatalar oluşabilir.¹³¹ Son zamanlarda ise mevcut referans yönteminin yerine yeni bir gaz kromatografisi-izotop seyreltme kütle spektrometrisi (GC-IDMS) prosedürü önerilmiş fakat henüz bir geçerlilik kazanmamıştır.¹³⁹

Kolesterol miktarı ile ilgili yapılan çalışmalarda Boyd'un sonuçları, gün veya gece boyunca normal rutinlerini takip eden kişilerde KOL fraksiyonlarının ortalama konsantrasyonunda kayda değer bir değişiklik göstermeme konusunda kesin sonuç vermektedir.¹²⁰ Yine, sağlıklı yetişkinlerde ve muhtemelen çocuklarda (yenidoğan dönemi hariç), SKOL oranının mevcut toplam miktardaki büyük farklılıklara rağmen dikkat çekici bir şekilde sabit olduğu bildirilmiştir.¹²¹ Birkaç istisna dışında, yenidoğan döneminde sadece hastalıklı bireylerde (özellikle karaciğer enfeksiyonları ve hastalıkları ile) ve bebeklerde önemli farklılıklar gözlenmiştir ve KOLE ve SKOL'ün, normal kolesterol metabolizmasındaki değişiklikleri göstermede serumdaki total miktarlardan

çok daha değerli bir endeks olduğunu öne sürmüşlerdir.¹⁴⁰ Bunun yanında 1917'de Bloor ve Knudson¹⁴¹ normal insan kan plazmasında hiçbir durumda TKOL içerisindeki SKOL oranının önemli bir değişiklik göstermediği, değişen fraksiyonun ise KOLE olduğu ifade etmiştir.⁴⁸

Fakat KOLE ölçümü hiçbir klinik kimya prosedüründe bulunmamakta iken, ticari firmaların hem SKOL'ü hem de TKOL'ü ayrı ayrı ölçerek, TKOL, SKOL, ve KOLE miktarlarının belirlenebildiği ticari kitleri mevcuttur.¹³⁰

Sunulan bu çalışmada şiddetli hiperkolesterolemi vakalarında mevcut TKOL test kitinin hiperkolesterolemiyi doğru teşhis ettiği (doğru pozitif) görülmüş, plazma KOLE oranındaki değişimlerin hiperlipidemi teşhisini etkilemediği belirlenmiştir. Ancak, hiperlipidemi tanısında önemli ve/veya kritik düzey olan 200 mg/dL eşik değerin (AdTP III Seviyelerine göre) hemen altındaki TKOL düzeyini pseudokolesterolemi (yanlış pozitif) teşhisine sebep olabilecek kadar yükseltebildiğini göstermiştir. KOLE düzeyindeki artış sonucu TKOL düzeyinin artması literatürde var olan diğer çalışmalardaki KOLE önemine yönelik bulgularıyla paralel olmuştur.¹⁴⁰⁻¹⁴²

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada dislipidemilerde (hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi ve karışık hiperlipidemi) mevcut testlere ilave olarak “serbest gliserol düzeyi” ile “kolesterol-ester oranının” kesin dislipidemi teşhisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

1. Öncelikle uygulanan deneysel prosedür sonucunda aterojenik diyet + oral kolesterol-deoksikolat kombinasyonunun hiperkolesterolemiye, lipemik diyet + fruktoz kombinasyonunun hipertrigliseridemiye,
2. Dekzametazon enjeksiyonunun ise doza bağlı olarak (1 ve 2 mg dekzametazon enjeksiyonu hiperkolesterolemi, 0,5, 1 ve 2 mg dekzametazon enjeksiyonu hipertrigliseridemi) dislipidemiye neden olduğu görüldü.
3. HKOL grubunda enzimatik TKOL ölçüm kitinin hiperkolesterolemiyi doğru pozitif tespit ettiği, KOLE oranının dislipidemi tanısını etkileyemediği görüldü
4. HTG grubunda enzimatik TG ölçüm kitinin hipertrigliseridemiye doğru pozitif tespit ettiği, SGLİ miktarının dislipidemi tanısını etkileyemediği görüldü
5. Ancak özellikle eşik değerdeki hiperkolesterolemi (200 mg/dL) yada hipertrigliseridemi (200 mg/dL) durumlarında sırasıyla plazma KOLE'i ile SGLİ'nün yanlış dislipidemi (yanlış pozitif) teşhisine sebep olabilecek düzeyde değişebildiği tespit edildi,
6. Elde edilen veriler ışığında, doğru hiperkolesterolemi tanısı koymak için ise sadece TKOL ölçümü yerine "TKOL, SKOL ve KOLE" ölçümlerinin yapılması, doğru hipertrigliseridemi tanısı koymak için ise "serbest gliserol"ün TAG ölçümünde blank olarak kullanılması gerektiği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6 Baskı. New York, Worth Publishers, 2012: 357-385.
2. Hu YW, Zheng L, Wang Q. Regulation of cholesterol homeostasis by liver X receptors. *Clin Chim Acta*, 2010, 411: 617-625.
3. Vance D, Vance J. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*. 4 Baskı. Amsterdam, Elsevier Science B.V, 2002.
4. Blom T, Somerharju P, Ikonen E. Synthesis and biosynthetic trafficking of membrane lipids. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3: a004713.
5. Grundy SM. *Atlas of Atherosclerosis and Metabolic Syndrome*. 5 Baskı. New York, USA, Springer, 2011.
6. Mahley RW, Innerarity TL, Rall Jr SC, Weisgraber KH. Plasma Lipoproteins: Apolipoprotein Structure and Function. *Journal of Lipid Research*, 1984, 25: 1277-1294.
7. Langlois MR, Blaton VH. Historical milestones in measurement of HDL-cholesterol: impact on clinical and laboratory practice. *Clin Chim Acta*, 2006, 369: 168-178.
8. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular prevention. *European Journal of Internal Medicine*, 2006, 17: 77-80.
9. Movva R, Rader DJ. Laboratory assessment of HDL heterogeneity and function. *Clin Chem*, 2008, 54: 788-800.
10. Chapman MJ. Plasma Lipoprotein Part A: Preparation, Structure, and Molecular Biology. İçinde: Segrest JP, Albers JJ (editörler). *Methods in Enzymology*, Florida, USA, 128 Academic Press INC, 1986.
11. Betteridge ID, Sheperd DJ, Arnold J. *Lipoproteins in Health and Disease*. Baskı. London, Arnold, 1999.

12. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jurgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, 1992, 13: 341-390.
13. Hilbert T, Lifshitz MS. Lipids and Dyslipoproteinemia. İçinde:McPherson RA, Pincus MR (editörler). *Clinical Chemistry Theory, Analysis, and Correlation*, 21 Baskı. China, Saunders, 2007.
14. Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ Res*, 2005, 96: 1221-1232.
15. Bamba V, Rader DJ. Obesity and atherogenic dyslipidemia. *Gastroenterology*, 2007, 132: 2181-2190.
16. Hussain MM. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis*, 2000, 148: 1-15.
17. Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1488: 189-210.
18. Kontush A, Lhomme M, Chapman MJ. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. *J Lipid Res*, 2013, 54: 2950-2963.
19. Wiesner P, Leidl K, Boettcher A, Schmitz G, Liebisch G. Lipid profiling of FPLC-separated lipoprotein fractions by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res*, 2009, 50: 574-585.
20. Brown MS, Kovanen PT, Goldstein JL. Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, 1981, 212: 628-635.
21. Yu XH, Zhang DW, Zheng XL, Tang CK. Cholesterol transport system: An integrated cholesterol transport model involved in atherosclerosis. *Progress in Lipid Research*, 2019, 73: 65-91.

22. Redgrave TG, Zech LA. A kinetic model of chylomicron core lipid metabolism in rats: the effect of a single meal. *J Lipid Res*, 1987, 28: 473-482.
23. Grundy SM. Cholesterol metabolism in man. *West J Med*, 1978, 128: 13-25.
24. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corra U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Hobbs FDR, Lochen ML, Lollgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, van der Worp HB, van Dis I, Verschuren WMM. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *International Journal of Behavioral Medicine*, 2017, 24: 321-419.
25. Goldenstein JL, Brown MS. The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*, 1977, 46: 897-930.
26. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Keennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harper's illustrated biochemistry*. 29 Bask1. New York, Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2012.
27. Winocour PH, Durrington PN, Bhatnagar D, Ishola M, Arrol S, Mackness M. Abnormalities of VLDL, IDL, and LDL characterize insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb*, 1992, 12: 920-928.
28. Chao FF, Blanchette-Mackie EJ, Tertov VV, Skarlatos SI, Chen YJ, Kruth HS. Hydrolysis of cholesteryl ester in low density lipoprotein converts this lipoprotein to a liposome. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267: 4992-4998.
29. Alexander ET, Vedhachalam C, Sankaranarayanan S, de la Llera-Moya M, Rothblat GH, Rader DJ, Phillips MC. Influence of apolipoprotein A-I domain structure on macrophage reverse cholesterol transport in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31: 320-327.

30. Lee-Rueckert M, Escola-Gil JC, Kovanen PT. HDL functionality in reverse cholesterol transport--Challenges in translating data emerging from mouse models to human disease. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861: 566-583.
31. Barter PJ, Brewer HB, Jr., Chapman MJ, Hennekens CH, Rader DJ, Tall AR. Cholesteryl ester transfer protein: a novel target for raising HDL and inhibiting atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23: 160-167.
32. Barter PJ, Hopkins GJ, Calvert GD. Transfers and exchanges of esterified cholesterol between plasma lipoproteins. *Biochemical Journal*, 1982, 208: 1-7.
33. Duong PT, Collins HL, Nickel M, Lund-Katz S, Rothblat GH, Phillips MC. Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I. *J Lipid Res*, 2006, 47: 832-843.
34. Kontush A, Therond P, Zerrad A, Couturier M, Negre-Salvayre A, de Souza JA, Chantepie S, Chapman MJ. Preferential sphingosine-1-phosphate enrichment and sphingomyelin depletion are key features of small dense HDL3 particles: relevance to antiapoptotic and antioxidative activities. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 1843-1849.
35. Shieh HS, Hoard LG, Nordman CE. Crystal structure of anhydrous cholesterol. *Nature*, 1977, 267: 287-289.
36. Li J, Gu D, Lee SSY, Song B, Bandyopadhyay S, Chen S, Konieczny SF, Ratliff TL, Liu X, Xie J, Cheng JX. Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer. *Oncogene*, 2016, 35: 6378-6388.
37. Beermann C, Mobius M, Winterling N, Schmitt JJ, Boehm G. sn-position determination of phospholipid-linked fatty acids derived from erythrocytes by liquid chromatography electrospray ionization ion-trap mass spectrometry. *Lipids*, 2005, 40: 211-218.

38. Mitchell DC, Straume M, Litman BJ. Role of sn-1-saturated,sn-2-polyunsaturated phospholipids in control of membrane receptor conformational equilibrium: effects of cholesterol and acyl chain unsaturation on the metarhodopsin I in equilibrium with metarhodopsin II equilibrium. *Biochemistry*, 1992, 31: 662-670.
39. Expert Panel on Detection, & Treatment of High Blood Cholesterol in Adults.
40. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *American Journal of Cardiology*, 1998, 81: 7B-12B.
41. Assmann G, Schulte H, Funke H, von Eckardstein A. The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *European Heart Journal*, 1998, 19 Suppl M: M8-14.
42. Hulley SB, Rosenman RH, Bawol RD, Brand RJ. Epidemiology as a guide to clinical decisions. The association between triglyceride and coronary heart disease. *N Engl J Med*, 1980, 302: 1383-1389.
43. Patsch W, Patsch JR, Gotto AM, Jr. The hyperlipoproteinemias. *Med Clin North Am*, 1989, 73: 859-893.
44. Jialal I. Laboratory Investigation of Dyslipidemia. *Laboratory Medicine*, 1998, 29: 432-436.
45. Mohanty JG, Jaffe JS, Schulman ES, Raible DG. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *J Immunol Methods*, 1997, 202: 133-141.
46. Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem*, 1997, 253: 162-168.

47. Amundson DM, Zhou M. Fluorometric method for the enzymatic determination of cholesterol. *J Biochem Biophys Methods*, 1999, 38: 43-52.
48. Sperry WM. The relationship between total and free cholesterol in human blood serum. *Journal of Biological Chemistry*, 1930, 114: 125-133.
49. Larsson B, Bjorntorp P, Holm J, Schersten T, Sjostrom L, Smith U. Adipocyte metabolism in endogenous hypertriglyceridemia. *Metabolism-Clinical and Experimental*, 1975, 24: 1375-1389.
50. Arner P, Engfeldt P, Ostman J. Changes in the metabolism of fatty acids in adipose tissue in obese patients with primary hypertriacylglycerolemia. *J Lipid Res*, 1982, 23: 422-427.
51. Reynisdottir S, Eriksson M, Angelin B, Arner P. Impaired activation of adipocyte lipolysis in familial combined hyperlipidemia. *J Clin Invest*, 1995, 95: 2161-2169.
52. Tietz NW. *Fundamentals of Clinical Chemistry*. Baski. Philedelphia, USA, Saunders, 1970: 329.
53. Buccolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clinical Chemistry*, 1973, 19: 476.
54. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem*, 1983, 29: 538-542.
55. Kaplan LA, Pesce AJ. *Clinical Chemistry Theory, Analysis, and Correlation*. Baski. St. Louis, Mosby Co., 1984: 567.
56. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. Estimating Low-Density Lipoprotein Cholesterol by the Friedewald Equation Is Adequate for Classifying Patients on the Basis of Nationally Recommended Cutpoints. *Clinical Chemistry*, 1990, 36: 15-19.

57. Stein EA, Myers GL. National-Cholesterol-Education-Program Recommendations for Triglyceride Measurement - Executive Summary. *Clinical Chemistry*, 1995, 41: 1421-1426.
58. Bamberger CM, Schulte HM, Chrousos GP. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Reviews*, 1996, 17: 245-261.
59. Cato AC, Nestl A, Mink S. Rapid actions of steroid receptors in cellular signaling pathways. *Sci STKE*, 2002, 2002: re9.
60. Macfarlane DP, Forbes S, Walker BR. Glucocorticoids and fatty acid metabolism in humans: fuelling fat redistribution in the metabolic syndrome. *Journal of Endocrinology*, 2008, 197: 189-204.
61. Djurhuus CB, Gravholt CH, Nielsen S, Mengel A, Christiansen JS, Schmitz OE, Moller N. Effects of cortisol on lipolysis and regional interstitial glycerol levels in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 283: E172-177.
62. Divertie GD, Jensen MD, Miles JM. Stimulation of lipolysis in humans by physiological hypercortisolemia. *Diabetes*, 1991, 40: 1228-1232.
63. Severino C, Brizzi P, Solinas A, Secchi G, Maioli M, Tonolo G. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 283: E367-373.
64. Novelli M, Pocai A, Chiellini C, Maffei M, Masiello P. Free fatty acids as mediators of adaptive compensatory responses to insulin resistance in dexamethasone-treated rats. *Diabetes-Metabolism Research and Reviews*, 2008, 24: 155-164.
65. Goodman HM. Permissive effects of hormones on lypolysis. *Endocrinology*, 1970, 86: 1064-1074.

66. Exton JH, Friedmann N, Wong EH, Brineaux JP, Corbin JD, Park CR. Interaction of glucocorticoids with glucagon and epinephrine in the control of gluconeogenesis and glycogenolysis in liver and of lipolysis in adipose tissue. *Journal of Biological Chemistry*, 1972, 247: 3579-3588.
67. Fain JN, Svcow RO, Chernick SS. Effects of glucocorticoids on metabolism of adipose tissue in vitro. *J Biol Chem* 1963, 238: 54-58.
68. Fain JN, Kovacev VP, Scow RO. Effect of growth hormone and dexamethasone on lipolysis and metabolism in isolated fat cells of the rat. *Journal of Biological Chemistry*, 1965, 240: 3522-3529.
69. Slavina BG, Ong JM, Kern PA. Hormonal regulation of hormone-sensitive lipase activity and mRNA levels in isolated rat adipocytes. *J Lipid Res*, 1994, 35: 1535-1541.
70. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)*, 2016, 13: 65.
71. Naito HK, David JA. Laboratory considerations: determination of cholesterol, triglyceride, phospholipid, and other lipids in blood and tissues. *Lab Res Methods Biol Med*, 1984, 10: 1-76.
72. Friedewald TF, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*, 1972, 18: 499-502.
73. Weiland H, Seidel D. A simple specific method for precipitation of low density lipoproteins. *Journal of Lipid Research*, 1983, 24: 904-909.
74. Fossati P, Prencipe L. Serum Triglycerides Determined Colorimetrically with an Enzyme That Produces Hydrogen-Peroxide. *Clinical Chemistry*, 1982, 28: 2077-2080.
75. Kit STD. Catalog Number TR0100. Erişim Tarihi: 12.01.2020.

76. Meattini F, Prencipe L, Bardelli F, Giannini G, Tarli P. The 4-hydroxybenzoate/4-aminophenazone chromogenic system used in the enzymic determination of serum cholesterol. *Clin Chem*, 1978, 24: 2161-2165.
77. Zhong S. Analytic solutions for Stokes' flow with lateral variations in viscosity. *Geophysical Journal International*, 1996, 124: 18-28.
78. Barzilai N, Atzmon G, Schechter C, Schaefer EJ, Cupples AL, Lipton R, Cheng S, Shuldiner AR. Unique lipoprotein phenotype and genotype associated with exceptional longevity. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2003, 290: 2030-2040.
79. Darabi M, Abolfathi AA, Noori M, Kazemi A, Ostadrahimi A, Rahimpour A, Darabi M, Ghatrehsamani K. Cholesteryl Ester Transfer Protein I405V Polymorphism Influences Apolipoprotein A-I Response to a Change in Dietary Fatty Acid Composition. *Hormone and Metabolic Research*, 2009, 41: 554-558.
80. Bruce C, Sharp DS, Tall AR. Relationship of HDL and coronary heart disease to a common amino acid polymorphism in the cholesteryl ester transfer protein in men with and without hypertriglyceridemia. *Journal of Lipid Research*, 1998, 39: 1071-1078.
81. Dobiasova M, Frohlich JJ. Advances in understanding of the role of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in cholesterol transport. *Clin Chim Acta*, 1999, 286: 257-271.
82. Rousset X, Vaisman B, Amar M, Sethi AA, Remaley AT. Lecithin: cholesterol acyltransferase--from biochemistry to role in cardiovascular disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2009, 16: 163-171.
83. Rousset X, Shamburek R, Vaisman B, Amar M, Remaley AT. Lecithin cholesterol acyltransferase: an anti- or pro-atherogenic factor? *Curr Atheroscler Rep*, 2011, 13: 249-256.

84. Hara A, Radin NS. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem*, 1978, 90: 420-426.
85. Kaynar O, Ileriturk M, Hayirli A. Evaluation of Computational Modifications in HPTLC with Gel Analysis Software and Flatbed Scanner for Lipid Separation. *Jpc- Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc*, 2013, 26: 202-208.
86. Castro Cabezas M, Burggraaf B, Klop B. Dyslipidemias in clinical practice. *Clin Chim Acta*, 2018, 487: 117-125.
87. Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corra U, Cosyns B, Deaton C, Graham I, Hall MS, Richard Hobbs FD, Locher ML, Lollgen H, Marques-Vidal P, Perk J, Prescott E, Redon J, Richter DJ, Sattar N, Smulders Y, Tiberi M, Bart van der Worp H, van Dis I, Monique Verschuren WM. 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*, 2016, 69: 939.
88. Kopin L, Lowenstein C. Dyslipidemia. *Annals of Internal Medicine*, 2017, 167: ITC81-ITC96.
89. Veerkamp MJ, de Graaf J, Bredie SJ, Hendriks JC, Demacker PN, Stalenhoef AF. Diagnosis of familial combined hyperlipidemia based on lipid phenotype expression in 32 families: results of a 5-year follow-up study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 274-282.
90. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group
91. Cuchel M, Bruckert E, Ginsberg HN, Raal FJ, Santos RD, Hegele RA, Kuivenhoven JA, Nordestgaard BG, Descamps OS, Steinhagen-Thiessen E, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF, Averna M, Boileau C, Boren J, Catapano AL, Defesche JC, Hovingh GK, Humphries SE, Kovanen PT, Masana L, Pajukanta P, Parhofer KG, Ray KK, Stalenhoef AF, Stroes E, Taskinen MR, Wiegman A, Wiklund O, Chapman MJ,

European Atherosclerosis Society Consensus Panel on Familial H. Homozygous familial hypercholesterolaemia: new insights and guidance for clinicians to improve detection and clinical management. A position paper from the Consensus Panel on Familial Hypercholesterolaemia of the European Atherosclerosis Society. *European Heart Journal*, 2014, 35: 2146-2157.

92. Wiegman A, Gidding SS, Watts GF, Chapman MJ, Ginsberg HN, Cuchel M, Ose L, Averna M, Boileau C, Boren J, Bruckert E, Catapano AL, Defesche JC, Descamps OS, Hegele RA, Hovingh GK, Humphries SE, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Masana L, Nordestgaard BG, Pajukanta P, Parhofer KG, Raal FJ, Ray KK, Santos RD, Stalenhoef AF, Steinhagen-Thiessen E, Stroes ES, Taskinen MR, Tybjaerg-Hansen A, Wiklund O, European Atherosclerosis Society Consensus P. Familial hypercholesterolaemia in children and adolescents: gaining decades of life by optimizing detection and treatment. *European Heart Journal*, 2015, 36: 2425-2437.

93. Hegele RA, Ginsberg HN, Chapman MJ, Nordestgaard BG, Kuivenhoven JA, Averna M, Boren J, Bruckert E, Catapano AL, Descamps OS, Hovingh GK, Humphries SE, Kovanen PT, Masana L, Pajukanta P, Parhofer KG, Raal FJ, Ray KK, Santos RD, Stalenhoef AF, Stroes E, Taskinen MR, Tybjaerg-Hansen A, Watts GF, Wiklund O, European Atherosclerosis Society Consensus P. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, 2: 655-666.

94. Futema M, Shah S, Cooper JA, Li K, Whittall RA, Sharifi M, Goldberg O, Drogari E, Mollaki V, Wiegman A, Defesche J, D'Agostino MN, D'Angelo A, Rubba P, Fortunato G, Walus-Miarka M, Hegele RA, Aderayo Bamimore M, Durst R, Leitersdorf E, Mulder MT, Roeters van Lennep JE, Sijbrands EJ, Whittaker JC, Talmud PJ, Humphries SE. Refinement of variant selection for the LDL cholesterol genetic risk score in the diagnosis

of the polygenic form of clinical familial hypercholesterolemia and replication in samples from 6 countries. *Clin Chem*, 2015, 61: 231-238.

95. Johansen CT, Wang J, Lanktree MB, McIntyre AD, Ban MR, Martins RA, Kennedy BA, Hassell RG, Visser ME, Schwartz SM, Voight BF, Elosua R, Salomaa V, O'Donnell CJ, Dallinga-Thie GM, Anand SS, Yusuf S, Huff MW, Kathiresan S, Cao H, Hegele RA. An increased burden of common and rare lipid-associated risk alleles contributes to the phenotypic spectrum of hypertriglyceridemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31: 1916-1926.

96. Gaudet D, Methot J, Dery S, Brisson D, Essiembre C, Tremblay G, Tremblay K, de Wal J, Twisk J, van den Bulk N, Sier-Ferreira V, van Deventer S. Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther*, 2013, 20: 361-369.

97. Rifai N, Warnick GR, Dominiczak MH. *Handbook of Lipoprotein Testing*. 2 Baski. DC, USA, AACC Press, 2000.

98. National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection E, Treatment of High Blood Cholesterol in A. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, 2002, 106: 3143-3421.

99. Berglund L, Brunzell JD, Goldberg AC, Goldberg IJ, Sacks F, Murad MH, Stalenhoef AF, Endocrine s. Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97: 2969-2989.

100. Albrink MJ, Man EB. Serum triglycerides in coronary artery disease. *AMA Arch Intern Med*, 1959, 103: 4-8.

101. Sarwar N, Danesh J, Eiriksdottir G, Sigurdsson G, Wareham N, Bingham S, Boekholdt SM, Khaw KT, Gudnason V. Triglycerides and the risk of coronary heart disease: 10,158 incident cases among 262,525 participants in 29 Western prospective studies. *Circulation*, 2007, 115: 450-458.
102. Nordestgaard BG, Varbo A. Triglycerides and cardiovascular disease. *Lancet*, 2014, 384: 626-635.
103. American Diabetes A. Standards of medical care in diabetes--2014. *Diabetes Care*, 2014, 37 Suppl 1: S14-80.
104. Brunzell JD, Davidson M, Furberg CD, Goldberg RB, Howard BV, Stein JH, Witztum JL. Lipoprotein management in patients with cardiometabolic risk: consensus conference report from the American Diabetes Association and the American College of Cardiology Foundation. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, 51: 1512-1524.
105. Contois JH, McConnell JP, Sethi AA, Csako G, Devaraj S, Hoefner DM, Warnick GR, Lipoproteins A, Vascular Diseases Division Working Group on Best P. Apolipoprotein B and cardiovascular disease risk: position statement from the AACC Lipoproteins and Vascular Diseases Division Working Group on Best Practices. *Clin Chem*, 2009, 55: 407-419.
106. Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, Graham I, Taskinen MR, Wiklund O, Agewall S, Alegria E, Chapman M, Durrington P, Erdine S, Halcox J, Hobbs R, Kjekshus J, Filardi PP, Riccardi G, Storey RF, Wood D, European Society of C, European Atherosclerosis S. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis*, 2011, 217: 3-46.

107. Davidson MH, Ballantyne CM, Jacobson TA, Bittner VA, Braun LT, Brown AS, Brown WV, Cromwell WC, Goldberg RB, McKenney JM, Remaley AT, Sniderman AD, Toth PP, Tsimikas S, Ziajka PE, Maki KC, Dicklin MR. Clinical utility of inflammatory markers and advanced lipoprotein testing: advice from an expert panel of lipid specialists. *J Clin Lipidol*, 2011, 5: 338-367.
108. Jellinger PS, Smith DA, Mehta AE, Ganda O, Handelsman Y, Rodbard HW, Shepherd MD, Seibel JA, Dyslipidemia ATffMo, Prevention of A. American Association of Clinical Endocrinologists' Guidelines for Management of Dyslipidemia and Prevention of Atherosclerosis. *Endocr Pract*, 2012, 18 Suppl 1: 1-78.
109. Backes JM, Dayspring TD, Hoefner DM, Contois JH, McConnell JP, Moriarty PM. Identifying pseudohypertriglyceridemia in clinical practice. *Clinical Lipidology*, 2014, 9: 625-641.
110. Edwards SH, Stribling SL, Pyatt SD, Kimberly MM. Reference Measurement Procedure for Total Glycerides by Isotope Dilution GC-MS. *Clinical Chemistry*, 2012, 58: 768-776.
111. Miller M, Stone NJ, Ballantyne C, Bittner V, Criqui MH, Ginsberg HN, Goldberg AC, Howard WJ, Jacobson MS, Kris-Etherton PM, Lennie TA, Levi M, Mazzone T, Pennathur S, American Heart Association Clinical Lipidology T, Prevention Committee of the Council on Nutrition PA, Metabolism, Council on Arteriosclerosis T, Vascular B, Council on Cardiovascular N, Council on the Kidney in Cardiovascular D. Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, 2011, 123: 2292-2333.
112. Backes JM, Dayspring T, Mieras T, Moriarty PM. Pseudohypertriglyceridemia: Two cases of probable glycerol kinase deficiency. *Journal of Clinical Lipidology*, 2012, 6: 469-473.

113. Goussault Y, Turpin E, Neel D, Dreux C, Chanu B, Bakir R, Rouffy J. Pseudohypertriglyceridemia Caused by Hyperglycerolemia Due to Congenital Enzyme Deficiency. *Clinica Chimica Acta*, 1982, 123: 269-274.
114. Sanson-Raffin ML, Turpin G, Tzotzas T, Lagarde JP, Goussault Y, Cristini P, de Gennes JL. [Pseudo-hypertriglyceridemia caused by glycerol kinase deficiency]. *Rev Med Interne*, 1989, 10: 453-456.
115. Arrobas-Velilla T, Mondejar-Garcia R, Gomez-Gerique JA, Canizares Diaz I, Cruz Mengibar MC, Orive de Diego A, Fabiani-Romero F. Pseudo-hypertriglyceridaemia or hyperglycerolemia? *Clin Investig Arterioscler*, 2013, 25: 123-126.
116. Walmsley TA, Potter HC, George PM, Florkowski CM. Pseudo-hypertriglyceridaemia: a measurement artefact due to glycerol kinase deficiency. *Postgraduate Medical Journal*, 2008, 84: 552-554.
117. Mancini F, Fiori J, Cavrini V, Andrisano V. Separation and quantitation of fructose-6-phosphate and fructose-1,6-diphosphate by LC-ESI-MS for the evaluation of fructose-1,6-biphosphatase activity. *J Sep Sci*, 2006, 29: 2395-2400.
118. Steinmann B, Santer R. Disorders of fructose metabolism. İçinde: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH (editörler). *Inborn metabolic diseases*, 4 Baskı. Heidelberg, Springer, 2012: 101-112.
119. Afroze B, Yunus Z, Steinmann B, Santer R. Transient pseudo-hypertriglyceridemia: a useful biochemical marker of fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Eur J Pediatr*, 2013, 172: 1249-1253.
120. Rajagopal R, Srinivasan M. Oral Glycerol Ingestion Causes Pseudohypertriglyceridemia. *Am J Med*, 2017, 130: e543-e544.
121. Charoenhirunyings W, Vannasaeng S. Pseudohypertriglyceridemia from oral glycerine. *J Med Assoc Thai*, 2010, 93: 870-872.

122. Jessen RH, Dass CJ, Eckfeldt JH. Do enzymatic analyses of serum triglycerides really need blanking for free glycerol? *Clin Chem*, 1990, 36: 1372-1375.
123. Cole TG. Glycerol blanking in triglyceride assays: is it necessary? *Clin Chem*, 1990, 36: 1267-1268.
124. Bortz WM, Paul P, Haff AC, Holmes WL. Glycerol turnover and oxidation in man. *J Clin Invest*, 1972, 51: 1537-1546.
125. Gaudet D, Arsenault S, Perusse L, Vohl MC, St-Pierre J, Bergeron J, Despres JP, Dewar K, Daly MJ, Hudson T, Rioux JD. Glycerol as a correlate of impaired glucose tolerance: dissection of a complex system by use of a simple genetic trait. *Am J Hum Genet*, 2000, 66: 1558-1568.
126. Hortin GL, Cole TG, Gibson DW, Kessler G. Decreased stability of triglycerides and increased free glycerol in serum from heparin-treated patients. *Clin Chem*, 1988, 34: 1847-1849.
127. Nauck M, Winkler K, Siekmeier R, Marangos N, Richter B, Marz W, Wieland H. Pseudo-pseudohypertriglyceridemia: a case of increased free glycerol without evidence for glycerol kinase deficiency. *Clin Chem*, 1995, 41: 619-620.
128. Maruyama K, Yokoyama A, Matsui T, Mizukami T, Mizukami Y, Sogawa K, Yokosuka O, Nomura F, Yokoyama T. Higher serum free glycerol levels in a group of alcoholics than in controls. *Alcoholism-Clinical and Experimental Research*, 2012, 36: 1820-1826.
129. Laboratories MC. <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/63445>. Erişim Tarihi: 21.05.2020.
130. SIGMA. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/tr0100bul.pdf>. Erişim Tarihi: 15.05.2020.

131. Li LH, Dutkiewicz EP, Huang YC, Zhou HB, Hsu CC. Analytical methods for cholesterol quantification. *Journal of Food and Drug Analysis*, 2019, 27: 375-386.
132. Abell LL, Levy BB, Brodie BB, Kendall FE. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *J Biol Chem* 1952, 195: 357-366.
133. Zak B. Cholesterol Methodologies - Review. *Clinical Chemistry*, 1977, 23: 1201-1214.
134. Liebermann N, Burcham GN. *Chem. Z.*, 1890, 1.
135. Rifai N, Cooper GR, Brown WV, Friedewald W, Havel RJ, Myers GL, Warnick GR. Clinical Chemistry journal has contributed to progress in lipid and lipoprotein testing for fifty years. *Clinical Chemistry*, 2004, 50: 1861-1870.
136. Ferreira CED, Franca CN, Correr CJ, Zucker ML, Andriolo A, Scartezini M. Clinical correlation between a point-of-care testing system and laboratory automation for lipid profile. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 446: 263-266.
137. Owen W, Thatcher M, Crabtree K, Greer R, Strathmann F, Straseski J, Genzen J. Body Fluid Matrix Evaluation on a Roche cobas 8000 System. *American Journal of Clinical Pathology*, 2015, 144: A70-A70.
138. MacLachlan J, Wotherspoon ATL, Ansell RO, Brooks CJW. Cholesterol oxidase: sources, physical properties and analytical applications. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2000, 72: 169-195.
139. Edwards SH, Kimberly MM, Pyatt SD, Stribling SL, Dobbin KD, Myers GL. Proposed Serum Cholesterol Reference Measurement Procedure by Gas Chromatography-Isotope Dilution Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 2011, 57: 614-622.

140. Sperry WM. Cholesterol of the Blood Plasma in the Neonatal Period. *Am. J. Dis. Child.*, 1936, 51.
141. Bloor WR, Knudson A. Cholesterol and cholesterol esters in human blood. *J. Biol. Chrm.*, 1917, 29: 7-13.
142. Boyd EM. Diurnal variations in plasma lipids. *Journal of Biological Chemistry*, 1935, 110.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı:	Annour Adoum BATİL
Doğum tarihi:	03 Nisan1988
Doğum Yeri:	Wadi-Fira /ÇAD
Medeni Hali:	Evli
Uyruğu:	ÇAD
Adres:	Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Tel:	0536 646 40 87
Faks:	-
E-mail:	batilfils11@gmail.com / batilfils11@yahoo.fr
Eğitim	
Lise:	Biltine lisesi/ ÇAD (2005)
Lisans:	Ibni khaldoun Üniversitesi, Kazım Karabekir veteriner Fakültesi, Tiaret-Cezayir (2011)
Yüksek lisans:	-
Doktora:	Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veterinerlik Biyokimyası Anabilim Dalı
Yabancı Dil Bilgisi	
Fransızca:	İleri
Türkçe:	Orta
Arabça:	Orta
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
-	
İlgi Alanları ve Hobiler	
Kayak, Masa tenisi, Doğa ve kültürel geziler	

EK-2.ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

Veterinerlik Biyokimyası ana bilim dalında Doktora Tezi olarak *Prof. Dr. Özgür KAYNAR* danışmanlığında sunulan "Dislipidemi Oluşturulan Erkek Ratlarda Teşhis Amaçlı Serbest Gliserol ile Kolesterol Ester Kullanımının İncelenmesi" başlıklı çalışmanın tarafımızdan bilimsel etik ilkelere uyularak yazıldığını, yararlanılan eserlerin kaynakçada gösterildiğini, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre yazıldığını, Sağlık Bilimleri Enstitüsü tarafından belirlenmiş olan Turnitin Programı benzerlik oranlarının aşılmadığını ve aşağıdaki oranlarda olduğunu beyan ederiz.

Tez Bölümleri	Tezin Benzerlik Oranı (%)	Maksimum Oran (%)
Giriş	0	15
Genel Bilgiler	9	30
Materyal ve Metod	25	35
Bulgular	8	10
Tartışma	7	15

Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi halde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz. 09/ 07/ 2020

Annour ADOUM BATIL

Prof. Dr. Özgür KAYNAR

* Tez ile ilgili YÖKTEZ'de yayınlamasına ilişkin bir engelleme var ise aşağıdaki alanı doldurunuz.

Tezle ilgili patent başvurusu yapılması / patent alma sürecinin devam etmesi sebebiyle Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 2 (iki) yıl süreyle engellenmiştir.

Enstitü Yönetim Kurulunun .../.../... tarih ve sayılı kararı ile teze erişim 6 (altı) ay süreyle engellenmiştir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1800335829
Konu : HADYEK Kararı.

22.11.2018

VETERİNER FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 21.11.2018 tarihli ve 36643897-000-E.1800334439 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 22.11.2018 tarih ve 12 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 219 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Üniversitemiz Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: <http://www.atauni.edu.tr/#/birim=veteriner-fakultesi>

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: veffak@atauni.edu.tr

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr



1 / 2

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
<https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=04D74E5>

TOPLANTI TARİHİ : 22.11.2018

TOPLANTI SAYISI : 12

KARAR N0 219: Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanlığı, Veteriner Hekimliği Temel Bilimleri Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Özgür KAYNAR'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan **“Dislipidemilerde Teşhis Amaçlı Serbest Gliserol İle Kolesterol Ester Kullanımının İncelenmesi”** isimli doktora tez çalışması ile ilgili Veteriner Fakültesi Dekanlığının 21.11.2018 tarih ve 36643897-000-E.1800334439 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen doktora tez çalışmasının yürütülmesinin, etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.



EK-4. TEZ ADI DEĞİŞİKLİK BİLDİRİM FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

TEZ ADI DEĞİŞİKLİĞİ BİLDİRİM FORMU

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Annour ADOUM BATIL
Ana Bilim Dalı	Veterinerlik Biyokimyası
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Veterinerlik Biyokimyası Ana Bilim Dalı Başkanlığına

Danışmanlığımı yürüttüğüm ve yukarıda bilgileri yazılı olan bilim dalmız öğrencisinin Tez adı aşağıda belirtilen şekilde değiştirilmiştir. Bilgilerinize arz ederim. 24.06.2020

Prof. Dr. Özgür KAYNAR

Ö. Kaynar

Değişiklik Türü	Tez Adı Değişikliği <input checked="" type="checkbox"/>
Tezin Eski Adı	Dislipidemilerde Teşhis Amaçlı Serbest Gliserol ile Kolesterol Ester Kullanımının İncelenmesi
Tezin Yeni Adı	Dislipidemi Oluşturulan Erkek Ratlarda Teşhis Amaçlı Serbest Gliserol ile Kolesterol Ester Kullanımının İncelenmesi
Tezin İngilizce Adı	Investigation of Diagnostic Use of Free Glycerol and Cholesterol Ester in Dyslipidemia Induced Male Rats
Değişikliğin Gerekçesi	Tez başlığı tezin içeriğini tam olarak karşılamamaktadır.

Tez Savunma Jüri Üyeleri			İmza
1	Prof. Dr. Özgür KAYNAR	Atatürk Üniversitesi, Veterinerlik Biyokimyası	<i>Ö. Kaynar</i>
2	Prof. Dr. Fatih Mehmet KANDEMİR	Atatürk Üniversitesi, Veterinerlik Biyokimyası	<i>Fatih Mehmet</i>
3	Prof. Dr. Ayşegül ÇEBİ	Giresun Üniversitesi, Ebelik	<i>Ayşegül ÇEBİ</i>
4	Prof. Dr. Gülay ÇİFTÇİ	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veterinerlik Biyokimyası	<i>Gülay ÇİFTÇİ</i>
5	Doç. Dr. Seçkin ÖZKANLAR	Atatürk Üniversitesi, Veterinerlik Biyokimyası	<i>Seçkin ÖZKANLAR</i>

OF29_V1_08.01.2020