

T. C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERLİPİDEMİLİ HASTALARDA LDL ALT
GRUPLARI DAĞILIMININ BELİRLENMESİ**

EBRU TAYLAN

BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2009

T. C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİPERLİPİDEMİLİ HASTALARDA LDL ALT GRUPLARI DAĞILIMININ BELİRLENMESİ

BİYOKİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU TAYLAN

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Pınar TUNCEL

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2007.KB.SAG.039 sayı ile desteklenmiştir.)

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ.....	i
TABLO LİSTESİ.....	i
GRAFİK LİSTESİ.....	i
KISALTMALAR.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	2
<u>1. GİRİŞ VE AMAÇ</u>	3
<u>2. GENEL BİLGİLER</u>	5
2.1. Ateroskleroz	5
2.2. LDL Yapı ve Metabolizması	8
2.3. LDL Alt Grupları ve Aterojenik Özellikleri	9
2.3.1. LDL Alt Gruplarının Oluşumu.....	11
2.3.2. LDL Katabolizması ve Plazmadan Temizlenmesi.....	12
2.3.3. LDL Partikül Boyutunun Regulasyonu.....	13
2.3.3.1. Metabolik Regülasyon.....	13
2.3.3.2. Genetik ve Çevresel Etkiler ile Regülasyon.....	14
2.3.4. LDL Partikül Boyutu ve Plazma Trigliseridleri.....	15
2.4. LDL Alt Gruplarının Klinik Önemi	15
2.5. LDL Alt Grupları Belirlemede Kullanılan Analitik Yöntemler	16
2.5.1. Denature Olmayan Koşullarda Gradient Jel Elektforezi.....	18
2.5.2. Heparin-Magnezyum İle Çöktürme Yöntemi.....	18
<u>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER</u>	20
3.1. Materyaller	20
3.2. Olgu Seçimi ve Materyal Eldesi	21
3.2.1. Olgu Seçimi.....	21
3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması.....	22
3.3. Yöntemler	22

3.3.1. LDL Alt Gruplarının Belirlenmesi.....	22
3.3.1.1. Denature Olmayan Koşullarda Gradient Jel Elektroforezi.....	22
3.3.1.1.1. Elektroforez İşlemleri.....	23
3.3.1.1.2. Jellerin Boyanması.....	26
3.3.1.1.3. Dansitometrik Analiz.....	26
3.3.1.2. Çöktürme Yöntemi ve LDL-K Düzeyinin Belirlenmesi.....	27
3.3.2. Rutin Biyokimyasal Analizler.....	27
3.3.2.1. Trigliserid Ölçüm Yöntemi.....	27
3.3.2.2. Kolesterol Ölçüm Yöntemi.....	28
3.3.2.3. LDL-K Ölçüm Yöntemi.....	28
3.4. İstatistiksel Analiz.....	28
<u>4. BULGULAR.....</u>	30
<u>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u>	41
<u>6. KAYNAKLAR VE EKLER.....</u>	48

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1: Aterojenik lipoprotein fenotipi	3
Şekil 2: Normal arter görünümü	6
Şekil 3: Aterosklerozda gerçekleşen olaylar	7
Şekil 4: LDL alt gruplarının oluşum mekanizmaları	12
Şekil 5: kyLDL oluşumunun şematik gösterimi.	14
Şekil 6: Pore gradient lipoprotein elektroforez sistemi	23
Şekil 7: Alamo gradient jellerin ve aplikatörün tanka yerleştirilmesi	26
Şekil 8: Protein ve lipid boylarıyla boyama sonucu jelin görüntüsü	30
Şekil 9: Dansitometrik analiz yapılışı.	31
Şekil 10: HMW market kit ve Lateks partiküllerinin dansitometrik analiz sonucu görüntüsü	32
Şekil 11: FITC'ye bağlı silikanın fluorimetrik görüntüsü.	33
Şekil 12: Standartların kalibrasyon eğrisi	33
Şekil 13: Korelasyon analizi	40

TABLO DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1: Apo B içeren lipoprotein alt gruplarının fizikokimyasal özellikleri.	9
Tablo 2: LDL alt gruplarını belirlemede kullanılan yöntemler	17
Tablo 3: Çalışmada kullanılan materyaller ve kullanım amaçları	20
Tablo 4: Sonuçların gruplara göre dağılımı	34
Tablo 5: Deney gruplarındaki LDL alt gruplarının dağılımı	35
Tablo 6: Grupların paternlerine göre lipid panellerinin dağılımı	37
Tablo 7: LDL alt grupları arasındaki ortalama değerlerin karşılaştırılması	38

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1: Lipid panelinin gruplara göre dağılımının karşılaştırılması	34
Grafik 2: Deney gruplarındaki LDL alt gruplarının dağılımının karşılaştırılması	36
Grafik 3: Gruplar arası B paternlerinin karşılaştırılması	37
Grafik 4: Patern A ve B gruplarının karşılaştırılması	39

KISALTMALAR

ALP	: Aterojenik lipoprotein fenotipi
AMI	: Akut miyokard infarktüsü
Apo	: Apolipoprotein
bhLDL	: Büyük hafif LDL
bhLDL-K	: Büyük hafif LDL kolesterol
CETP	: Kolesterol ester transfer protein
DKH	: Düz kas hücreleri
DM	: Diabetes Mellitus
EK	: Kolesterol esterleri
FL	: Fosfolipid
GGE	: Gradient jel elektroforezi
Glc	: Glukoz
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
HDL-K	: HDL kolesterol
HL	: Hepatik lipaz
IDL	: Ara yoğunluktaki lipoprotein
IDL-1	: Büyük IDL
KAH	: Koroner arter hastalığı
KC	: Karaciğer
KH	: Karbohidrat
KKH	: Koroner kalp hastalığı
KVH	: Kardiyovasküler hastalıklar
kyLDL	: Küçük yoğun LDL
kyLDL-K	: Küçük yoğun LDL kolesterol
LDL	: Düşük dansiteli lipoproteinler
LDL-K	: LDL kolesterol
LDL-R	: LDL reseptör
Lp	: Lipoprotein
LPL	: Lipoprotein lipaz
NCEP	: National Cholesterol Education Program
NMR	: Nükleer magnetik rezonans

oksLDL	: Okside LDL
R _f	: migrasyon uzaklığı
S _f	: Svedberg flotasyon hızı
SK	: Serbest kolesterol
SR-A	: Serum amiloid A
TG	: Trigliserid
TK	: Total kolesterol
VLDL	: Çok düşük dansiteli lipoprotein
VLDL-1	: Büyük VLDL
VLDL-2	: Küçük VLDL

TEŞEKKÜR

Tezimin planlanması ve çalışmalarım süresince bilimsel açıdan yardımcı olan ve kolaylık sağlayan değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Pınar TUNCEL'e;

Çalışmalarım sırasında hoşgörü ve manevi desteklerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Banu ÖNVURAL ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN'a;

Olguların toplanması ve analizi sırasında her türlü yardımı ve kolaylığı sağlayan DEU Merkez Laboratuvarı tüm çalışanlarına;

Biyokimya Yüksek Lisans eğitimim süresince, manevi desteklerini ve güler yüzlerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri ve anabilim dalı sekreterimiz Sayın Eda OLUM'e;

Ön denemelerim sırasında deneyimlerinden yararlandığım Ar.Gör. Taylan DEMİRCİ'ye;

Eğitimim boyunca arkadaşlık ve dostluklarını esirgemeyen tüm doktora ve yüksek lisans öğrencilerine;

Beni bugünlere getiren ve daima manevi desteklerini hissettiğim sevgili aileme, gece yarılara dek süren deneylerimde bana eşlik eden, tezimin her aşamasında anlayışla yanımda olan sevgili eşim Sayın Arda TAYLAN'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Ebru TAYLAN

İzmir, 2009

ÖZET

HİPERLİPİDEMİLİ HASTALARDA LDL ALT GRUPLARI DAĞILIMININ BELİRLENMESİ

Ebru TAYLAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü 35340 Balçova-İZMİR

Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) koroner arter hastalığı için temel risk faktörü olarak gösterilmektedir. LDL partiküllerinin boyut, yoğunluk ve kimyasal bileşimine bağlı olarak farklı alt grupları tanımlanmıştır. B paternine sahip kişilerde yüksek trigliserid ve düşük yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) kolesterol bulunma eğilimi yüksektir. Küçük yoğun LDL (kyLDL), artmış koroner hastalık riski ile ilişkilidir.

Bu çalışmada, hipertrigliseridemi, hiperkolesterolemi ve kombine hiperlipidemili hastalarda LDL alt gruplarının dağılımını araştırdık. LDL alt gruplarının belirlenmesinde gradient jel elektroforezi ve heparin-magnezyum reaktifi ile basit çöktürme yöntemlerini kullandık.

Jellerin dansitometrik analizi sonrası, partikül çapı 25.5 nm'den küçük olan partiküller kyLDL, büyük olanlar büyük hafif LDL (bhLDL) olarak kabul edildi. Lipid paneli ile LDL alt grupları arasında $P<0.02$ anlamlılık düzeyinde ilişki bulundu. kyLDL yüzdesi tüm hiperlipidemik gruplarda kontrol grubuna göre daha yüksek ve kyLDL oranı en çok hipertrigliseridemik olan hastalarda saptandı.

Anahtar sözcükler: hiperlipidemi, ateroskleroz, küçük yoğun LDL.

SUMMARY

DETERMINATION OF THE DISTRIBUTION OF LDL SUBGROUPS IN PATIENTS WITH HYPERLIPIDEMIA

Ebru TAYLAN

Dokuz Eylul University Health Sciences Institute 35340 Balçova İzmir

Low-density lipoproteins (LDL) have been shown to be a major risk factor for coronary artery disease. Multiple distinct subspecies have been identified among LDL particles on the basis of differences in size, density, and chemical composition. Subjects with pattern B tend to have higher TG and lower levels of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C). Small dense LDL (sdLDL) is associated with increased risk of coronary disease.

In this study, we have researched the distribution of LDL subgroups in subjects with hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia and combined hyperlipidemia. We used the gradient gel electrophoresis and basic precipitation method with heparin-magnesium reagent to determine the LDL subgroups.

After the densitometric analysis of the gels, the particle diameters which are smaller than 25.5 nm are accepted as small dense LDL and, larger than 25.5 nm are accepted as large buoyant LDL (lbLDL). It's found that there is significantly ($P<0.02$) an association between the lipid panel and LDL subgroups. The percentage of sdLDL in all hyperlipidemic groups are higher than control groups; and the ratio of sdLDL is mostly found in the patients with hypertriglyceridemia.

Key words: hyperlipidemia, atherosclerosis, small dense LDL.

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ateroskleroz, arterlerde aşamalı olarak lipid birikimi ve intima kalınlaşması ile gelişen; arter esnekliğinin azalması, lümen daralması ve kan akışının yavaşlaması ile sonuçlanan inflamatuvar bir hastalıktır. Kan akışının azalması ve bir organın hücrelerine çok az oksijen gitmesi nedeniyle iskemi veya enfarktüse neden olur.^{1,2}

Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), partikül başına tek bir apolipoprotein (apo) B-100 içeren primer plazma lipid taşıyıcılarıdır. Özellikle köpük hücrelerinde kolesterol birikimini sağladığından diğer lipoproteinlere (Lp) göre oldukça aterojenik karaktere sahiptirler.³ İnsanda LDL boyut, yoğunluk, lipid kompozisyonu, metabolik davranış ve aterojenitesi açısından farklılık gösteren 2 fenotipe ayrılır. Bu fenotipler, “patern A” (büyük hafif LDL’nin baskın olduğu fenotip) ve “patern B” (küçük yoğun LDL’nin baskın olduğu fenotip) olarak isimlendirilir.⁴⁻⁶ Küçük yoğun LDL (kyLDL), arteryal duvardan geçme yeteneğinin daha yüksek olması, LDL reseptörüne düşük bağlanma afinitesi, uzun plazma yarı ömrü ve oksidatif strese karşı direncinin düşük olması gibi nedenlerden dolayı büyük hafif LDL (bhLDL) alt grubuna göre daha aterojeniktir.⁴ Düşük HDL kolesterol (HDL-K) ve yüksek TG düzeyleri ile birlikte kyLDL’nin bulunması “aterojenik lipoprotein fenotipi (ALP) veya aterojenik dislipidemi” olarak isimlendirilir.^{7 8}



Şekil 1. Aterojenik lipoprotein fenotipi.

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) çok sayıda endüstriyel ülkede ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır. Yüksek TG, yüksek total ve LDL kolesterol (LDL-K), düşük HDL-K düzeyleri ile tanımlanan sigara, hipertansiyon, diyabet, obezite, ve dislipidemi, KVH'lara yol açan risk faktörlerinden bazılarıdır.⁹ LDL boyutu, kardiyovasküler olaylar ile koroner arter hastalığının ilerlemesinin önemli bir belirleyicisidir ve kyLDL'nin baskın olması National Cholesterol Education Program (NCEP) Adult Treatment Panel III tarafından kardiyovasküler risk faktörü olarak kabul edilmiştir.⁹ Bununla birlikte, diğer yazarlar standart risk faktörlerine oranla LDL alt grubu ölçümünün tek başına bilgi veremeyeceğini ileri sürmektedir.¹⁰ Bu nedenle kardiyovasküler risk belirleyicisi olarak LDL partikül boyutu ölçümünün yeterli olup olmadığı ve eğer öyleyse hangi hasta grubunda bakılacağı şüpheli durumdadır. Buna bağlı olarak çalışmada, normolipidemik ve değişik fenotipe sahip hiperlipidemili hastalarda LDL alt grupları dağılımının araştırılması amaçlanmıştır.

İKİNCİ BÖLÜM

2. GENEL BİLGİLER

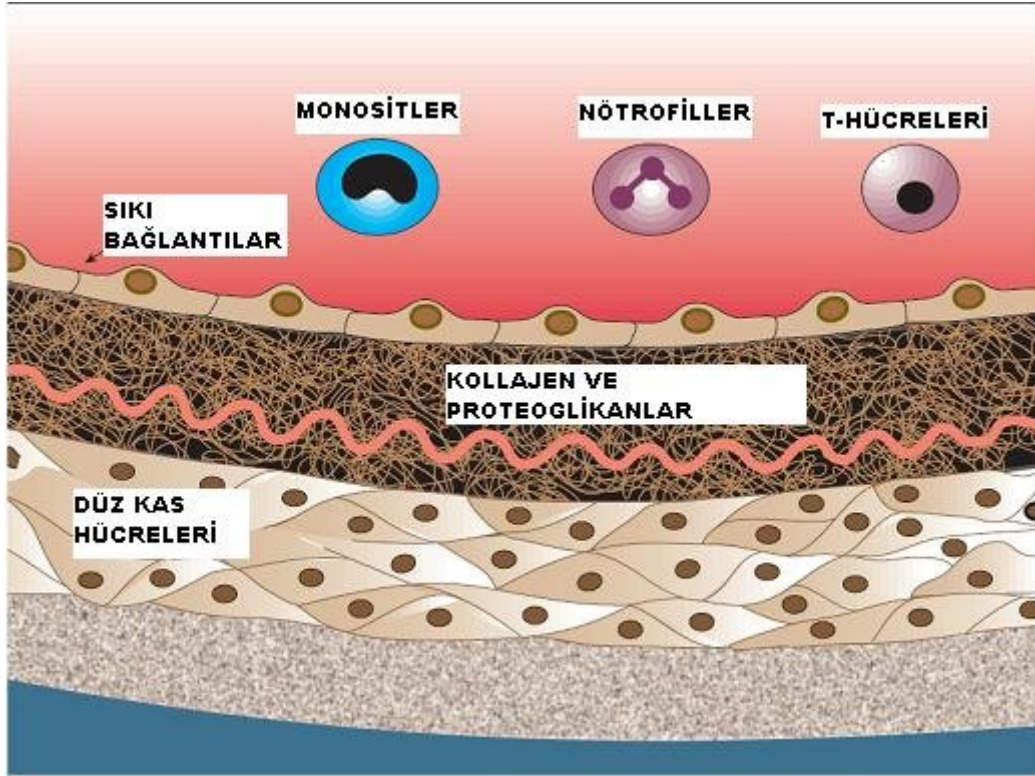
2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz büyük ve orta boyuttaki arterlerde lipid ve fibröz elementlerin birikimiyle tanımlanan progresif bir hastalıktır.^{11, 12} Bu proses, çocukluğun erken dönemlerinde başlar ve iyi huylu bir hastalık olarak hayat boyu devam eder.¹³ İnsanda, “yağlı çizgiler” genel olarak hayatın ilk dönemlerinde aortta, daha sonraları da koroner ve serebral arterlerde görülür. Klinik açıdan yağlı çizgilerin önemi yoktur; ancak bunlar düz kas hücreleri (DKH) ve lipidce zengin nekrotik debrisin birikimi ile tanımlanan çok daha ileri lezyonların öncüleridir.¹¹

Aterosklerozun patogenezinde lipid kompozisyonunda değişim (dislipidemi) ve total lipid miktarında artış (hiperlipidemi) önemlidir.¹⁴ Beslenme ve patolojik nedenlerle yükselen serum lipid düzeyleri, aterosklerozda artış ile sonuçlanır.¹⁵

Normal bir arterin luminal yüzeyi, tek sıra endotel tabakası ile kaplıdır ve bu hücreler kan ve doku arasında seçici geçirgen bariyer görevi yapan interselüler sıkı bağlantılı komplekslerdir. Diğer tabaka, intima, çok ince bir tabakadır ve ekstraselüler bağ doku içerir. İntima içinde bulunan internal elastik lamina, elastinden oluşur. İntimayı düz kas hücrelerinin oluşturduğu media tabakası izler. En dışta ise adventisya bulunur. Bu tabaka da bağ doku, fibroblastlar ve DKH’nden oluşmuştur.¹¹

(Şekil 2)



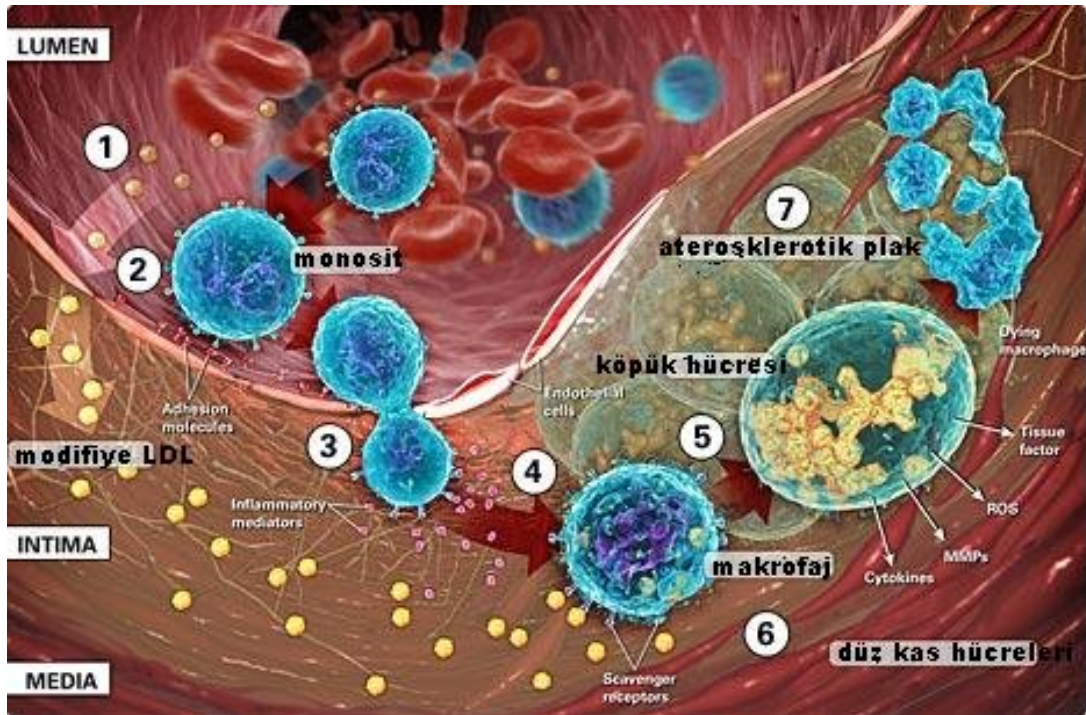
Şekil 2. Normal arter görünümü. En üstten başlayarak sıra ile kan, endotel hücreleri, intima, internal elastik lamina, media, adventisya tabakası.¹¹

Ateroskleroz gelişimi, birçok metabolik ve hücrel prosesi kapsar.¹⁶ Endotelial disfonksiyon ilk basamaktır. Endotelyumun adeziv (yapıştırıcılık) özelliği ve geçirgenliğinin artışı, prokoagulan özellikler kazanmasına ve vazoaaktif moleküller, sitokinler ve büyüme faktörleri salımına neden olur. Bu, LDL'nin subendotelial bölgede birikimine yol açar. Burada LDL oksidasyon, glikasyon, agregasyon, lipoliz, proteoliz vb. ile modifiye hale gelir. Okside LDL (oksLDL) birikimi endotel hücrelerini, adezyon molekülleri, büyüme faktörleri gibi proinflamatuvar molekülleri üretmesi için uyarır ve bu da LDL oksidasyonunun daha da ilerlemesine neden olur.¹²

Monositler endotelyum yüzeyine yapışırlar ve intimaya göç ederler. Daha sonra makrofajlara farklılaşarak daha çok kolesterol almaları sonucu köpük hücreleri oluştururlar. Damar duvarında görülen “yağlı çizgiler” bu şekilde oluşur. Erken lezyonların hücrel kompozisyonu Sary tarafından detaylarıyla tanımlanmıştır.¹⁷ Bu aşamada bolca proteoglikanla birlikte kollajen fibriller ve elastin bulunur. Endotelyum incelmış, çoğunlukla esneyip altındaki köpük hücreleri nedeniyle biçimini kaybetmiştir. Düz kas hücrelerinde bazı lipid damlacıkları bulunur. Birçok yağlı

çizginin lipid içeriği intraselülerdir. Ancak bazı lipidler intimal endotelial tabaka ve diğer bağ doku fibrillerine bağlı olarak ekstraselüler de bulunabilir. Plazma LDL düzeyleri yükseldikçe lipoprotein influksu sürer ve lezyon büyümeye devam eder.

Köpük hücreleri sonunda ölür ve lipidle dolu içeriğini aterosklerotik lezyonun nekrotik çekirdeğine katar.¹¹ Subendotelial alanda tutulan oksLDL, makrofajların yüzeyinde bulunan SR-A ve CD36 gibi çöpçü reseptörler aracılığıyla bu hücrelerle birleşir.^{11 12} Bu lipid yüklü makrofajlar sitokin ve büyüme faktörleri salarak düz kas hücrelerinin aterosklerotik lezyona göç etmesini ve proliferasyonunu sağlar. DKH, fibröz elementler ve ekstraselüler matriks bileşenlerini salgılar ve bu da fibröz plak oluşumuna neden olur. Bu lezyonlar ekstraselüler lipid kütlesinin büyümesi ve düz kas hücreleriyle onlardan türevlenen ekstraselüler matriksin birikimi ile tanımlanır.¹¹ (Şekil 3) Monosit birikimi, düz kas hücrelerinin proliferasyonu ve göçü, fibröz doku oluşumu şeklindeki döngü, lezyonun genişlemesine ve yeniden şekillenmesine yol açar. Fibröz plak, sonunda aşınır ya da bir bölgeden incelererek plak rüptürü ve tromboza neden olur ki bu olay koroner sendromlar veya miyokard enfarktüs ile sonuçlanır.¹²



Şekil 3. Aterosklerozda gerçekleşen olaylar.

(http://resverlogix.nonfiction.ca/product_development/nexas_platform/nexas_vascular_inflammation.html#3)

2.2. LDL Yapı ve Metabolizması

LDL, partikül yarıçapı 22–28 nm ve yoğunluğu 1.019- 1.063 g/mL olan küre şeklinde bir lipoprotein partikülüdür. Merkezde bulunan hidrofobik çekirdeğinde 1600 molekül kolesterol esteri (EK) ve 170 molekül TG vardır. Partikül, 600 molekül serbest kolesterol (SK), bir apo B ve 700 fosfolipid (FL) molekülünden oluşan monolayer tabakayla çevrilir. Fosfolipidlerin büyük kısmını fosfatidilkolin, daha az miktarlarda sfingomiyelin, lizofosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin ve fosfatidilinositol oluşturur. LDL'de bulunan yağ asitlerinin yaklaşık yarısı doymamıştır ve genel olarak linoleik asit ve az miktarda araşidonik asit ile dekosahexaenoik asitten oluşur. LDL partikülleri, ortalama olarak %37-45 EK, %9-11 serbest kolesterol, %5-11 TG, %18-24 FL ve %20-24 apolipoprotein içerir.¹⁸ LDL, partikül başına sadece bir apo B molekülü (apo B-100 veya apo B) içerir. Apo B-100, karaciğerde (KC) sentezlenir ve 4563 amino asitten oluşan bilinen en büyük monomerik proteinlerden biridir.¹⁹ Sekonder yapı analizi, apo B'nin %43 α -heliks, %21 α -tabaka, %20 gelişigüzel yapılar ve %16 β -dönüşler içerdiğini göstermektedir.²⁰

LDL partikülleri dolaşımdaki kolesterolün temel taşıyıcılarıdır. LDL, TG'ce zengin VLDL metabolizmasının bir ara ürünü olarak sentezlenir. VLDL-IDL-LDL kaskatında, lipoprotein lipaz (LPL) ve hepatik lipaz (HL) aktivitesiyle lipoproteinler TG'lerini azaltır. Ek olarak, apolipoproteinlerini de kaybeder. Sadece esansiyel yapısal protein olan apo B-100 partikülde kalır. HL, ara yoğunluktaki lipoprotein (IDL'nin) LDL'ye dönüşümünde önemlidir.²¹ Ancak bazı kinetik çalışmalar ile LDL'nin doğrudan KC'de de sentezlendiği gösterilmiştir.²²

LDL, hücre membranı üzerindeki apo B-100'ü tanıyan LDL reseptörüne bağlanır.²³ LDL'nin hücre içine alınması sonucu lipoprotein partikülü, lizozomal yıkıma uğrar ve serbest kolesterol sitozole salınır.²¹ Hücre kolesterol ile doymun hale gelir, intraselüler kolesterol artışı sonucu kolesterolün hücre içine geçişi down regule edilir.²⁴ LDL reseptör (LDL-R) ekspresyonu plazma kolesterol düzeyini regule eder.²¹ LDL partikülleri dolaşımdan hepatik ya da ekstrahepatik yolla temizlenir. KC, LDL'nin %75'ini uzaklaştırırken bunun %75'i reseptör aracılıdır.²⁵ Ekstrahepatik alımın ise %65–70'i reseptör aracılıdır ve kalanı nonreseptör-aracılı gerçekleşir.

Bilinen LDL reseptörlerine ek olarak, monositlerden türevlenen makrofajlar LDL'yi çöpçü reseptörler aracılığıyla hücre içine alır. Çöpçü reseptörler, asetillenmiş,²⁶ oksLDL²⁷ gibi kimyasal ve biyolojik olarak modifiye olan Lp'leri tanıyabilir. Bazı veriler, heparin proteoglikan-LDL kompleks oluşumu gibi LDL'nin oksidatif olmayan modifikasyonlarının, LDL'nin makrofajlar tarafından çöpçü reseptör aracılı endositoz veya fagositoz yolu ile alımını indükleyebileceğini göstermiştir.²⁸ LDL reseptöründen farklı olarak, çöpçü reseptör ekspresyonu hücrel kolesterol içeriği tarafından down-regüle edilmez ve bu nedenle süreç, intraselüler lipid birikimi ve sonrasında köpük hücre oluşumuyla sonuçlanır.²⁹

2.3. LDL Alt Grupları ve Aterojenik Özellikleri

Apo B içeren lipoproteinler olan VLDL, IDL ve LDL'nin, partikül yoğunluğu, boyut, yük, lipid ve apolipoprotein içeriği gibi bir dizi özelliğe bağlı olarak birbirinden farklılık gösteren alt gruplara ayrıldığı tanımlanmıştır. (Tablo 1).⁶

Tablo.1 Apo B içeren lipoprotein alt gruplarının fizikokimyasal özellikleri

	Pik S _f	Yoğunluk (g/mL)	Çap (Å)	% protein	% EK	% SK	% TG	% PL
VLDL-1	60-400	< 1.006	330-700	11	8	6	58	17
VLDL-2	20-60	1.006 - 1.010	300-330	18	24	9	29	22
IDL-1	12-20	1.008 - 1.022	285-300	17	35	10	16	21
IDL-2	10-16	1.013 - 1.019	272-285	17	37	11	13	21
LDL-I	7-12	1.019 - 1.023	272-285	18	43	9	7	22
LDL-II	5-7	1.023 - 1.028	265-272	19	45	10	4	23
		1.028 - 1.034	256-265	21	45	9	3	22
LDL-III	3-5	1.034 - 1.041	247-256	22	46	8	3	21
		1.041 - 1.044	242-247	24	44	7	3	21
LDL-IV	0-3	1.044 - 1.051	233-242	26	42	7	5	19
		1.051 - 1.06	220-233	29	40	7	6	18

LDL'nin uzun yıllar 20–27 nm ve $d=1.019–1.063$ g/mL aralığında devamlı olarak değişen boyut ve yoğunluktaki partikül topluluğundan oluştuğu düşünülüyordu. Ancak Krauss,³⁰ yüksek ayırmalı bir teknik olan gradient jel elektroforezi (GGE) kullanarak LDL'nin boyut ve yoğunluğu görece birbirinden farklı olan partiküllerden oluştuğuna dair bir kanıt ortaya koymuştur.

LDL alt gruplarının sınıflandırılmasında 2 yaklaşım en yaygın kullanılır: Musliner ve ark. denatüre olmayan koşullarda gradient jel elektroforezi ile 7'ye varan LDL alt grup tanımlamışlar, bunları yoğunluklarına göre 4 grupta toplamış ve büyük az yoğun dan küçük çok yoğun a doğru LDL-I, LDL-II, LDL-III ve LDL-IV olarak adlandırmışlardır.³¹ Austin ve ark, ise GGE ile parikül çpına göre 2 farklı LDL alt grubu tanımlamışlardır: patern A ve patern B. Patern A'da LDL partiküllerinin çpı 25.5 nm'den daha büyüktür. Zıt olarak, patern B'de LDL partiküllerinin çpı 25.5 nm'ye eşit veya ondan daha küçüktür.³²

Dansite gradient ultrasentrifüjle de LDL 3 fraksiyona ayrılabilir: büyük hafif LDL ($d=1.025-1.034$ g/ml), ara boyut ve yoğunluktaki LDL ($d=1.034-1.044$ g/ml) ve küçük yoğun LDL ($d=1.044-1.060$ g/ml).³³ Ayrıca Lipoprint sistem gibi poliakrilamid tüp jel elektroforezine dayalı otomatize sistemler ile LDL'nin 7 farklı alt grubu bulunabilir.³⁴

LDL alt gruplarının boyutu lipid/protein oranındaki azalmayla paralel olarak yoğunluk arttıkça azalır.³⁵ Partiküllerin kolesterol (serbest ve esterleşmiş) içeriğinin proteine oranı hesaplandığında; bu oranın büyük hafif LDL'de (2750/1 apo B) küçük yoğun LDL'ye (2100/1Apo B) göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir.³⁵ İnsan LDL partikül çpı, LDL'deki molar FL / apo B oranıyla da pozitif ilişkilidir. Bu da FL içeriğinin de LDL partikül boyutunun önemli bir belirleyicisi olabileceğini önermektedir.³⁶ LDL alt gruplarının yükleri arasında da farklılıklar vardır. LDL partikül yoğunluğu arttıkça negatif yük de artar.²²

kyLDL, klinik olarak önem kazandığından beri, büyük lipoprotein türlerine göre daha yüksek olan aterojenik potansiyelinin temelini anlaşılması gerekli olmuştur. kyLDL'nin daha aterojenik olduğuna dair çok sayıda neden önerilmektedir. Daha küçük ve daha yoğun LDL, subendotelyal bölgeye bhLDL'den daha kolay geçebilir,³⁷ başka deyişle transendotelyal transportu kolaydır. kyLDL partiküllerinin LDL reseptörlerine ilgisi düşüktür; bu nedenle plazmada bulunma süresi uzundur. kyLDL daha az oranda FL ve SK içerir. Lipid içeriğindeki bu farklılık apo B-100'ün

konformasyonel değişimine neden olur ve proteoglikan bağlayıcı bölgeyi dışarı çıkarır. Bu nedenle yüksek proteoglikan bağlama yeteneğine sahiptir.³⁸ Ayrıca LDL'nin polianyonik proteoglikanlar ile in vitro bağlanması engelleyici rol oynayan siyalik asitin de patern B fenotipine sahip kişilerde, LDL partiküllerindeki içeriği düşüktür.³⁹

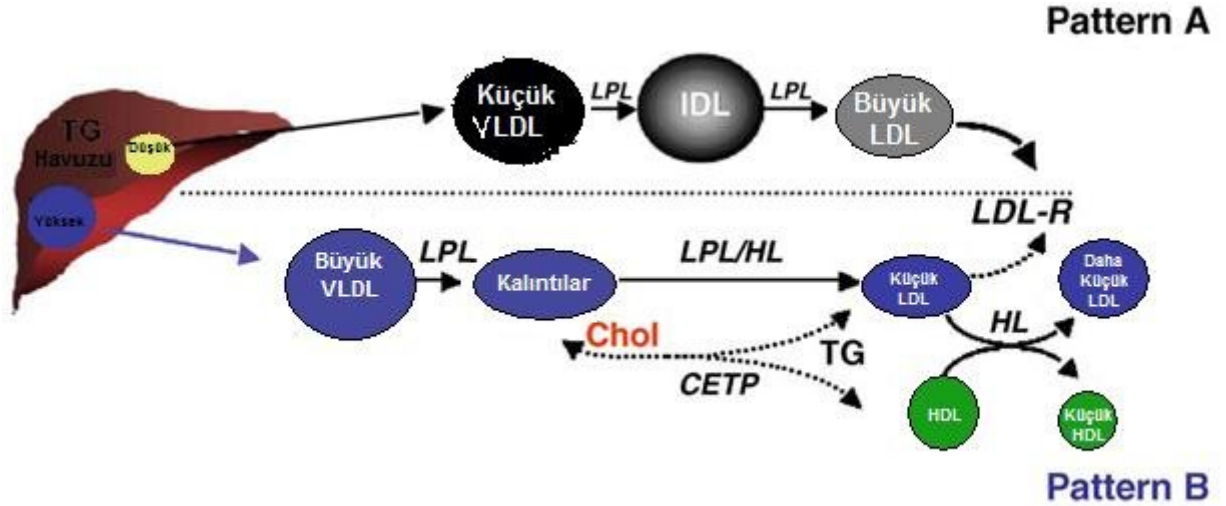
LDL boyutunun azalmasıyla birlikte oksidatif duyarlılık artar ve yapısındaki antioksidan konsantrasyonu azalır.⁴⁰ Yüzey lipid tabakasının değişen özellikleri serbest kolesterol içeriğinin azalması⁴¹ ve doymamış yağ asidi içeriğinin artması⁴² oksidatif duyarlılığı arttıran nedenler arasında sayılabilir.

2.3.1 LDL Alt Gruplarının Oluşumu

LDL alt gruplarının oluşumunda, LDL prekürsörü olan VLDL ve IDL'nin özellikleri yanı sıra dolaşımda buldukları süreçte geçirdikleri değişim ve katabolizmaları rol oynar. Günümüze kadar elde edilen veriler, bhLDL'nin daha çok, kolesterolden görece daha zengin, TG açısından daha fakir ve daha küçük VLDL (VLDL-2) ile IDL'nin LPL- aracılı lipolizinden oluştuğu; kyLDL'nin ise TG'den zengin, daha büyük VLDL'nin (VLDL-1) LPL ve HL aracılı lipolizinin katkıları ile oluştuğu yönündedir.⁴³

Yukarıda da belirtildiği gibi VLDL-2 ve IDL, VLDL-1'e göre, kolesterol esterlerince daha zengin, TG açısından fakir ve apo B'ye göre düşük oranda apo E ve apo C içerir.^{44 45}

Normal koşullarda, karaciğerdeki düşük TG içeriği, küçük ve TG'den daha fakir VLDL-2 sentezlenmesine, bunun da LPL aracılı lipoliz ile IDL ve bhLDL'ye dönüşümüne neden olur (Şekil 4 - Patern A). Ancak karaciğer TG içeriği yükseldiğinde daha büyük ve TG açısından zengin VLDL partikülleri sentezlenerek dolaşıma salınır. LPL ile hidrolize uğramış VLDL partiküllerinin de TG içeriği yüksek olduğundan bu partiküller ile HDL arasında CETP aracılı kolesterol ve TG alış verişi olur. Ayrıca TG'den zengin partiküller HL için iyi bir substrat haline gelirler. Bu şekilde daha küçük ve yoğun LDL partikülleri oluşur (Şekil 4 - Patern B).⁴³



Şekil 4. LDL alt gruplarının oluşum mekanizmaları⁴³

LPL: lipoprotein lipaz, HL: hepatik lipaz, CETP: kolesterol ester transfer protein, TG: trigliserid.

Patern B fenotipine sahip hastalarda karaciğer TG içeriğini belirleyen birbiri ile ilişkili 3 metabolik defekt izlenmiştir: 1. karaciğerde aşırı VLDL sentezi; 2. yağ dokusunda yağ asidi tutulumunda azalma ve dolayısıyla plazma TG düzeyinde ve karaciğere dönen yağ asidi miktarında artma; 3. postprandiyal TG'den zengin şilomikron ve şilomikron kalıntılarının temizlenmesinde azalma.⁴⁶

CETP, kyLDL oluşumunda rolü olsa da mutlak gerekli bir komponent değildir. Genetik CETP eksikliğinde de kyLDL partiküllerinin dolaşımında bulunduğu gösterilmiştir.⁶

VLDL'den IDL ve LDL'ye dönüşümler, lipoliz için yeterli TG varlığında gerçekleşir. Bu sürecin tam bilinmemekle birlikte apo E bağımlı bir mekanizmaya bağlı olduğu düşünülmektedir.³⁵

2.3.2 LDL Katabolizması ve Plazmadan Temizlenmesi

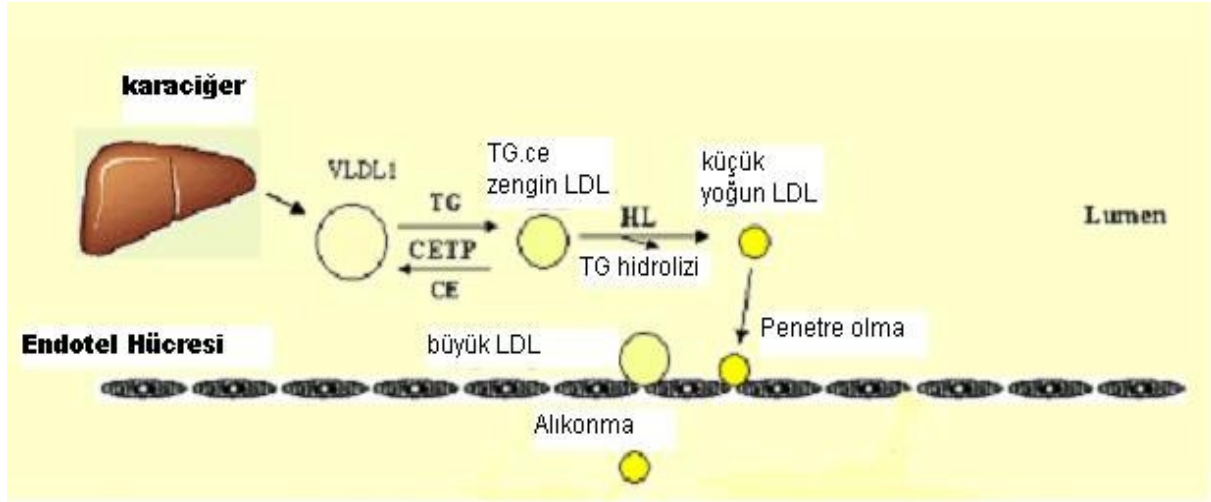
LDL temel olarak Apo B'ye afinite gösteren LDL reseptörleri aracılığı ile plazmadan temizlenir. İnsan LDL alt grupları arasında LDL reseptörü için en uygun ligandın ara boyuttaki LDL olduğu önerilmektedir.⁴⁷ Ancak biyokimyasal ve metabolik olarak heterojenite gösteren LDL partiküllerinin bazı alt grupları diğerlerinden daha hızlı uzaklaştırılır.⁴⁸ Hipertrigliseridemik hastalarda yapılan çalışmalarda, kyLDL miktarının

arttığı ve bunların büyük ölçüde reseptör-bağımsız yol ile temizlendiği bulunmuştur.⁴⁹ kyLDL'nin, hücre yüzey proteoglikanları gibi LDL reseptöründen farklı bölgelere bağlanmasındaki artış da bu yolun ön plana geçişinde etkilidir. Apo B-100'deki konformasyonel farklılıklar ve LDL alt grupları arasındaki yüzey yüklerinin, katabolik yıkımın temel belirleyicileri olduğu nükleer magnetik rezonans (NMR) kullanılarak gösterilmiştir.

2.3.3 LDL Partikül Boyutunun Regülasyonu

2.3.3.1 Metabolik Regülasyon

LDL partikül boyutunun in vivo regülasyonunda LDL'deki EK'ün, şilomikron ve VLDL'deki TG'ler ile yer değiştirmesi önemli rol oynar. Kinetik çalışmalar, VLDL-1 partiküllerinin kyLDL'nin öncüsü olduğunu göstermiştir. VLDL-1'in uzun süre dolaşımında alıkonması lipid değiş tokuşunun da uzun sürmesini sağlar. Metabolik proseste (Şekil 5) EK'ün bir kısmı, LDL'nin partikülünün merkezinde kalırken bir kısmı CETP ile VLDL'ye transfer edilir ve karşılığında TG alınır. Sonuçta LDL, TG'ce zenginleşir ve bu da onu LPL ve özellikle HL için iyi bir substrat haline getirir. HL çekirdekten TG, yüzeyden de FL hidrolizi ile bhLDL partiküllerini küçük yoğun partiküllere dönüşümünde önemli rol oynar.^{22 50} LPL, TG'ce zengin Lp'lerin hidrolitik hızını belirlerken, LDL alt grupları üzerinde indirek bir etkiye sahip olabilir.⁵ Şilomikron, VLDL miktarı ya da CETP aktivitesindeki artış, kyLDL'nin bhLDL partiküllerine göre oranını artırır. Koba ve ark, uzamış postprandial hipertrigliseridemi olan kişilerde şilomikronların dolaşımdaki lipoproteinleri TG açısından zenginleştirerek kyLDL oluşumuna katkıda bulunduğunu göstermişlerdir.⁵¹



Şekil 5. kyLDL oluşumunun şematik gösterimi.

(LIU M. LDL Oxidation and LDL Particle Size In The Development Of Atherosclerosis. Department of Medicine University of Helsinki, 2002. Academic Dissertation).

2.3.3.2 Genetik ve Çevresel Etkiler ile Regülasyon

Metabolik regülasyon dışında çeşitli genetik ve çevresel faktörler de LDL alt gruplarının oluşumunda rol oynamaktadır. Temel belirleyici etkenler olarak yaş, cinsiyet gibi biyolojik faktörler, insülin rezistansı ve bazı hastalıklar sayılabilir.⁵⁰

kyLDL'nin otozomal dominant kalıtıldığı ve genetik penetransının yaş, cinsiyet ile değiştiği bildirilmiştir. Patern B fenotipinin prevalansı yetişkin erkeklerde %30-35 iken yaşı 20'den küçük olan erkekler ile menapoz öncesi kadınlarda^{7, 52} çok daha düşük (%5-10) ve menapoz sonrası kadınlarda ise %15-25'tir.⁵³ 470 kişinin araştırıldığı bir çalışmada sorumlu genlerin 3. ve 4. kromozomlarda yerleştiği belirlenmiştir.⁵⁴ Ayrıca kyLDL'nin baskın olması, ailesel kombine hiperlipidemi,⁵⁵ hiperapobetalipoproteinemi⁵⁶ ve hipoalfalipoproteinemi⁵⁷ gibi genetik lipoprotein metabolizma hastalıklarında da bulunur. Genetik faktörler LDL boyutu değişimini %35-45 oranında etkiler.⁵⁸ LDL partikül boyutunun kalıtım ile bu oranda değişmesi, genetik olmayan bazı çevresel faktörlerin önemini vurgulamaktadır. Yaş ve cinsiyete ek olarak abdominal adipozite,⁵⁹ ve bunun ile bağlantılı insülin rezistansı, östrojen⁶⁰, oral kontraseptif kullanımı⁶¹ LDL partikül boyut ve yoğunluğunu etkiler. Genetik olarak

fenotip B'ye yatkınlığı fazla olan kişilerde düşük yağ ve yüksek karbohidratlı (KH) diyetin bu fenotipin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir.^{62, 63}

2.3.4 LDL Partikül Boyutu ve Plazma Trigliseridleri

LDL'nin gradient jeller veya ultrasantrifüj kullanılarak heterojenitesi üzerine yapılan en eski çalışmalardan beri, kyLDL saptanan hastalarda plazma TG düzeyleri daha yüksek bulunmuştur. Plazma TG ve LDL boyutu arasındaki bağ ilk kez Austin ve ark. tarafından saptanmıştır.⁷ Çalışmada patern A'nın, plazma TG düzeylerinin düşük olduğu durumlarda (<45 mg/dL), patern B'nin ise TG'i 177 mg/dL'yi aşan kişilerde bulunduğunu gösterilmiştir. Aynı grup bir başka çalışmada patern B ile birlikte plazma TG düzeyinde 2 kat artış saptamış, plazma apo B ve IDL düzeylerini yüksek, HDL-K ve apo A-I konsantrasyonunu düşük bulmuştur.³²

Griffin ve ark. sağlıklı ve koroner kalp hastalığı (KKH) olan kişilerde yaptıkları bir çalışmada,⁶⁴ LDL-I ve LDL-II'yi sağlıklı, ancak LDL-III'ü KKH olan grupta yüksek bulmuşlardır. 100 mg/dL'lik LDL-III konsantrasyonunu iki grup arasındaki ayırt edici değer olarak saptamışlar ve bunun üzerindeki sonuçların AMI riskini 7 kat arttırdığını belirtmişlerdir.⁶⁴

Yapılan çalışmalara göre,⁶⁵ düşük veya normal plazma TG düzeylerinde çok az kişi kyLDL'ye sahiptir. Patern B veya LDL-III > 100 mg/dL olan populasyonun büyük bir kısmına bakıldığında lipoprotein metabolizmasında bozukluk bulunmaktadır. Aterojenik lipoprotein fenotipi Austin ve ark tarafından⁷ düşük HDL, orta düzeyde VLDL ve kyLDL sendromu olarak tanımlanmıştır. Bu fenotip, populasyondaki en önemli KVH risk faktörü olarak bilinmektedir. VLDL-1 artışı nedeniyle plazma TG'teki yükselme, sendromun artmasına neden olan metabolik yollardan biri olabilir.

2.4. LDL Alt Gruplarının Klinik Önemi

1988'de Austin ve arkadaşları kyLDL partiküllerinin, yani patern B'nin baskın olduğu kişilerde miyokard enfarktüsü görülme riskinin üç kat daha fazla olduğunu, aynı zamanda kyLDL ile yüksek TG ve düşük HDL-K düzeyleri arasında anlamlı ilişki olduğunu göstermişlerdir.³² "Quebec Cardiovascular Study"de kyLDL ve Apo B yüksekliğinin birlikte olmasının KKH için bağımsız risk faktörü olduğu ve kyLDL yüksekliği ile Apo B düzeyinin >120 mg/dL olmasının KKH riskini 6.2 kat arttırdığı

bulunmuştur.⁴⁶ Yine yapılan çalışmalara göre, genel olarak kyLDL partikülleri erkeklerde kadınlara göre daha yüksek orandadır; Tip 2 Diabetes Mellitus (DM) hastalarında patern B yüzdesi anlamlı olarak artmıştır ancak LDL-K konsantrasyonu ve LDL boyutu arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir.⁶⁶ Ayrıca kyLDL'nin Tip 2 diyabetiklerde olduğu gibi klinik olarak sağlıklı orta yaşlı kişilerde adiponektin ile ters korelasyonunun olduğu ve bu ilişkinin diğer faktörlerden bağımsız olduğu ortaya konmuştur.⁶⁷

National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III'de periferik arter hastalıkları, geçici iskemi ataklar veya aort anevrizması şeklinde karşılaşılan koroner arterler dışındaki damarlardaki aterosklerozun KKH'nin önceden tahmininde güçlü etkisi olduğu belirtilmiştir.⁹

Bazı çalışmalarda, periferik arter hastalıklarının genel özellikleri olarak yüksek TG, düşük HDL-K gösterilmiş⁶⁸ ve buna ek olarak çoğunlukla aterojenik kyLDL'nin de düzeyinin yüksek olduğu yani aterojenik dislipideminin varlığı belirtilmiştir.^{7 69}

Günümüzde vasküler hastalıkların önlenmesi ile ilgili çalışmalarda en ilgi çeken konulardan biri diyet, egzersiz, kilo kaybı, alkol tüketimi, ilaçlar gibi çeşitli faktörlerin LDL alt grupları üzerine olan etkisidir. Compos ve arkadaşları, diyet ve LDL alt grupları arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmada, kolesterol ve doymuş yağ asidi tüketimi ile kyLDL düzeyi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu saptamışlardır.⁵³

2.5. LDL Alt Grupları Belirlemede Kullanılan Analitik Yöntemler

LDL heterojenitesi; lipoprotein boyutu, flotasyon hızı ve yoğunluğu gibi LDL partiküllerinin farklı fiziksel özelliklerine göre tanımlanır.⁷⁰ Bu özelliklerinden yararlanılarak LDL alt gruplarını tanımlamada kullanılan yöntemler ve nitelikleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. LDL alt gruplarını belirlemede kullanılan yöntemler

Yöntem adı	Kullanılan Teknik	Avantajı	Dezavantajı
Ultrasantrifugasyon	Merkezkaç kuvveti, tuz gradienti	Doğruluk ve duyarlılığı çok yüksek	Pahalı ekipman, zaman alıcı
İyodiksanol gradient ultrasantrifugasyon	İyodiksanol ile gradient oluşumu	Kolay ve hızlı	Özel ekipman gereksinimi
Çöktürme	Heparin-Mg ile çöktürme	Kolay, kısa süreli	
GGE	%2-16 jellerde boyuta bağlı elektroforez	Doğruluk, duyarlılık yüksek	Zaman alıcı, yarı kantitatif
Poliakrilamid jel tüp elek.	Tüplerde GGE	Çok sayıda örnek analizi, rutin çalışmaya uygun	Pahalı
Kapiller izotakoforez	Elektroforetik mobilitelere bağlı ayırım	Isı kontrolü, kısa süreli	
NMR	Spin veya elektriksel rezonans	LDL boyut ve konsantrasyon ölçümü	GGE ile birbirinden farklı sonuçlar
HPGC-UV HPGC-FL	Molekül büyüklüğüne bağlı kromatografik ayırım	Seçiciliği yüksek, çok sayıda örnek analizi	Ön işlem gereksinimi

LDL partikül boyutunun ölçülmesinde kullanılan yöntemler; ultrasantrifugasyon,⁷¹ elektroforez,⁷² kromatografi,⁷³ presipitasyon (çöktürme),⁷⁴ kapiller izotakoforez⁷⁵ ve NMR⁷⁶ olarak sıralanabilir. Gradient jel elektroforezi ve ultrasantrifugasyon bilinen en eski ve temel yöntemlerdir. Denature olmayan koşullarda yapılan GGE sonrası LDL partikülünün çapları, boyutu bilinen protein standartları kullanılarak kalibrasyon eğrisinden hesaplanabilir. Poliakrilamid jel tüp

elektroforezinde (Lipoprint LDL System, Quantimetrix, USA) olduğu gibi ile günümüzde serum ve plazma örnekleri aterojenik IDL dahil, tüm lipoprotein alt gruplarının kalitatif ve kantitatif tayininde kolay, hızlı ve kapsamlı değerlendirme yapabilmektedir.⁷⁷ Yoğunluk gradient ultrasantrifügasyon ile flotasyon hızına bağlı olarak yüksek doğruluk ve duyarlılıkta kantitasyon yapılabilir.⁷⁸ Ancak, yöntem referans olarak kullanımının yanında oldukça zaman alıcı olduğundan iyodiksanol gibi tuz gradientleri oluşturarak daha hızlı hale getirilmeye çalışılmaktadır.⁷⁹ Kapiler izotakoforez, yüksek performans jel filtrasyon kromatografi ve NMR farklı avantajları ile son yıllarda LDL partikül boyutunun belirlenmesinde ilgi gören yeni yöntemlerdendir.

2.5.1. Denature Olmayan Koşullarda Gradient Jel Elektroforezi

Plazma LDL alt gruplarının partikül boyut dağılımı farklı laboratuvar teknikleriyle ölçülebilir.¹⁰ Ancak bilinen en iyi yöntem Tris-borik asit (0.08M)-NaEDTA (0.003M) tamponunun (pH:8.3) kullanıldığı 10°C'de uygulanan gradient jel elektroforezidir.⁸⁰ Yönteme göre, plazma önce %20 sukroz ile 4:1 oranında karıştırılıp, %0.05 bromfenol blue eklenerek 3-10 µL jele yüklenir. Güç; 40 mV (15 dk), 80 mV (15 dk), 125 mV (24 saat) şeklinde uygulanır. Jeller fikse edilir ve lipidler için 55 °C'de %0.04'lük Oil Red O (%60'luk etanolde) içeren çözeltide, proteinler için ise %0.1'lik Coomassie Brilliant Blue R-250 içeren çözeltide boyanıp ardından %50 etanol ve %9 asetik asitten oluşan çözeltiye bırakılarak boya uzaklaştırılır. Daha sonra bantların dansitometrik analizi yapılır. Çapları bilinen standartlar ile karşılaştırılarak moleküler çapları göç uzaklığına bağlı olarak belirlenir.⁸⁰

2.5.2 Heparin-Magnezyum İle Çöktürme Yöntemi

Değişik divalent katyon ve polianyon birleşimlerinin çeşitli lipoproteinlerin seçici olarak presipitasyonunu (çöktürülmesi) sağladığı bilinmektedir. Ancak, Hirano ve arkadaşları heparin-magnezyum birleşiminin tüm apo-B içeren lipoproteinleri çöktürmediğini, ultrasantrifüj ile yoğunluğu 1.044-1.063 g/mL'ye karşılık gelen küçük yoğun LDL fraksiyonunun süpernatantta kaldığını bulmuşlardır. Santrifügasyon ile kyLDL dışındaki tüm LDL partikülleri çöktürüldükten sonra süpernatantta kolesterol

ölçümü ile kantitasyona gitmek mümkündür. Hızlı, kolay ve kısa süreli olması nedeniyle diğer yöntemlere göre daha avantajlı olduğu düşünülmektedir.⁸¹

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyaller

Çalışmada kullanılan cihaz ve malzemeler aşağıdaki tabloda listelenmiştir.

Tablo 3. Çalışmada kullanılan materyaller ve kullanım amaçları

Cihaz adı	Marka - Kodu	Kullanım Amacı
Pore Gradient Lipoprotein Elektroforez Sistemi	CBS Scientific, LPE-4003	Denature olmayan koşullarda gradient jel elektroforezi
Güç kaynağı	CBS Scientific, EPS-300-II-V Mini-Power Supply, 300V, 220V	Elektroforez için gerekli akımın sağlanması
Dansitometri cihazı	Amersham Imagescanner	Dansitometrik analiz
Floresans görüntüleme cihazı	2000mm Kodak imaging sistem	Floresans görüntüleme ve dansitometrik analiz
Santrifüj	Heraus 2.0 RS (Almanya)	Çöktürme
Otoanalizör	Abbott Architect C-16000	Serumdaki total K, TG, LDL-K analizi
Sıcak su banyosu	Amersham Multitemp III	Elektroforez tankının 10°C'ye soğutulması
Malzeme Adı	Marka - Kodu	Kullanım Amacı
Lipoprotein elektroforez jelleri 2/16	2/16 Alamo Gradient Gel, LPE-2/16	Gradient ile LDL'nin alt gruplarına ayrılması
HMW native marker kit	GE Healthcare, 17-0445-01 250µg/vial	Elektroforez için standart

Malzeme Adı	Marka - Kodu	Kullanım Amacı
Karboksilat-modifiye mikrokürecikler (0.32 µm) "Carboxylate-modified (CML) Microspheres"	Thermo, W030CA	Elektroforez için standart
Oil Red O 25 g	Sigma, O 9755	Lipid boyası
Asetik asit 2.5 kg	Sigma, 537020	Destaining
Trizma baz 500 g	Sigma, T 1503	Elektroforez tamponu
Sukroz 5 kg	Sigma, S 8501	Yürüme tamponu bileşeni
Borik asit 500g	Sigma, B 7660	Elektroforez tamponu
EDTA 100 g	Sigma, E 1644	Elektroforez tamponu
Bromfenolblue %0,05 25 g	Sigma, B 0126	Yürüme tamponu bileşeni
Etanol 2x1L	Sigma, 34923	Boya çözgeni
Heparin-sodyum tuzu	Sigma, H3393	Çöktürme reaktifi
MgCl ₂	Sigma, M 8266	Çöktürme reaktifi

3.2. Olgu Seçimi ve Materyal Eldesi

3.2.1. Olgu Seçimi

Dokuz Eylül Üniversitesi Uygulama Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarına başvuran poliklinik hastaları rastlantısal olarak seçildi. Çalışmada, hiperlipidemik ve normolipidemik kişilerin kan örnekleri kullanıldı. Amaç, diğer lipid parametreleri ile küçük yoğun LDL arasındaki ilişkiyi belirlemek olduğundan ve kişinin lipid dağılımındaki bozukluğun nedeni ile değil LDL alt grupları üzerine olan etkileriyle ilgilendiği için hastalarla görüşülmedi ve demografik bilgileri kullanılmadı.

Alınan 210 hasta örneği 4 grup altında incelendi:

- 1. Grup; Kontrol grubu; (n=54)
TG < 150mg/dL, TK < 200mg/dL- normolipidemisi olan hastalar
- 2. Grup; Hipertrigliseridemi grubu (n=52)
TG ≥ 150 mg/dL, TK < 200mg/dL olan hastalar
- 3. Grup; Hiperkolesterolemi grubu (n=52)
Total kolesterol (TK) ≥ 200 mg/dL, TG < 150 mg/dL olan hastalar

- 4. Grup; Kombine Hiperlipidemi grubu (n=52)
TG \geq 150 mg/dL, TK \geq 200mg/dL olan hastalar

3.2.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Merkez laboratuvarında, Abbott ticari kitleri ile enzimatik yöntemle kantite edilmiş olan, LDL-K, HDL-K, TG ve TK sonuçlarına göre hastalar seçildi. Antikoagülsüz tüplerdeki örnekler santrifüjlenerek serumları alındı. +4°C'de en fazla 3 gün saklanarak analizleri yapıldı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. LDL Alt Gruplarının Belirlenmesi

3.3.1.1. Denature Olmayan Koşullarda Gradient Jel Elektroforezi

Yöntemin prensibi: Gradient jel elektroforezi, artan konsantrasyondaki poliakrilamid jelden oluşan matriks içinde, yüklü partiküllerin göçüne dayanır.⁸² Jel konsantrasyonu arttıkça, matriksin por çapı giderek azalır. Bunun sonucunda, yüklü partiküllerin göç etmesi gecikir. Artan gecikme ile yüklü partiküller, partikül boyut ve şeklinin bir fonksiyonu olarak etkili bir "exclusion limit" e yaklaşır. Araştırılmakta olan spesifik partikül karışımının boyut aralığı göz önünde bulundurularak, jel konsantrasyon gradienti ve sıfır göç hızına ulaşmak için istenilen zaman belirlenir.³⁰ Fiziksel özellikleri bilinen protein karışımlarından oluşan standartlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilir ve örneklerin tanımlaması bu grafik yardımı ile yapılır.

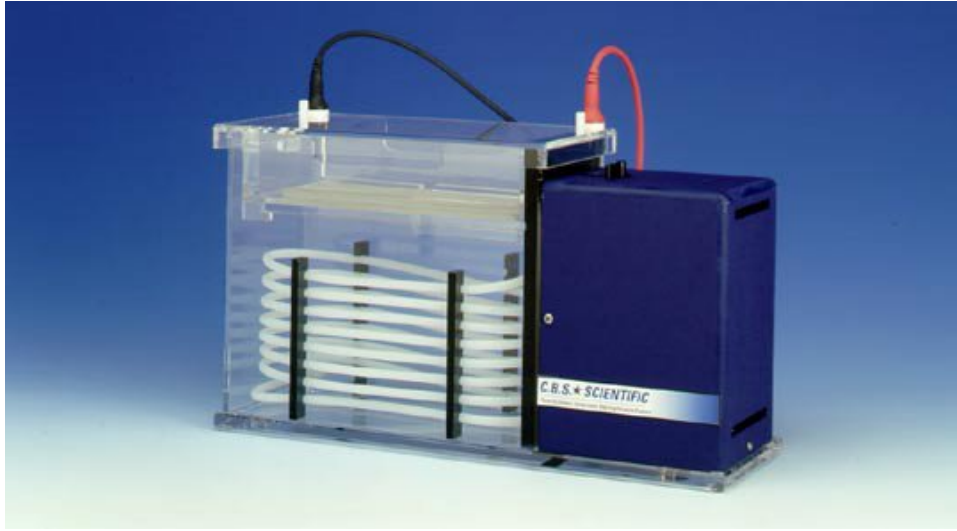
Lipoproteinler hem lipid hem de protein içerdiğinden dolayı, jel matriks içinde protein veya lipid spesifik boyalar ile boyanabilir. Plazma örneği analiz ediliyorsa, protein spesifik boyalar (Coomassie G-250 gibi) tam plazmanın girişime yol açabilecek proteinlerden izole edilmesinin ardından elektroforetik analizi yapılması durumunda uygulanabilir. İzolasyon, ultrasantrifüj ve immunoafinite kromatografisi gibi teknikler kullanılarak yapılabilir.

Lipid-spesifik boyalar (Oil Red O gibi) plazma proteinleri varlığında da kullanılabilir. Bu nedenle, izole fraksiyonlar kadar tam plazmadaki Lp alt grupları da lipid-spesifik boyalar ile boyanabilir.⁸³ Oil Red O, nötral lipidler (özellikle EK ve TG) için spesifikken polar lipidleri (esterleşmemiş kolesterol ve fosfolipidler gibi) daha az oranda boyar.⁸⁴

3.3.1.1.1. Elektroforez İşlemleri

Orijinal protokol ilk olarak Krauss ve Burke⁸⁵ tarafından tanımlanmış, daha sonra Rainwater ve ark,⁷⁰ Austin ve ark⁸⁶ tarafından modifiye edilmiştir.

Elektroforez, aynı anda 4 adet jelin yürütülebildiği bir sistem kullanılarak yapıldı (Şekil 6). Elektroforez işlemi +10°C'de yapıldığı için su banyosuna bağlandı. Tankın içindeki ince borular ile elektroforez tamponunun ve ortamın istenen soğuklukta olması sağlandı. Cihazın yan tarafındaki pompa ile tamponun tankın üst ve alt rezervuarları arasında sirkülasyonu sağlandı.



Şekil 6. Pore gradient lipoprotein elektroforez sistemi

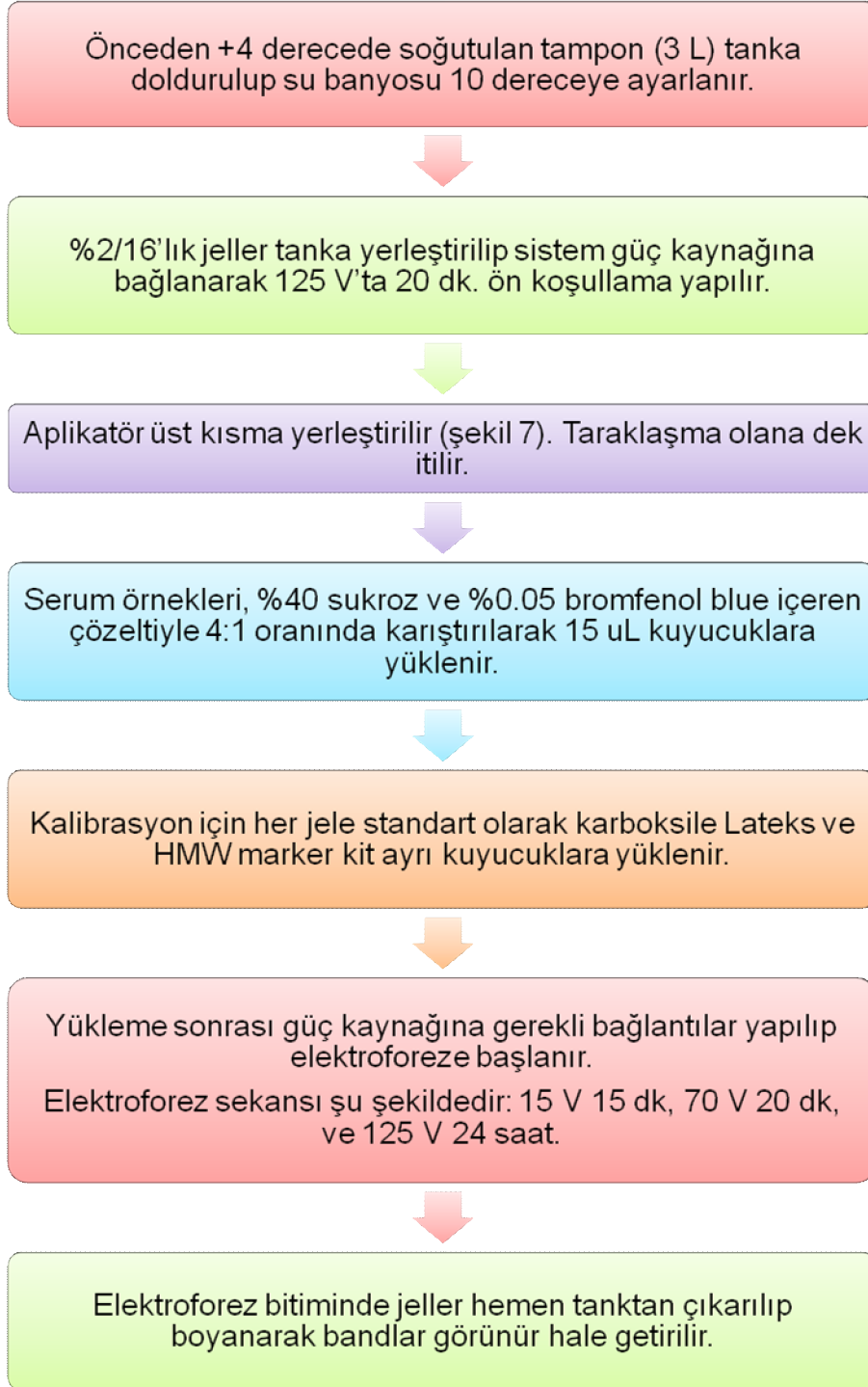
Elektroforez tamponu aşağıdaki içerik ile hazırlandı. Hazırlanan tampon oda sıcaklığında 1 ay stabil kalır.

Borik asid	80 mM
Tris baz	90 mM
Sodyum azid ve EDTA	3 mM

LDL alt gruplarının ayrılması için %2/16'lık gradiente sahip hazır jeller kullanıldı. Partikül çapının belirlenebilmesi için, partikül çapları bilinen 3 farklı standart kullanıldı. Bu standartların migrasyon uzaklıklarından (R_f) yararlanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi ve hasta örnekleri bu kalibrasyon eğrisine göre değerlendirildi. Standartlardan en büyüğü 32 nm partikül çapına sahip olan karboksilat-modifiye mikroküreciklerdi

(karboksile - Lateks partikülleri). Bu partiküller 1/10 oranında saf su ile dilüe edilerek ayrı bir "lane"de olacak şekilde 5 µL yüklendi. Diğer standartlar için tiroglobulin (çapı 17.0 nm), ferritin (12.2 nm), katalaz (10.4 nm), laktat dehidrogenaz (8.1 nm), albumin (BSA) (7.1) içeren bir karışım (HMW marker, Amersham) kullanıldı. Marker, dilüsyon yapılmadan direkt olarak jele 15 µL hacimde yüklendi. Denemelerde %2/16'lık jelde 24 saat yürütme sonrası standartın yüklendiği sırada yalnızca tiroglobulin ve ferritin bandları gözlemlendi. Bunların dışında karboksilat-modifiye mikroküreciklerin görüntülenmesindeki zorluklar nedeniyle kontrol amaçlı olarak, fluorescein izotiyosiyanat (FITC) molekülüne bağlı partikül çapı 34 nm olan silika partikülleri kullanıldı. FITC'nin floresan özelliği nedeniyle elektroforez sonrası silika bandı 2000mm Kodak imaging sistem kullanılarak görüntülendi.

Yöntemin (Krauss ve ark.a göre³⁰) protokol basamakları aşağıda sıralanmıştır:





Şekil 7. Alamo gradient jellerin ve aplikatörün tanka yerleştirilmesi.

3.3.1.1.2. Jellerin Boyanması

Elektroforez sonrası jeller tanktan çıkarılarak %60 etanolde hazırlanan %0.1'lik lipid boyası (Oil Red O) içine yerleştirildi. 55°C'lik su banyosunda 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda jeller %5'lik asetik asitten oluşan destaining çözeltisinde rehidrate edildi. Böylece boyama sırasında küçülen jelin tekrar eski boyutuna ulaşması sağlandı. Örneklerdeki LDL alt grupları kırmızı bandlar şeklinde görünür hale getirildi.

Protein bandları görüntülemek amacıyla, standartların yüklendiği "lane"ler filtre kağıtları kullanılarak strip halinde Coomassie R-250 ile boyandı. Boya, %50 metanol ve %10 asetik asitten oluşan çözgüde hazırlandı. Bu şekilde ön fiksasyon basamağına gerek duyulmadan standartlara ait bandların görünür hale gelmesi sağlandı. Boyanın fazlası ise aynı yöntemle %9 asetik asit ve %20 metanol içeren destaining çözeltisi ile uzaklaştırıldı. Boyamalar sırasında jelin kalan kısmının kurumasını engellemek için bu bölüm elektroforez tamponu ile kapatıldı.

3.3.1.1.3. Dansitometrik Analiz

Boyanan jellerin dansitometrik analizi ticari olarak bulunan standart cihazlar ile yapılabilir. Lp ve protein dansitometrisi için uygun dalga boyu Coomassie R-250 boyalı jeller için 555 nm; Oil Red O ile boyanan jeller için 530 nm'dir.

Boyama sonrası tüm jeller Amersham imagescanner dansitometre cihazı kullanılarak tarandı. Ardından ImageMaster_Labscan programı ile dansitometrik analizi yapıldı, standart ve örneklerin R_f değerleri hesaplandı.

3.3.1.2. Çöktürme Yöntemi ve LDL-K Düzeyinin Belirlenmesi

Yöntemin prensibi; Heparin-magnezyum birleşiminden oluşan reaktif tüm apo-B içeren lipoproteinleri çöktürmez; ultrasantrifüj sonrası süpernatantta sadece yoğunluğu 1.044-1.063 g/mL'ye karşılık gelen küçük yoğun LDL fraksiyonu kalır.

Buna göre, 150 U/mL heparin sodyum tuzu ve 90 mmol/L MgCl₂ içeren çöktürme reaktifinden 1.5 mL'lik ependorf tüplere 0.1 mL alınarak üzerine aynı hacimde serum örneği eklendi ve karıştırıldı. Tüpler 15 dakika 37°C'de inkübe edildi ve buz banyosuna yerleştirilerek 15 dk. daha bekletildi. 20 dakika 15000 rpm'de santrifüj edildi. Presipitatın tüpün dibinde paketlenmesi ve tüpün üst kısmında temiz bir süpernatant oluşması sağlandı.

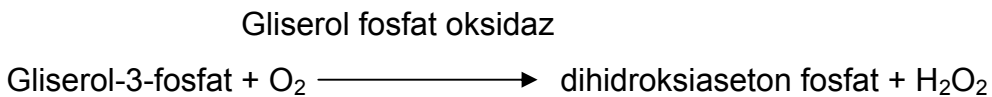
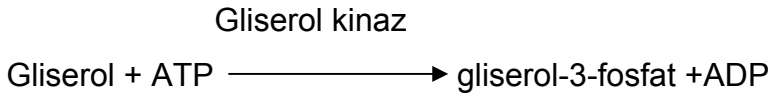
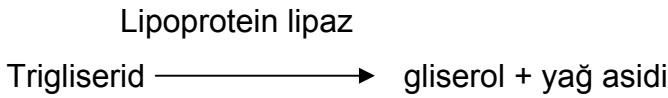
Bu protokol tüm hasta ve kontrol örneklerine uygulandı. Elde edilen süpernatantlarda DEU Merkez Laboratuvarında LDL-K analizi yapıldı.

3.3.2. Rutin Biyokimyasal Analizler

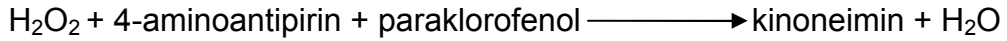
Ölçümlerin tümü, Abbott Architect C-16000 otoanalizörü kullanılarak, aynı isimli ticari kitlerle ve tekniklerinde belirtilen süre içerisinde yapıldı.

3.3.2.1. Trigliserid Ölçüm Yöntemi

Yöntemin prensibine göre; örneklerdeki TG'ler lipaz ile gliserol ve yağ asidlerine hidroliz edildiler. Gliserol, kinaz enzimiyle gliserol - 3 – fosfata dönüştü. Ardından oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar ile TG ölçümü kolorimetrik olarak gerçekleştirildi.



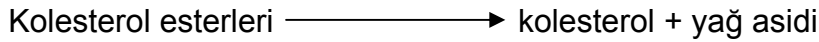
Peroksidaz



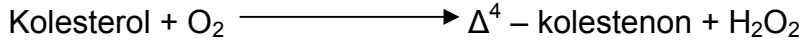
3.3.2.2. Kolesterol Ölçüm Yöntemi

Örneklerdeki kolesterol düzeyleri, kolesterol esteraz, kolesterol oksidaz ve peroksidaz enzimlerinin katalizlediği reaksiyonlar ile oluşan renkli kinoneimin boyasının 500 nm 'de kolorimetrik ölçümü ile belirlendi.

Kolesterol esteraz



Kolesterol oksidaz



peroksidaz



3.3.2.3. LDL-K Ölçüm Yöntemi

Yöntem, tek bir deterjan özelliğindeki 2 farklı reaktif varlığında gerçekleşti. R₁ reaktifi sadece LDL olmayan partikülleri çözüp, salınan kolesterol kolesterol esteraz ve oksidaz ile renk-vermeyen reaksiyonlar ile tüketildi. R₂ reaktifi kalan LDL partiküllerini çözdü ve kromojenik bağlayıcı renk oluşumunu sağladı. LDL ile bağlayıcı varlığındaki enzimatik reaksiyon, örnekte var olan LDL-K'ün miktarıyla orantılı renk şiddeti gösterdi.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirmeler "SPSS for Windows 11.0" ticari istatistik programı kullanılarak yapıldı.

Gruplardaki parametrelerin ortalamaları one way ANOVA testi ile değerlendirildi. LDL alt grupları ile 4 deney grubu arasındaki ilişki Ki-kare testi ile gösterildi. LDL alt grupları ile lipid parametreleri arasındaki ilişki Student t test ile yapıldı. P<0.05 olan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Parametrelere ait tüm değerler, ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. Korelasyon analizleri,

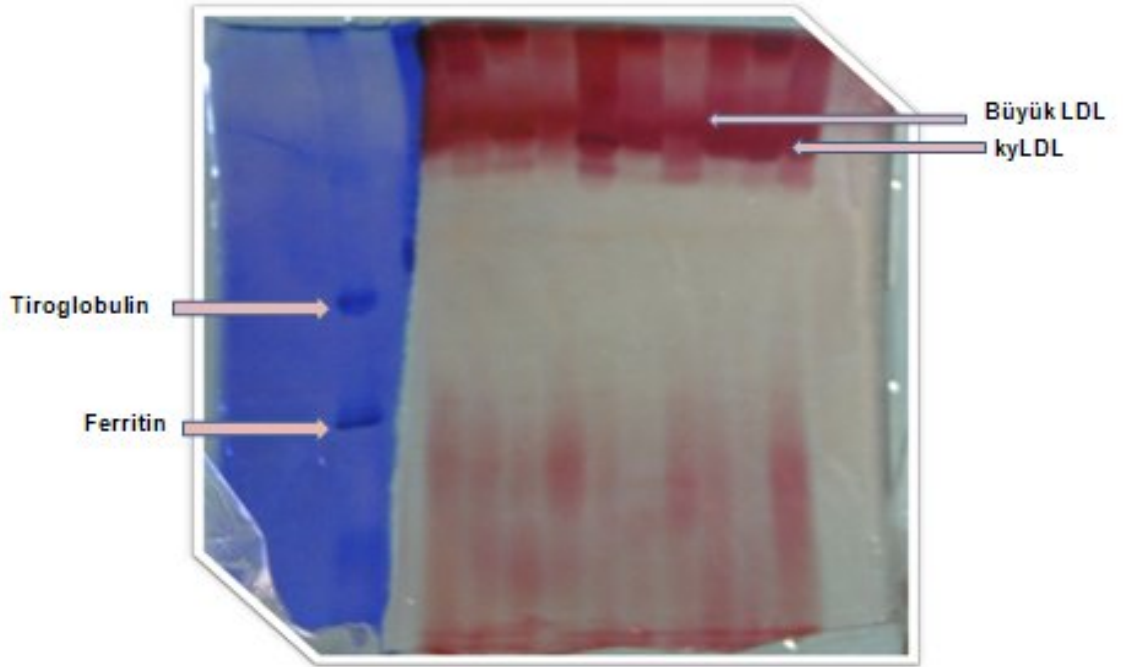
olgu sayısının 30'un üzerinde olduğu göz önüne alınarak parametrik bir test olan "Pearson korelasyon analizi" ile gerçekleştirildi.

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM

4. BULGULAR

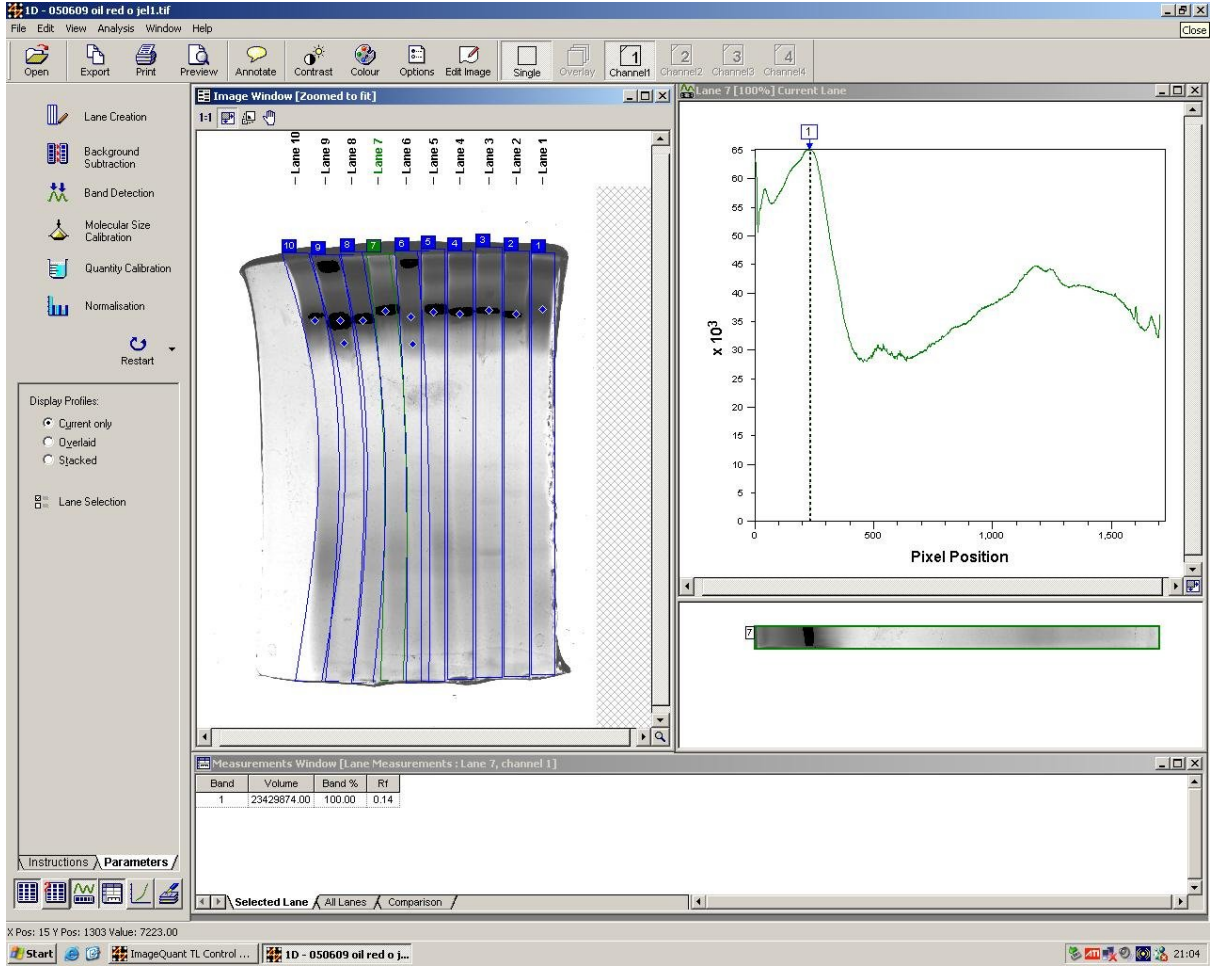
Çalışmada TG, TK, LDL sonuçlarına göre seçilen 210 kişinin serum örneklerine gradient jel elektroforezi ve heparin-magnezyum çöktürmesi yöntemleri uygulandı. TG değerlerinin 900'den büyük olması nedeniyle 2 hasta sonucu hesaplamalara dahil edilmeyerek toplam 208 örnek değerlendirmeye alındı.

Gradient jel elektroforezinde, 24 saat yürütme sonrası daha etkin boyama sağlamak amacıyla jeller uygun yerinden kesilerek biri Coomassie Blue R-250, diğeri de Oil Red O boyasıyla boyandı (Şekil 8).



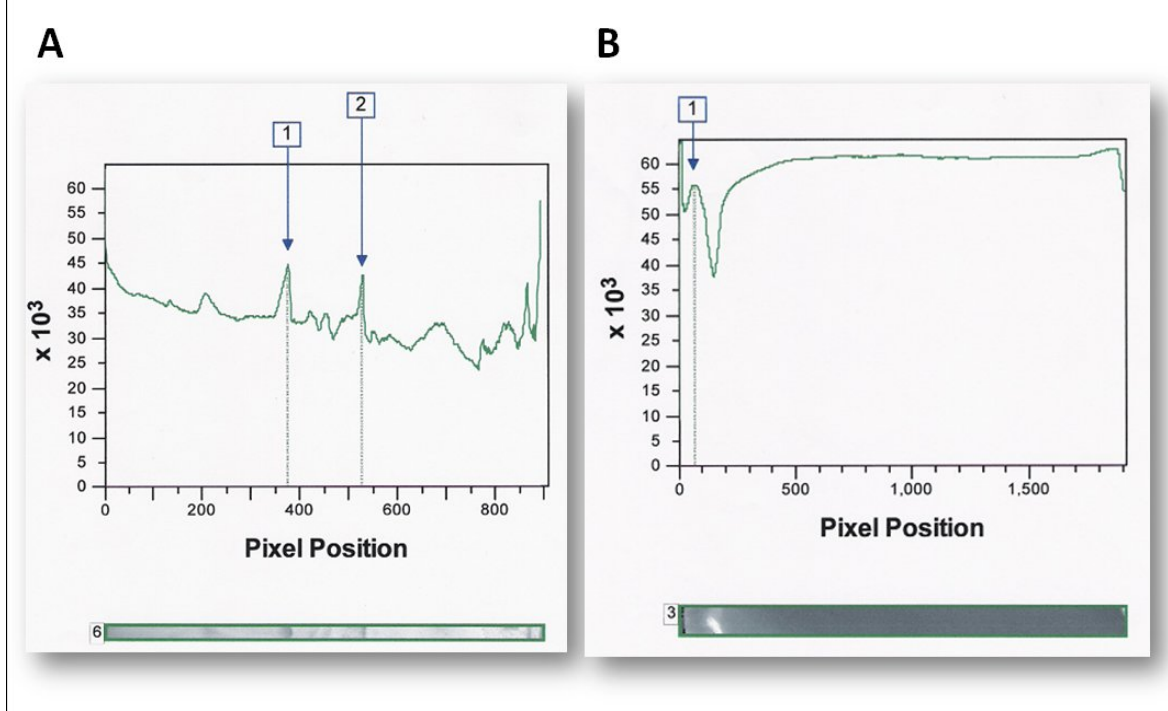
Şekil 8. Protein ve lipid boyalarıyla boyama sonucu jelin görüntüsü

HMW markerda yer alan ferritin ve tiroglobulin ile lipid boyası ile boyanan örneklerdeki bantların dansitometrik analizi yapıldı. Şekil 9'da ImageMaster_Labscan programı ile yapılan dansitometrik analiz örneği görülmektedir.



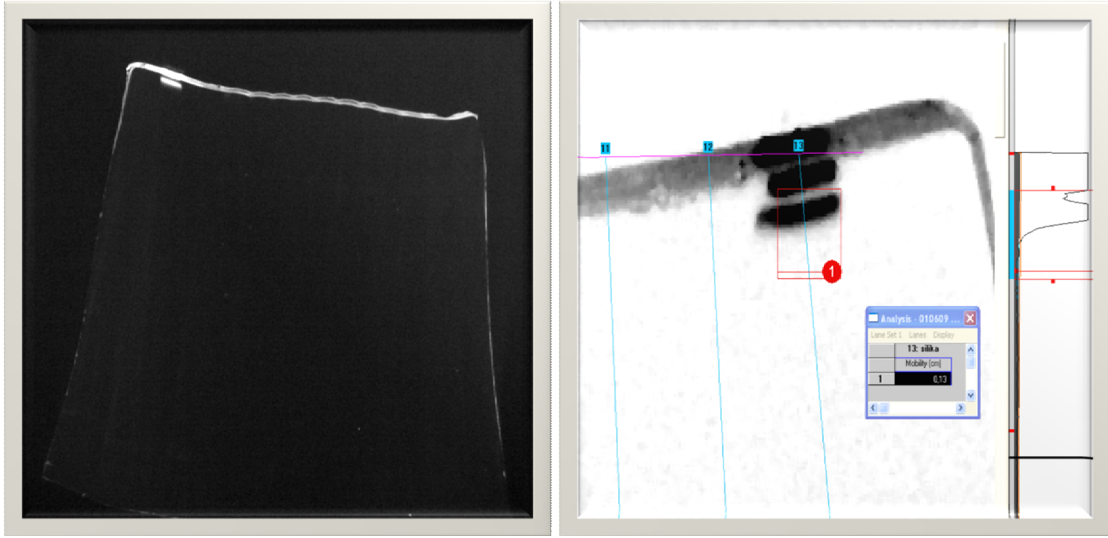
Şekil 9. Dansitometrik analiz yapıldığı. Bandların işaretlenmesi sonrasında sağda piksel olarak grafik, aşağıda ise hesaplanan R_f değerleri görülmektedir.

Örneklerin R_f değerlerinin hesaplanmasında kullanılan standartlardan ikisi; tiroglobulin ve ferritin, protein boyaması sonrasında temiz birer band verirken (Şekil 10A), üçüncü standart olan karboksil-modifiye Lateks partikülü, boyama sonrası net bir görüntü vermedi. Ancak dansitometrik analizi yapıldığında, küçük bir pik olarak gözlemlendi (Şekil 10B).



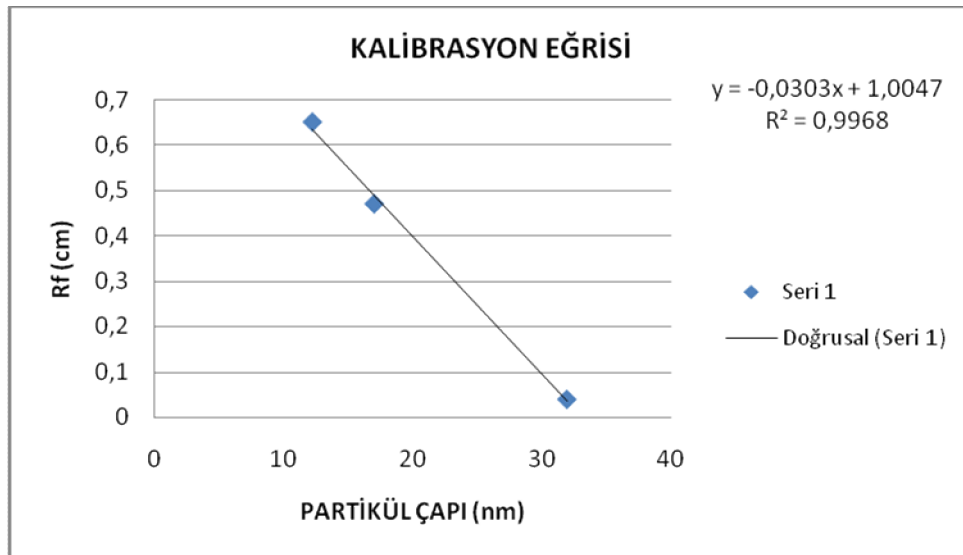
Şekil 10. A: HMW marker kit protein standartlarının dansitometrik analiz sonucu görüntüsü. 1. pik tiroglobulin, 2. pik ferritin. **B:** Lateks partiküllerinin dansitometrik analiz sonucu görüntüsü

Görüntülemelerde sıkıntı yaşanması nedeniyle Lateks yanında partikül çapı Lateks'e çok yakın olan FITC bağlı silika (çapı 34 nm) kullanılarak 3. standart doğrulandı. Bu standartın görüntülenmesi için 2000mm Kodak imaging sistem kullanıldı ve karanlık ortamda gerçekleştirilen elektroforez sonrası boyamaya geçmeden önce Ex: 465nm, Em: 535nm dalga boylarında floresans görüntüleme yapıldı (Şekil 11).



Şekil 11. Solda FITC'ye bağlı silikanın fluorimetrik görüntüsü. Sağda ise dansitometrik analiz örneği.

Dansitometrik analiz sonrasında standartların ölçülen R_f değerleri ve partikül çapları kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi (şekil 12). Örneklerin R_f değerleri grafiğe yerleştirilerek grafik denkleminde partikül çapları hesaplandı. Partikül çapı 25.5 nm'den büyük olanlar bhLDL, küçük olanlar ise kyLDL olarak kabul edildi.



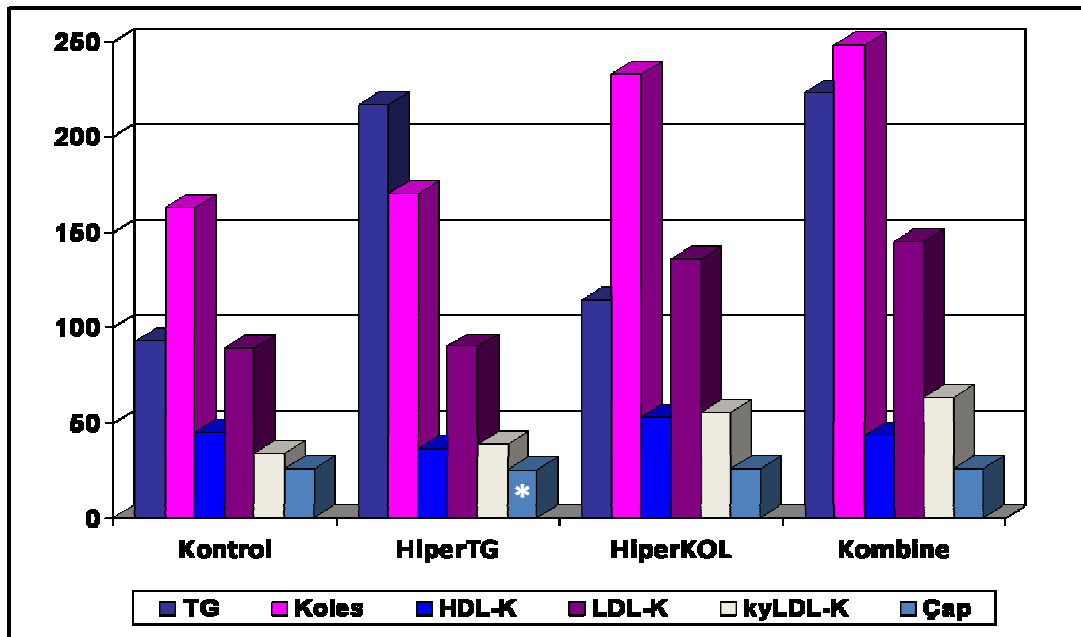
Şekil 12. Standartların partikül çapları ve R_f değerleriyle oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Örneklerin toplanması sırasında alınan TG, TK ve LDL-K değerleri, heparin-magnezyum çöktürmesi sonrasında süpernatantta ölçülen kyLDL kolesterol içeriği (kyLDL-K) ve toplam değerden çıkarılarak bulunan bhLDL kolesterol konsantrasyonu (bhLDL-K), elektroforetik ayırım ile hesaplanan partikül çapı değerlerinin gruplara göre dağılımı Tablo 4 ve Grafik 1’de gösterilmiştir. Tabloda sonuçlar ortama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Tablo 4. Sonuçların gruplara göre dağılımı

Gruplar	n	TG (mg/dL)	TK (mg/dL)	HDL-K (mg/dL)	LDL-K (mg/dL)	kyLDL-K (mg/dL)	bhLDL-K (mg/dL)	Çap (nm)
Grup 1 Kontrol grubu	54	92.70 ± 28.58	163.11 ± 29.62	44.98 ± 11.09	88.96 ± 25.80	33.81 ± 12.39	55.15 ± 15.90	25.95 ± 0.79
Grup 2 Hipertrigliseridemi	50	216.84 ± 79.79	170.30 ± 19.79	35.72 ± 7.75	90.22 ± 19.97	39.42 ± 9.02	50.80 ± 12.29	25.16 ± 0.72
Grup 3 Hiperkolesterolemi	52	113.52 ± 29.26	233.06 ± 31.76	52.69 ± 11.50	136.31 ± 32.14	54.50 ± 13.75	81.81 ± 22.10	26.07 ± 0.82
Grup 4 Kombine Hiperlipidemi	52	222.60 ± 86.89	247.81 ± 34.43	43.27 ± 8.52	145.00 ± 31.20	63.06 ± 14.94	81.94 ± 18.27	25.74 ± 0.79
Toplam	208	160.22 ± 85.30	203.50 ± 47.57	44.43 ± 11.50	115.11 ± 37.74	47.64 ± 17.26	67.47 ± 22.67	25.74 ± 0.85

Grafik 1. Lipid panelinin gruplara göre dağılımının karşılaştırılması



* <25.5 nm; 2-1; 2-3; 2-4 p<0.05

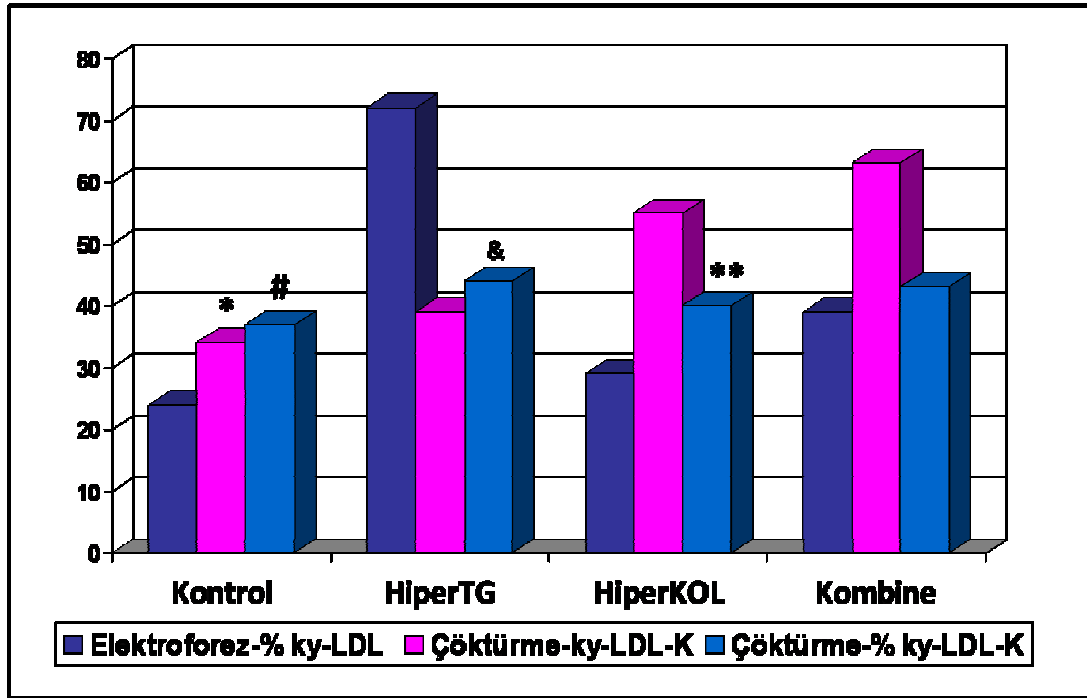
Gruplardaki total kolesterol ve trigliserid konsantrasyonlarının ortalamaları one-way ANOVA testi ile karşılaştırıldı. TG düzeylerinde, 1. – 2. ve 1. - 4. grup; 2. ve 3. grup; 3. ve 4. grup arasında anlamlı fark saptandı. Total kolesterol düzeylerinde ise, 1. - 3. ile 1. - 4. grup; 2. - 3. ile 2. - 4. grup arasında anlamlı fark olduğu bulundu. Ayrıca; kyLDL-K açısından 1-2, 1-3, 1-4, 2-3, 2-4, 3-4. gruplar ($p<0.05$) arasında; çap açısından 1-2, 2-3, 2-4, 3-4. gruplar arasında ($p<0.05$) anlamlı fark bulunurken 1-3, 1-4. gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi.

Tablo 5 ve Grafik 2'de deney gruplarında elektroforetik ayırım sonucu kyLDL (patern B) ve bhLDL taşıyan hasta sayıları ve yüzde oranları; ayrıca çöktürme ile bulunan alt grupların kolesterol düzeylerinin yüzdeleri gösterilmiştir. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlara göre, kyLDL oranı tüm hiperlipidemik gruplarda kontrol grubuna göre daha yüksektir; ancak bu oran en yüksek hipertrigliseridemi grubunda saptanmıştır.

Tablo 5. Deney gruplarındaki LDL alt gruplarının dağılımı

Gruplar	n	Elektroforez yöntemi		Çöktürme yöntemi	
		Kişi sayısı (yüzde oranı)		%kyLDL-K	%bhLDL-K
		kyLDL (% kyLDL)	bhLDL(%bhLDL)		
1. grup	54	13 (24.1)	41 (75.9)	37.3	62,7
2. grup	50	36 (72.0)	14 (28.0)	43.7	56,3
3. grup	52	15 (28.9)	37 (71.2)	40.3	59,7
4. grup	52	20 (38.5)	32 (61.5)	43.4	56,6

Grafik 2. Deney gruplarındaki LDL alt gruplarının dağılımının karşılaştırılması



* Tüm gruplar arası $p < 0.01$

& 2-3 $p < 0.001$

1-2; 1-3; 1-4 $p < 0.05$

** 3-4 $p < 0.005$

Grafik 2'de; sonuçların anlamlılığı t testi ile değerlendirildiğinde, 2-4 dışındaki tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmektedir ($p < 0.05$).

Farklı lipid parametrelerine sahip 4 grup ile LDL alt grupları arasında yapılan ki-kare testi sonucunda, $p = 0.00$ anlamlılık düzeyinde, plazma lipid fenotipi ile LDL alt gruplarının dağılımı arasında sistematik bir ilişki olduğu saptandı.

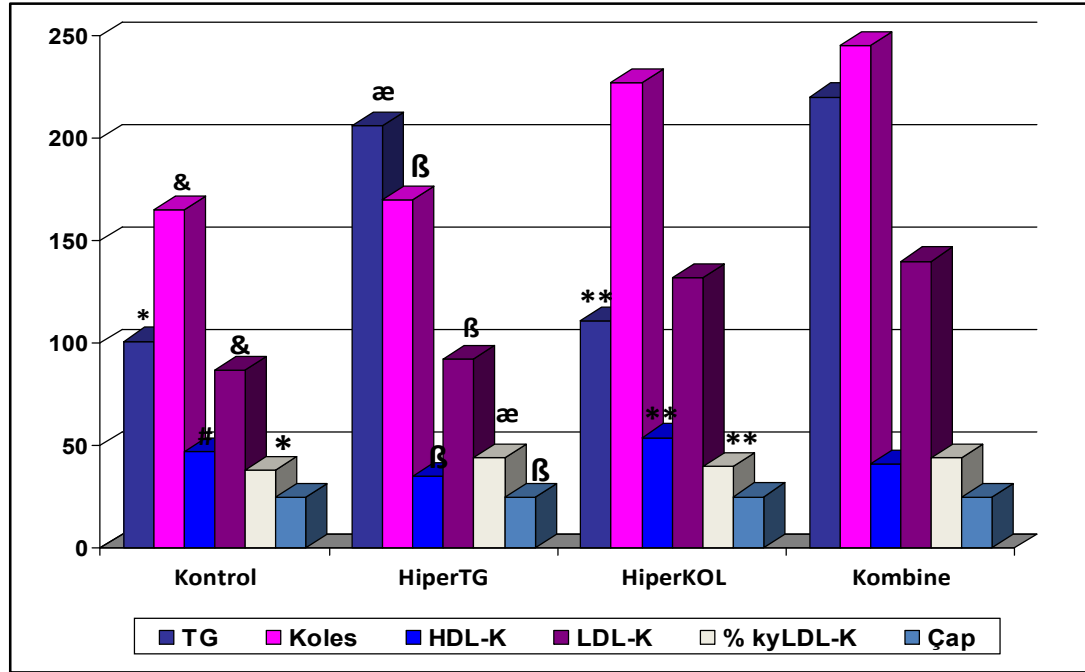
Gruplar kendi içlerinde A ve B paternine sahip olgulara göre sınıflandırıldı ve gruplar arası t testi yapıldı. Analiz sonucunda, hiçbir grubun kendi paternleri arasındaki (A ve B) parametrelerin hiçbirinde anlamlı bir fark saptanmadı (Tablo 6).

Tablo 6. Grupların paternlerine göre lipid panellerinin dağılımı

		n	TG	TK	LDL-K	HDL- K	Partikül çapı	kyLDL-K yüzdesi	bhLDL-K yüzdesi
1. grup	Patern A	41	89.98 ±26.5	162.41 ±32.1	89.71 ±28.1	44.43 ±10.7	26.27 ±0.6	37.01 ±7.7	62.99 ±7.7
	Patern B	13	101,31 ±34,2	165,31 ±20,6	86.62 ±17.1	46.69 ±12.4	24.96 ±0.34	38.20 ±7.9	61.81 ±7.9
2. grup	Patern A	14	244.0 ±120.4	170.50 ±14.5	84.57 ±18.3	37.67 ±10.8	26.03 ±0.6	44.04 ±3.5	55.96 ±3.4
	Patern B	36	206.28 ±55.8	170.22 ±21.7	92.42 ±20.4	35.03 ±6.4	24.82 ±0.4	43.61 ±3.7	56.39 ±3.7
3. grup	Patern A	37	114.49 ±30.6	235.62 ±34.3	138.11 ±34.5	52.05 ±12.9	26.44 ±0.65	40.50 ±5.1	59.50 ±5.1
	Patern B	15	111.13 ±26.4	226.73 ±24.2	131.87 ±26.0	54.27 ±7.2	25.15 ±0.3	39.68 ±7.3	60.32 ±7.2
4. grup	Patern A	32	224.37 ±87.9	249.72 ±35.5	148.31 ±33.6	44.59 ±8.1	26.19 ±0.6	42.75 ±5.3	57.25 ±5.3
	Patern B	20	219.75 ±87.4	244.75 ±33.3	139.70 ±26.9	41.15 ±8.6	25.03 ±0.38	44.44 ±2.86	55.57 ±2.9

Çalışma grupların B paternlerinin birbiri ile karşılaştırılmasında, TG, TK, HDL-K, LDL-K, %kyLDL-K parametrelerinin ve partikül çapının anlamlılığı da yine t testi ile değerlendirildi (Grafik 3).

Grafik 3. Gruplar arası B paternlerinin karşılaştırılması



* 1-2, 3-4 & 1-3, 1-4 # 1-2
æ 2-3 ß 2-3, 2-4 ** 2-4

1. ve 2. grubun B paternlerinde, TG, HDL-K, %kyLDL-K açısından anlamlı fark olduğu saptanırken; TK ve LDL-K ve partikül çapı açısından fark bulunmadı.

1. ve 3. gruplar arasında, TK ve LDL-K açısından anlamlı fark görülmesine rağmen; TG, HDL-K, %kyLDL-K ve partikül çapı açısından anlamlı fark saptanmadı.

1. ve 4. gruplarda HDL-K ile partikül çapı dışındakilerin tümü,

2. ve 3. gruplarda ise tüm parametrelerde anlamlı fark olduğu saptandı.

2. ve 4. gruplar arasında TG ve %kyLDL-K dışındaki tüm lipid parametreleri;

3. ve 4. gruplarda ise TG, HDL-K, %kyLDL-K açısından anlamlıyken; TK, LDL-K ve partikül çapı arasında bir fark bulunmadı.

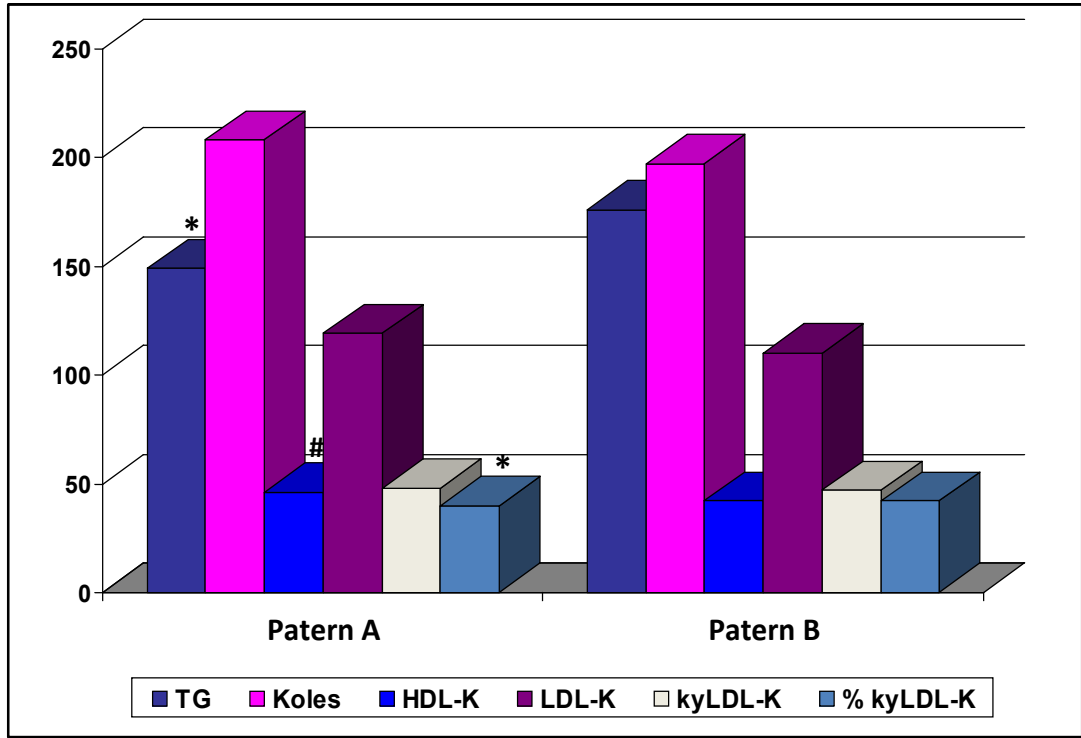
Veriler, grupların ayrımı yapılmadan patern A ve B fenotipine sahip hastalara göre gruplandırıldığında elde edilen sonuçlar Tablo 7'da özetlenmiştir. Sonuçlar ortama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Tablo 7. LDL alt grupları arasındaki ortalama değerlerin karşılaştırılması

	n	Çap (nm)	TG (mg/dL)	TK (mg/dL)	HDL-K (mg/dL)	LDL-K (mg/dL)	kyLDL-K (mg/dL)	bhLDL-K (mg/dL)	%kyLDL-K (%)
Patern A (bhLDL)	124	26.27 ± 0.63	149.36 ± 89.49	207.70 ± 50.56	46.13 ± 11.60	118.69 ± 40.98	48.35 ± 18.58	70.35 ± 24.55	40.33 ± 6.52
Patern B (kyLDL)	84	24.95 ± 0.39	176.25 ± 76.43	197.30 ± 42.30	41.89 ± 10.90	109.82 ± 31.88	46.61 ± 15.15	63.21 ± 18.92	42.26 ± 5.64

İki grupta çap, TG ($p=0.025$), HDL-K ($p=0.09$), düzeylerinin ve %kyLDL-K ($p=0.027$) ortalamaları Student t test ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanırken, TK, LDL-K, kyLDL-K düzeyleri arasında fark gözlenmedi (Grafik 4).

Grafik 4. Patern A ve B gruplarının karşılaştırılması

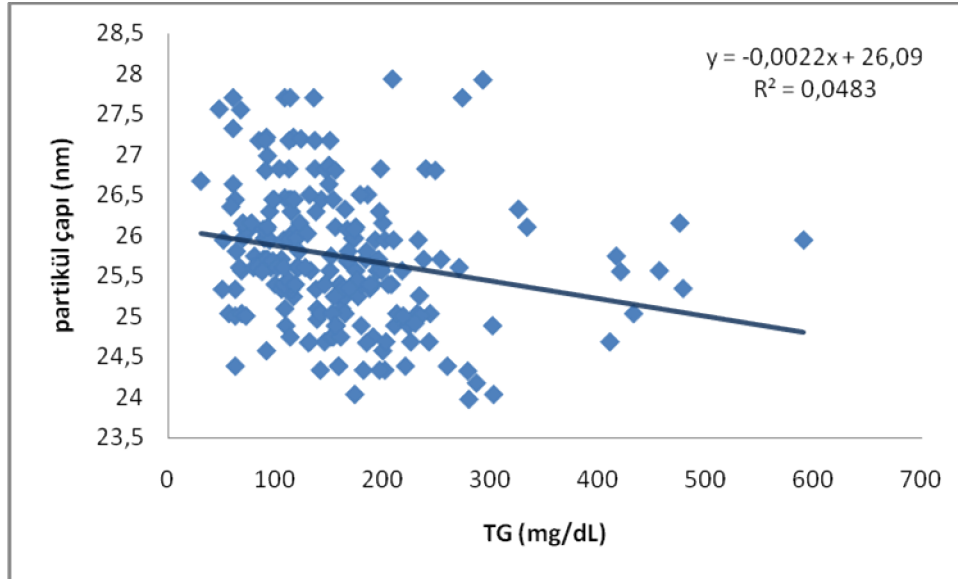


* $p < 0.05$, # $p < 0.01$

Veriler yine grup ayırımı yapılmaksızın cinsiyete göre değerlendirildiğinde, kadınlar ve erkekler arasında partikül çapı, kyLDL-K ve %kyLDL-K değerleri açısından anlamlı fark bulunmadı. Ancak beklenildiği gibi TK ve HDL-K düzeyleri açısından fark saptandı (sırası ile $p=0.011$ ve $p=0.001$).

Korelasyon analizlerinde, LDL partikül çapı ile negatif yönde ve anlamlı korelasyonu olan tek parametre trigliserid düzeyi olarak bulundu ($p=0.01$). Yani TG düzeyi yükseldikçe partikül çapının küçüldüğü saptandı.

Regresyon analizi sonucunda $y = -0.0022x + 26.09$, $R^2 = 0.0483$ olarak bulundu (Şekil 13).



Şekil 13. Korelasyon analizi

Partikül çapının TG ile negatif korelasyonu varken TK ($p=0.05$), HDL-K ($p=0.01$) ve bhLDL-K ($p=0.05$) ile de anlamlı pozitif korelasyonu olduğu saptandı.

Ayrıca, standart lipid parametreleri (TG, TK, LDL-K ve HDL-K) ile LDL alt grupları ile ilgili parametreler (kyLDL-K, bhLDL-K, %kyLDL-K ve partikül çapı) arasında korelasyon analizleri yapıldı. Bu analizler sonucunda;

TK ile kyLDL-K ($r=0.757$), bhLDL-K ($r=0.733$) ve %kyLDL-K ($r=0.196$) arasında anlamlı pozitif korelasyon ($p=0.01$); LDL-K ile aynı parametreler arasında da yine pozitif korelasyon saptandı (aynı sıra ile $r=0.928$, $r=0.959$, $r=0.146$).

TG ile partikül çapı arasında negatif ($p=0.00$, $r=-0.220$), kyLDL-K ve %kyLDL-K arasında ise pozitif korelasyon (sırası ile $p=0.03$, $r=0.148$; $p=0.00$, $r=-0.356$) bulundu.

HDL-K ile kyLDL-K arasında korelasyon saptanmaz iken; HDL-K ile partikül çapı ($p=0.01$, $r=0.275$) ve bhLDL-K arasında pozitif ($p=0.01$, $r=0.194$); %kyLDL-K arasında ise negatif ($p=0.01$, $r=-0.186$) korelasyon bulundu.

Son olarak, kyLDL-K ile TG ($r=0.148$), TK ($r=0.757$) ve LDL-K ($r=0.928$) arasında pozitif korelasyonun olduğu saptandı. %kyLDL-K ile aynı parametreler arasında yine pozitif korelasyon görüldü (sıra ile $r=0.356$, $r=0.196$, $r=0.140$). Ancak sadece %kyLDL-K'ün HDL-K düzeyleri ile anlamlı ve negatif korelasyon bulundu ($r=-0.186$).

BEŞİNCİ BÖLÜM

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Aterom ve ateroskleroz terimleri, Yunancada lapa+kitle+katı anlamına gelen 'athere'+ 'oma'+ 'skleros' sözcüklerinden türetilmişlerdir. Ateroskleroz, endotel disfonksiyonu, inflamasyon, vasküler proliferasyon ve matriks değişimini içeren çok yönlü kompleks bir süreçtir.⁸⁷ Aortadan koroner arterlere kadar değişen büyüklükte sistemik arterleri etkileyebilir. Özellikle kalp, beyin muskuler arterlerinde meydana geldiğinde kalp krizi ve felç gibi ölümcül klinik sonuçlara neden olabilir. Günümüzde gelişmiş toplumlarda meydana gelen ölümlerin %50'sinin nedeni, ateroskleroz ve ona bağlı olarak gelişen kardiyovasküler komplikasyonlar olarak görülmektedir.⁸⁸ Bu nedenle aterosklerozun patogenezinin anlaşılması, hem hastalığın ilerleyişinin yavaşlatılması hem de daha etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Hem olgu-kontrol çalışmaları, hem de prospektif incelemeler, plazma kolesterol konsantrasyonunun KKH ile korele olduğunu göstermektedir. Total kolesterol ve KKH arasındaki korelasyon, hemen hemen tümüyle plazma LDL konsantrasyonu ile KKH arasındaki korelasyondan ileri gelir. Bu korelasyon orta yaş sonrasında da sürer ve hem erkek hem de kadınlarda görülür.⁸⁹ Bir risk faktörü olarak hipertrigliserideminin rolü önceden hiperkolesteroleminin rolünden daha tartışmalıydı. Ancak, Stockholm Prospektif Çalışması⁹⁰ ve Hammersmith Hastanesi Olgu-Kontrol Çalışması⁹¹ sonuçlarından sonra hipertrigliseridemi bağımsız bir risk faktörü olarak kabul edilmiştir.

LDL-K'ü KKH, metabolik sendrom ve ateroskleroz ile ilişkilendirilmektedir. Ancak, uzun süredir kolesterol ölçümünün yararları üzerine yapılan çalışmalar, bu parametrelerin hastanın kardiyak olaylarındaki riski belirlemede tek başına fayda sağlayamayacağını göstermektedir. 1998 yılında, kolesterol ve KKH üzerine yapılan bir çalışmada miyokard infarktüs geçiren hastaların %75 inde normal HDL-K ve LDL-K düzeyleri saptanmıştır.⁹² Sonuç olarak bu yetersizlikler durumun yeniden gözden geçirilmesine ve risk faktörlerinin ölçümünde ilave çalışmaların yapılmasına yol açmıştır.

Yakın zamandaki araştırmalar ise tüm LDL taneciklerinin aynı yapıda olmadıklarını ortaya koymaktadır. Benzer LDL-K düzeylerine sahip iki hastada, birini

diğerine göre daha fazla KKH riski altına sokabilecek farklılıkta LDL tanecikleri bulunabilir. Bu taneciklerin konsantrasyonları ve büyüklükleri geleneksel lipid panelinden daha iyi risk göstergelerdir.⁹³

Bu nedenle LDL alt gruplarının ölçümünün yapılabileceği çeşitli yöntemler tanımlanmıştır. Bunlar arasında en sık kullanılanlar ultrasantrifugasyon, gradient jel elektroforezi ve son yıllarda Hirano ve ark. tarafından tanımlanmış çöktürme ile kyLDL-K konsantrasyonunun ölçülmesidir.

Bu çalışmada, farklı hiperlipidemili gruplarda LDL-K yanı sıra LDL'nin alt grupları, partikül boyutuna bağlı olarak elektroforez ile belirlenmiş; partikülün kolesterol konsantrasyonu ise basit çöktürme yöntemi ile kantite edilmiştir. Elde edilen sonuçlar hastaların lipid paneli ile karşılaştırılarak bu gruplarda LDL alt gruplarının dağılımı gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan yöntemlerden biri olan gradient jel elektroforezi, LDL ve HDL alt gruplarının araştırılmasında kullanılabilir ve doğru bir yöntemdir. GGE analizlerinde serum örneklerinin direkt kullanılabilmesi ise yöntemi basit hale getirmiştir. Yapılmış çalışmalarda, örnek olarak izole edilmiş LDL ve herhangi bir işlem görmemiş serumun kullanıldığı elektroforetik ayrımlarda birbiriyle oldukça yakın sonuçlar bulunmuştur.⁹⁴ GGE için gerekli ekipman her laboratuvarında bulunabilecek niteliktedir. Kullanılan örnek miktarı da sadece 10–15 µL'dir. Herhangi bir ön ayırma işlemine gerek olmadan serum örnekleri direkt olarak uygulanabilmektedir. Ancak yöntemin bazı dezavantajları da vardır. Örneğin; oldukça el oyalayıcıdır. Özellikle aplikasyon ve jel boyama aşamaları zahmetlidir ve deneyim gerektirmektedir. Elektroforez süresi 24 saattir ve özellikle hasta örneklerinin boyanması da bir o kadar sürmektedir. Bu nedenler ile rutinde ve çok sayıda hasta örneğinin çalışılması için uygun bir yöntem değildir. Elektroforez sonuçları, protein standartları kullanılarak partikül çapının saptanması ile ön planda olan LDL alt grubunun belirlenmesi, yani patern A veya patern B olarak ifade edilir. Bu yöntem, hastadaki temel LDL alt grubunun belirlenmesi, dolayısı ile KKH riskinin belirlenmesi açısından avantajlıdır, ancak bir kantitasyona gitmek mümkün değildir.

Çalışmamızda kullanılan diğer yöntem ise kyLDL-K konsantrasyonunun ölçümünü sağlayan çöktürme yöntemidir. Hirano ve ark. bir çalışmada, heparin-magnezyum reaktifinin diğer Apo B içeren lipoproteinleri çöktürürken LDL'nin en

yoğun olan fraksiyonunu süpernatantta bıraktığını bulmuşlardır. Dekstran sülfat-Mg, heparin-Mn, fosfotungstat-Ca gibi farklı divalent katyonlar kullanarak denedikleri çöktürme yöntemini, ultrasantrifügasyon ile karşılaştırmış ve en iyi korelasyonu heparin-Mg'da saptadıkları için çöktürme reaktifi olarak bunu seçmişlerdir. Bu yöntemle ölçülen kyLDL-K düzeyleri ile GGE'de saptanan partikül çapı ve ultrasantrifügasyon ile ayırma sonrası ölçülen kyLDL Apo B içeriği arasında anlamlı korelasyon olduğunu saptamışlardır.⁸¹ Yöntem her laboratuvarda uygulanabilecek kadar kolaydır ve çalışma süresi 1-1.5 saattir. Hiçbir sofistike laboratuvar ekipmanına gerek duymamaktadır. Serum direkt olarak kullanılmakta ve 100 µL yeterli olmaktadır. Aynı anda çok sayıda hasta örneğinin çalışılması mümkündür. Ayrıca LDL-kolesterol ölçüm basamağı da analizörde ölçülerek otomatize edilebilir. Ancak yöntem henüz tam standardize edilmemiştir. Bazı durumlarda çöktürme işlemi sonrası berrak bir süpernatant elde etmek mümkün olmamaktadır. Yeni geliştirilmiş bir yöntem olduğundan henüz tanımlanmış referans değerleri veya eşik değerleri yoktur. Bu nedenle araştırmalarda gruplar arası karşılaştırmalarda uygun olmasına rağmen rutin hasta örneklerinin ölçümü için uygun değildir.

Yapılan birçok çalışmada, LDL alt grupları dağılımının bilinmesinin koroner kalp hastalığı riskinin önceden belirlenmesinde yararlı olup olmayacağı sorusuna yanıt aranmıştır. Bu bağlamda, üzerinde durulması gereken birbiri ile ilişkili iki nokta vardır. Bunların birincisi, küçük yoğun LDL'nin bağıl miktarı (total LDL'ye olan oranı) mı yoksa mutlak değerinin mi, riskin belirlenmesinde en önemli olduğu sorusudur. İkinci nokta ise, bu değişkenlerin, artmış plazma TG ya da düşük HDL düzeyleri gibi diğer aterojenik lipoprotein fenotipi bileşenlerinden istatistiksel olarak bağımsız bir şekilde risk belirleyici olup olmadıkları sorusudur. Quebec Kardiyovasküler Çalışması'nın bulguları,⁹⁵ erkeklerde, özellikle ilk 7 yıllık izlem süresi içinde, küçük yoğun LDL (LDL çapı <25.5 nm) düzeylerindeki artışın iskemik kalp hastalığı riski ile güçlü bir ilişkisi olduğunu doğrulamıştır. Partikül çapı 26.0 nm ve daha büyük olan büyük hafif LDL ile iskemik kalp hastalığı riski arasındaki ilişki ise zayıf bulunmuştur.

kyLDL'nin klinik önemi ile ilgili daha ileri kanıtlar, lipid düşürücü ilaç tedavisinin KVH ilerlemesine etkilerini değerlendiren klinik denemelerle gösterilmektedir. Miller ve arkadaşları, kyLDL'nin baskın olduğu grup ile kontrol grubunda LDL-K düşmesine rağmen, sadece kyLDL alt grubunun baskın olduğu deney grubunda lipid-düşürücü

tedavinin koroner stenoz bulgularında azalmayı sağladığını göstermişlerdir.⁹⁶ Bunun yanında Zambon ve arkadaşları, ailesel ateroskleroz öyküsü olan ve yüksek Apo B düzeyine sahip kişilerde, koroner arter stenozunun lipid-düşürücü ilaçlar ile baskılanmasının diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak LDL yoğunluğundaki değişimle ilişkili olduğunu bulmuşlardır.⁹⁷

Çalışmamızda tüm gruplar içinde kyLDL'nin baskın fenotip olduğu hasta sayısı en yüksek oranda (%72.0) hipertrigliseridemi grubunda saptanmıştır. Ayrıca bu grubun ortalama LDL partikül çapı da diğer gruplar ile karşılaştırıldığında en küçüktür ve kyLDL olarak kabul edilecek boyuttadır. Tüm hasta verileri değerlendirildiğinde plazma TG düzeyi ile LDL partikül çapı arasında da anlamlı bir negatif korelasyon saptanmıştır. Yani TG konsantrasyonu arttıkça LDL partiküllerinin çapı küçülmektedir. TG konsantrasyonunun ayrıca kyLDL-K ve %kyLDL-K parametreleri ile de pozitif korelasyonu vardır. Bu bulgular da plazmadaki TG konsantrasyonu artışının, LDL alt gruplarında aterojenik kyLDL artışına neden olduğunu desteklemektedir. Ayrıca TG ile HDL-K arasındaki anlamlı negatif korelasyon da tanımlanmış aterojenik lipoprotein fenotipi ile tamamen uyumludur.

Kontrol grubundaki temel LDL alt grubu ise bhLDL olarak saptanmıştır. Bu grupta en az sayıda kyLDL fenotipi baskın hasta vardır ve grubun ortalama partikül çapı da bhLDL olarak kabul edilecek boyuttadır. Hiperkolesterolemi ve kombine hiperlipidemi gruplarında da kontrol grubundakine benzer şekilde patern A fenotipi ön plandadır. Partikül çapı ilginç olarak hiperkolesterolemi grubunda tüm gruplar arasında en büyüktür. Kombine hiperlipidemi grubunda da ortalama partikül çapı kontrol grubundan küçük olmasına rağmen bhLDL olarak değerlendirilecek boyuttadır. KKH ile LDL-K arasındaki güçlü ilişki birçok klinik çalışmada gösterilmiş ve NCEP-ATP III'de de LDL-K tedavide temel hedef olarak belirtilmiştir.⁹ Buna rağmen hiperkolesterolemi ve kombine hiperlipidemi gruplarında kyLDL miktarı hipertrigliseridemi grubuna göre düşüktür. Hatta hiperkolesterolemi grubunda miktar kontrol grubuna benzerdir. Bu da kyLDL'nin diğer lipid parametrelerinden bağımsız bir risk faktörü olduğunu desteklemektedir. Koba ve ark. kyLDL ile erken yaşta KKH geçirme riski arasındaki ilişkinin, HDL kolesterol ve TG gibi faktörlerden, lipid dışı risk faktörlerinden ve Apo B düzeylerinden bağımsız olduğunu belirtmişlerdir.⁹⁸

Çöktürme yöntemi ile en düşük kyLDL-K düzeyi kontrol grubunda saptanmıştır (33.81 mg/dL). Bu düzey LDL-K'ün % 37.3'ünü oluşturmaktadır. Bu hem konsantrasyon hem de % oran olarak tüm diğer gruplardan anlamlı olarak düşüktür. Hiperlipidemi gruplarında kyLDL-K, konsantrasyon olarak ele alındığında ilginç olarak en düşük hipertrigliseridemi grubunda en yüksek olarak da kombine hiperlipidemi grubunda saptanmıştır. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak da anlamlıdır. Oysa bu sonuçlar GGE elektroforezi ile elde edilen sonuçlar ile çelişkilidir. Çünkü partikül boyutuna göre dağılımda en yüksek miktar hipertrigliseridemi grubunda saptanmıştır. Ancak kyLDL-K sonuçları, plazma LDL-K konsantrasyonunun %'si olarak ele alındığında, gradient jel elektroforezi sonuçlarıyla uyumlu olarak en yüksek yüzde değeri, hipertrigliseridemik grupta saptanmaktadır. Hiperkolesterolemide düşük, kombine hiperlipidemide ise hipertrigliseridemi ile çok benzer yüzde değeri olduğunu görülmektedir. Bu bulgular da plazma kyLDL miktarının plazma TG düzeyi ile ilişkili olduğunu desteklemektedir. Bu yöntem kullanılarak yapılmış pek araştırma yoktur. Yöntemi geliştiren Hirano ve ark.nın farklı hiperlipidemi gruplarında yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar elde edilmiştir.⁹⁹ Farklı olarak araştırmacılar kontrol grubu ve plazma LDL-K düzeyi yüksek olan hastalarda daha düşük sonuçlar elde etmişlerdir. Sonuç olarak, çöktürme yöntemi ile elde edilen sonuçların doğru bir şekilde değerlendirilebilmesi için ölçülen konsantrasyon değerleri yerine total LDL'ye oranlayarak yüzde değerlerinin dikkate alınması daha doğru olacaktır.

Çalışmamızda ki-kare testi sonucunda plazma lipid fenotipi ile LDL alt gruplarının dağılımı arasında sistematik bir ilişki olduğu saptanmıştır. Yüksek TG değerlerine sahip olan hastalarda genellikle kyLDL partikülleri bulunurken (patern B fenotipi) normal konsantrasyonda TG'i olan kişilerde büyük LDL partikülleri baskındır (patern A fenotipi). Bu nedenle fenotipi ne olursa olsun hiperlipidemi olgularında KKH riskini azaltmak için uygun tedavi modaliteleri ile dislipideminin düzeltilmesi uygun olacaktır.

Tüm olgular A ve B paternleri olarak ele alınarak lipid parametrelerine göre karşılaştırıldığında TG, HDL-K ve %kyLDL-K açısından aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır. B paterninde TG düzeyi yüksek, HDL-K düzeyi düşük, %kyLDL-K oranı ise yüksektir. Bu sonuçlar da tipik aterojenik dislipidemi

fenotipini göstermekte ve yine plazma TG düzeyinin LDL alt grupları açısından önemli belirleyici faktör olduğunu ortaya koymaktadır LDL'nin bu iki alt grubundaki lipid içeriğinin TK ve LDL-K açısından ise birbirinden anlamlı ölçüde farklı olmadığı görülmektedir. Çocuklar¹⁰⁰ ve erişkinler⁶⁶ ile yapılan çalışmalarda da benzer bulgular elde edilmiş ve bu sonuçların çevresel faktörler sonucu olduğu öne sürülmüştür.¹⁰⁰

Aynı çalışma grubundaki A ve B paternine sahip hastalar lipid parametreleri açısından karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlar, lipid kompozisyonunun önemini vurgulamaktadır. Partikül çapının temel belirleyicisi plazma lipid kompozisyonu olarak görülmektedir.

B paternleri gruplar arasında karşılaştırıldığında, genel olarak hiperlipidemili gruplarda kontrol grubuna göre LDL-K ve kyLDL-K değerleri artış gösterirken, HDL-K değerleri azalmaktadır. Bu sonuçlar, kontrol grubunun dışında 2. 3. ve 4. gruplar arasında da gözlenmektedir. Ayrıca çarpıcı olarak sadece B paternine sahip olgular ele alındığından, tüm olgularda partikül çapı 25.5 nm'den küçük olmasına rağmen hipetrigliseridemi grubu en küçük çapa sahiptir ve hem hiperkolesterolemi hem de kombine hiperlipidemi grupları ile arasında partikül çapı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. Benzer şekilde TG düzeyi yüksek olan 2. ve 4. gruplarda, TG düzeyi yüksek olmayan kontrol ile hiperkolesterolemi gruplarına göre %kyLDL-K oranları daha yüksektir. Bu bulgular da plazma LDL alt gruplarının kompozisyonunda temel belirleyici faktörün, plazma TK ve LDL-K'den ziyade TG düzeyi olduğunu desteklemektedir.

Korelasyon analizleri ile plazma lipid parametreleri ile LDL alt gruplarının kompozisyonu arasındaki ilişki araştırıldığında; plazma TK ve LDL-K artışının kyLDL-K, bhLDL-K düzeylerini arttırdığı, bununla birlikte %kyLDL-K oranında da artışa neden olduğu görüldü. Her ne kadar hiperkolesterolemi grubunda patern A fenotipinin baskın olduğu görülse de kolesterol düzeyindeki artışın görece olarak LDL partikül sayısında artışa neden olduğu ve dolayısı ile kyLDL miktarının da artması ile sonuçlandığı düşünülmüştür. Plazma HDL-K düzeyi ile bhLDL-K ve partikül çapı arasında pozitif ve %kyLDL-K oranındaki negatif yöndeki ilişki HDL'nin antiaterojenik niteliklerine LDL alt grup kompozisyonu açısından da bir ek getirmektedir. Yukarıda da kısmen bahsedildiği gibi plazma TG konsantrasyonundaki artış ise kyLDL-K konsantrasyonunda ve %kyLDL-K oranında artış, LDL partikül çapında ise küçülme

ile birlikte. Ayrıca HDL-K konsantrasyonu da TG düzeyi ile ters ilişkilidir. Tüm bu sonuçlar “aterojenik lipoprotein fenotipi” olarak isimlendirilen, kyLDL'nin düşük HDL-K ve yüksek TG ile birlikte bulunması tanımlamasına uygun düşmektedir.

Grup ayrımı yapılmaksızın tüm sonuçlara bakıldığında; kadınlar ve erkekler arasında partikül çapı ve %kyLDL-K değerleri açısından anlamlı fark bulunmadı. Gerek A ve B paternleri arasında HDL-K açısından B paterninde düşüklük, gerekse de TG düzeyi ile HDL-K arasında negatif korelasyon saptanmasına ve cinsiyete göre değerlendirmede de HDL-K'ün beklendiği gibi kadınlarda anlamlı olarak yüksek bulunmasına rağmen, kadınlardaki bu HDL-K yüksekliğinin LDL alt grupları ile ilgili parametrelerde herhangi bir değişikliğe neden olmadığı görüldü. Her ne kadar yapılan çalışmalar genetik ve çevresel faktörlerin LDL alt grubu dağılımını etkilediğini önerse de çalışmamız cinsiyetin alt grupların dağılımı üzerine etkisi bulunmadığını ve HDL-K'ün tek başına bu dağılımda belirleyici olmadığını göstermektedir.⁶

Sonuç olarak; hiperlipidemili hastalarda LDL'nin daha aterosjenik olduğu bilinen kyLDL alt grubu baskın olarak bulunmaktadır. Aterosjenik lipoprotein fenotipinde de belirtildiği gibi kyLDL oranının artışı plazmadaki yüksek TG ve düşük HDL-K bulunmasıyla birlikte gelişmektedir.

ALTINCI BÖLÜM

6. KAYNAKLAR VE EKLER

1. Matsuura E, Kobayashi K, Tabuchi M, Lopez LR. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Prog Lipid Res.* 2006;45:466-486.
2. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:C7-12.
3. Ballantyne C, Arroll B, Shepherd J. Lipids and CVD management: towards a global consensus. *Eur Heart J.* 2005;26:2224-2231.
4. Rizzo M, Berneis K. Should we measure routinely the LDL peak particle size? *International Journal of Cardiology.* 2006;107:166-170.
5. Packard CJ, Shepherd J. Lipoprotein heterogeneity and apolipoprotein B metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3542-3556.
6. Berneis KK, Krauss RM. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *J Lipid Res.* 2002;43:1363-1379.
7. Austin MA, King MC, Vranizan KM, Krauss RM. Atherogenic lipoprotein phenotype. A proposed genetic marker for coronary heart disease risk. *Circulation.* 1990;82:495-506.
8. Rizzo M, Kotur-Stevuljevic J, Berneis K, Spinaz G, Rini GB, Jelic-Ivanovic Z, Spasojevic-Kalimanovska V, Vekic J. Atherogenic dyslipidemia and oxidative stress: a new look. *Transl Res.* 2009;153:217-223.
9. 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.
10. Sacks FM, Campos H. Clinical review 163: Cardiovascular endocrinology: Low-density lipoprotein size and cardiovascular disease: a reappraisal. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:4525-4532.
11. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000;407:233-241.
12. Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica.* 2003;88:212-218.

13. Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J*. 2004;25:1197-1207.
14. Roberts TM, Sturek M, Dixon JL, Hardin CD. Alterations in the oxidative metabolic profile in vascular smooth muscle from hyperlipidemic and diabetic swine. *Mol Cell Biochem*. 2001;217:99-106.
15. Hallgren B, Stenhagen S, Svanborg A, Svennerholm L. Gas chromatographic analysis of the fatty acid composition of the plasma lipids in normal and diabetic subjects. *J Clin Invest*. 1960;39:1424-1434.
16. Chan DC, Watts GF. Apolipoproteins as markers and managers of coronary risk. *QJM*. 2006;99:277-287.
17. Stary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J*. 1990;11 Suppl E:3-19.
18. 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.
19. Grundy SM. Role of low-density lipoproteins in atherogenesis and development of coronary heart disease. *Clin Chem*. 1995;41:139-146.
20. Yang CY, Chen SH, Gianturco SH, Bradley WA, Sparrow JT, Tanimura M, Li WH, Sparrow DA, DeLoof H, Rosseneu M, et al. Sequence, structure, receptor-binding domains and internal repeats of human apolipoprotein B-100. *Nature*. 1986;323:738-742.
21. Beisiegel U. Lipoprotein metabolism. *Eur Heart J*. 1998;19 Suppl A:A20-23.
22. Rajman I, Eacho PI, Chowienczyk PJ, Ritter JM. LDL particle size: an important drug target? *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48:125-133.
23. Marshall MD, Kales SN, Christiani DC, Goldman RH. Are reference intervals for carboxyhemoglobin appropriate? A survey of Boston area laboratories. *Clin Chem*. 1995;41:1434-1438.
24. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*. 1986;232:34-47.

25. Bilheimer DW, Goldstein JL, Grundy SM, Starzl TE, Brown MS. Liver transplantation to provide low-density-lipoprotein receptors and lower plasma cholesterol in a child with homozygous familial hypercholesterolemia. *N Engl J Med*. 1984;311:1658-1664.
26. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*. 1983;52:223-261.
27. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 1989;320:915-924.
28. Lindstedt KA, Kokkonen JO, Kovanen PT. Soluble heparin proteoglycans released from stimulated mast cells induce uptake of low density lipoproteins by macrophages via scavenger receptor-mediated phagocytosis. *J Lipid Res*. 1992;33:65-75.
29. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76:333-337.
30. Nichols AV, Krauss RM, Musliner TA. Nondenaturing polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol*. 1986;128:417-431.
31. Musliner TA, Krauss RM. Lipoprotein subspecies and risk of coronary disease. *Clin Chem*. 1988;34:B78-83.
32. Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*. 1988;260:1917-1921.
33. Griffin BA, Caslake MJ, Yip B, Tait GW, Packard CJ, Shepherd J. Rapid isolation of low density lipoprotein (LDL) subfractions from plasma by density gradient ultracentrifugation. *Atherosclerosis*. 1990;83:59-67.
34. Vega GL, Ma PT, Cater NB, Filipchuk N, Meguro S, Garcia-Garcia AB, Grundy SM. Effects of adding fenofibrate (200 mg/day) to simvastatin (10 mg/day) in patients with combined hyperlipidemia and metabolic syndrome. *Am J Cardiol*. 2003;91:956-960.

35. Ehnholm C, Mahley RW, Chappell DA, Weisgraber KH, Ludwig E, Witztum JL. Role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of beta-very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:5566-5570.
36. Barter PJ, Rajaram OV, Liang HQ, Rye KA. Relationship between the size and phospholipid content of low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1166:135-137.
37. Bjornheden T, Babyi A, Bondjers G, Wiklund O. Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system. *Atherosclerosis*. 1996;123:43-56.
38. Galeano NF, Al-Haideri M, Keyserman F, Rumsey SC, Deckelbaum RJ. Small dense low density lipoprotein has increased affinity for LDL receptor-independent cell surface binding sites: a potential mechanism for increased atherogenicity. *J Lipid Res*. 1998;39:1263-1273.
39. Camejo G, Lopez A, Lopez F, Quinones J. Interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. The role of charge and sialic acid content. *Atherosclerosis*. 1985;55:93-105.
40. Tribble DL, Rizzo M, Chait A, Lewis DM, Blanche PJ, Krauss RM. Enhanced oxidative susceptibility and reduced antioxidant content of metabolic precursors of small, dense low-density lipoproteins. *Am J Med*. 2001;110:103-110.
41. Tribble DL, Holl LG, Wood PD, Krauss RM. Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size. *Atherosclerosis*. 1992;93:189-199.
42. de Graaf J, Hak-Lemmers HL, Hectors MP, Demacker PN, Hendriks JC, Stalenhoef AF. Enhanced susceptibility to in vitro oxidation of the dense low density lipoprotein subfraction in healthy subjects. *Arterioscler Thromb*. 1991;11:298-306.
43. Krauss RM, Siri PW. Metabolic abnormalities: triglyceride and low-density lipoprotein. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2004;33:405-415.
44. Packard CJ, Shepherd J, Joerns S, Gotto AM, Jr., Taunton OD. Very low density and low density lipoprotein subfractions in type III and type IV

- hyperlipoproteinemia. Chemical and physical properties. *Biochim Biophys Acta*. 1979;572:269-282.
45. Sata T, Havel RJ, Jones AL. Characterization of subfractions of triglyceride-rich lipoproteins separated by gel chromatography from blood plasma of normolipemic and hyperlipemic humans. *J Lipid Res*. 1972;13:757-768.
 46. Kwiterovich PO, Jr. Clinical relevance of the biochemical, metabolic, and genetic factors that influence low-density lipoprotein heterogeneity. *Am J Cardiol*. 2002;90:30i-47i.
 47. Lund-Katz S, Laplaud PM, Phillips MC, Chapman MJ. Apolipoprotein B-100 conformation and particle surface charge in human LDL subspecies: implication for LDL receptor interaction. *Biochemistry*. 1998;37:12867-12874.
 48. Foster DM, Chait A, Albers JJ, Failor RA, Harris C, Brunzell JD. Evidence for kinetic heterogeneity among human low density lipoproteins. *Metabolism*. 1986;35:685-696.
 49. Shepherd J, Caslake MJ, Lorimer AR, Vallance BD, Packard CJ. Fenofibrate reduces low density lipoprotein catabolism in hypertriglyceridemic subjects. *Arteriosclerosis*. 1985;5:162-168.
 50. Marais AD. Therapeutic modulation of low-density lipoprotein size. *Curr Opin Lipidol*. 2000;11:597-602.
 51. Koba S, Hirano T, Murayama S, Kotani T, Tsunoda F, Iso Y, Ban Y, Kondo T, Suzuki H, Katagiri T. Small dense LDL phenotype is associated with postprandial increases of large VLDL and remnant-like particles in patients with acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*. 2003;170:131-140.
 52. Campos H, Genest JJ, Jr., Blijlevens E, McNamara JR, Jenner JL, Ordovas JM, Wilson PW, Schaefer EJ. Low density lipoprotein particle size and coronary artery disease. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:187-195.
 53. Campos H, Blijlevens E, McNamara JR, Ordovas JM, Posner BM, Wilson PW, Castelli WP, Schaefer EJ. LDL particle size distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb*. 1992;12:1410-1419.
 54. Rainwater DL, Almasy L, Blangero J, Cole SA, VandeBerg JL, MacCluer JW, Hixson JE. A genome search identifies major quantitative trait loci on human

- chromosomes 3 and 4 that influence cholesterol concentrations in small LDL particles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:777-783.
55. Austin MA, Brunzell JD, Fitch WL, Krauss RM. Inheritance of low density lipoprotein subclass patterns in familial combined hyperlipidemia. *Arteriosclerosis.* 1990;10:520-530.
 56. Teng B, Thompson GR, Sniderman AD, Forte TM, Krauss RM, Kwiterovich PO, Jr. Composition and distribution of low density lipoprotein fractions in hyperapobetalipoproteinemia, normolipidemia, and familial hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983;80:6662-6666.
 57. Genest J, Jr., Bard JM, Fruchart JC, Ordovas JM, Schaefer EJ. Familial hypoalphalipoproteinemia in premature coronary artery disease. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:1728-1737.
 58. Austin MA. Genetic epidemiology of low-density lipoprotein subclass phenotypes. *Ann Med.* 1992;24:477-481.
 59. Terry RB, Wood PD, Haskell WL, Stefanick ML, Krauss RM. Regional adiposity patterns in relation to lipids, lipoprotein cholesterol, and lipoprotein subfraction mass in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;68:191-199.
 60. Campos H, Sacks FM, Walsh BW, Schiff I, O'Hanesian MA, Krauss RM. Differential effects of estrogen on low-density lipoprotein subclasses in healthy postmenopausal women. *Metabolism.* 1993;42:1153-1158.
 61. de Graaf J, Swinkels DW, Demacker PN, de Haan AF, Stalenhoef AF. Differences in the low density lipoprotein subfraction profile between oral contraceptive users and controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76:197-202.
 62. Dreon DM, Fernstrom HA, Williams PT, Krauss RM. LDL subclass patterns and lipoprotein response to a low-fat, high-carbohydrate diet in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:707-714.
 63. Dreon DM, Fernstrom HA, Williams PT, Krauss RM. Reduced LDL particle size in children consuming a very-low-fat diet is related to parental LDL-subclass patterns. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1611-1616.
 64. Griffin BA, Freeman DJ, Tait GW, Thomson J, Caslake MJ, Packard CJ, Shepherd J. Role of plasma triglyceride in the regulation of plasma low density

- lipoprotein (LDL) subfractions: relative contribution of small, dense LDL to coronary heart disease risk. *Atherosclerosis*. 1994;106:241-253.
65. Krauss RM. Heterogeneity of plasma low-density lipoproteins and atherosclerosis risk. *Curr Opin Lipidol*. 1994;5:339-349.
 66. Maruyama C, Imamura K, Teramoto T. Assessment of LDL particle size by triglyceride/HDL-cholesterol ratio in non-diabetic, healthy subjects without prominent hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10:186-191.
 67. Hulthe J, Hulten LM, Fagerberg B. Low adipocyte-derived plasma protein adiponectin concentrations are associated with the metabolic syndrome and small dense low-density lipoprotein particles: atherosclerosis and insulin resistance study. *Metabolism*. 2003;52:1612-1614.
 68. O'Neal DN, Lewicki J, Ansari MZ, Matthews PG, Best JD. Lipid levels and peripheral vascular disease in diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis*. 1998;136:1-8.
 69. Rizzo M, Berneis K. Lipid triad or atherogenic lipoprotein phenotype: a role in cardiovascular prevention? *J Atheroscler Thromb*. 2005;12:237-239.
 70. Rainwater DL, Andres DW, Ford AL, Lowe F, Blanche PJ, Krauss RM. Production of polyacrylamide gradient gels for the electrophoretic resolution of lipoproteins. *J Lipid Res*. 1992;33:1876-1881.
 71. Plasma lipoproteins. Part A: Preparation, structure, and molecular biology. *Methods Enzymol*. 1986;128:1-992.
 72. Rainwater DL, Moore PH, Jr., Shelledy WR, Dyer TD, Slifer SH. Characterization of a composite gradient gel for the electrophoretic separation of lipoproteins. *J Lipid Res*. 1997;38:1261-1266.
 73. Tallis GA, Shephard MD, Whiting MJ. Lipoprotein profiling by high performance gel chromatography. *Clin Chim Acta*. 1994;228:171-179.
 74. Bachorik PS, Albers JJ. Precipitation methods for quantification of lipoproteins. *Methods Enzymol*. 1986;129:78-100.
 75. Schmitz G, Borgmann U, Assmann G. Analytical capillary isotachopheresis: a routine technique for the analysis of lipoproteins and lipoprotein subfractions in whole serum. *J Chromatogr*. 1985;320:253-262.

76. Otvos JD, Jeyarajah EJ, Bennett DW, Krauss RM. Development of a proton nuclear magnetic resonance spectroscopic method for determining plasma lipoprotein concentrations and subspecies distributions from a single, rapid measurement. *Clin Chem.* 1992;38:1632-1638.
77. Hoefner DM, Hodel SD, O'Brien JF, Branum EL, Sun D, Meissner I, McConnell JP. Development of a rapid, quantitative method for LDL subfractionation with use of the Quantimetrix Lipoprint LDL System. *Clin Chem.* 2001;47:266-274.
78. Chapman MJ, Laplaud PM, Luc G, Forgez P, Bruckert E, Goulinet S, Lagrange D. Further resolution of the low density lipoprotein spectrum in normal human plasma: physicochemical characteristics of discrete subspecies separated by density gradient ultracentrifugation. *J Lipid Res.* 1988;29:442-458.
79. Davies IG, Graham JM, Griffin BA. Rapid separation of LDL subclasses by iodixanol gradient ultracentrifugation. *Clin Chem.* 2003;49:1865-1872.
80. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular risk assessment. *QJM.* 2006;99:1-14.
81. Hirano T, Ito Y, Saegusa H, Yoshino G. A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. *J Lipid Res.* 2003;44:2193-2201.
82. Rodbard D, Kapadia G, Chrambach A. Pore gradient electrophoresis. *Anal Biochem.* 1971;40:135-157.
83. Bautovich GJ, Dash MJ, Hensley WJ, Turtle JR. Gradient gel electrophoresis of human plasma lipoproteins. *Clin Chem.* 1973;19:415-418.
84. Lefevre M. Localization of lipoprotein unesterified cholesterol in nondenaturing gradient gels with filipin. *J Lipid Res.* 1988;29:815-818.
85. McNamara JR, Campos H, Ordovas JM, Peterson J, Wilson PW, Schaefer EJ. Effect of gender, age, and lipid status on low density lipoprotein subfraction distribution. Results from the Framingham Offspring Study. *Arteriosclerosis.* 1987;7:483-490.
86. Austin MA, Mykkanen L, Kuusisto J, Edwards KL, Nelson C, Haffner SM, Pyorala K, Laakso M. Prospective study of small LDLs as a risk factor for non-

- insulin dependent diabetes mellitus in elderly men and women. *Circulation*. 1995;92:1770-1778.
87. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002;8:1249-1256.
 88. Breslow JL. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat Med*. 1997;3:600-601.
 89. Kannel WB, Gordon T, Castelli WP. Role of lipids and lipoprotein fractions in atherogenesis: the Framingham study. *Prog Lipid Res*. 1981;20:339-348.
 90. Carlson LA, Bottiger LE. Risk factors for ischaemic heart disease in men and women. Results of the 19-year follow-up of the Stockholm Prospective Study. *Acta Med Scand*. 1985;218:207-211.
 91. Barbir M, Wile D, Trayner I, Aber VR, Thompson GR. High prevalence of hypertriglyceridaemia and apolipoprotein abnormalities in coronary artery disease. *Br Heart J*. 1988;60:397-403.
 92. Castelli WP. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease--the Framingham Heart Study. *Can J Cardiol*. 1988;4 Suppl A:5A-10A.
 93. Kraus WE, Houmard JA, Duscha BD, Knetzger KJ, Wharton MB, McCartney JS, Bales CW, Henes S, Samsa GP, Otvos JD, Kulkarni KR, Slentz CA. Effects of the amount and intensity of exercise on plasma lipoproteins. *N Engl J Med*. 2002;347:1483-1492.
 94. Williams PT, Vranizan KM, Krauss RM. Correlations of plasma lipoproteins with LDL subfractions by particle size in men and women. *J Lipid Res*. 1992;33:765-774.
 95. St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, Mauriege P, Bernard PM, Despres JP, Lamarche B. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Quebec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:553-559.
 96. Miller BD, Alderman EL, Haskell WL, Fair JM, Krauss RM. Predominance of dense low-density lipoprotein particles predicts angiographic benefit of therapy in the Stanford Coronary Risk Intervention Project. *Circulation*. 1996;94:2146-2153.

97. Zambon A, Hokanson JE, Brown BG, Brunzell JD. Evidence for a new pathophysiological mechanism for coronary artery disease regression: hepatic lipase-mediated changes in LDL density. *Circulation*. 1999;99:1959-1964.
98. Koba S, Hirano T, Ito Y, Tsunoda F, Yokota Y, Ban Y, Iso Y, Suzuki H, Katagiri T. Significance of small dense low-density lipoprotein-cholesterol concentrations in relation to the severity of coronary heart diseases. *Atherosclerosis*. 2006;189:206-214.
99. Hirano T, Ito Y, Koba S, Toyoda M, Ikejiri A, Saegusa H, Yamazaki J, Yoshino G. Clinical significance of small dense low-density lipoprotein cholesterol levels determined by the simple precipitation method. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:558-563.
100. Arisaka O, Fujiwara S, Yabuta K, Mokuno H, Mitugi Y, Miyake N. Characterization of low-density lipoprotein subclasses in children. *Metabolism*. 1997;46:146-148.