

**T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**HİPERKOLESTEROLEMİLİ HASTALARDA BAZI
SİTOKİN VE OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet ŞEN

KAYSERİ-2013



T. C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

HİPERKOLESTEROLEMİLİ HASTALARDA BAZI
SİTOKİN VE OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Ahmet ŞEN

Danışman

Doç. Dr. Aysun ÇETİN

KAYSERİ-2013

TEŞEKKÜR

Asistanlık hayatım boyunca birçok konuda olduğu gibi tezimin hazırlanmasında da bana desteğini esirgemeyen danışman hocam Doç.Dr. Aysun ÇETİN'e ve tecrübelerinden çokça yararlandığım Öğr.Gör.Dr. Recep SARAYMEN'e teşekkür etmeyi her zaman borç bilirim.

İhtisasım boyunca yetişmemde emekleri olan tüm Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyelerine ve Biyokimya Anabilim Dalı başkanı sayın Prof.Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU'na teşekkür ederim.

Tez aşamalarında yardımlarını esirgemeyen Kardiyolojiden Doç.Dr. Mehmet Güngör KAYA'ya, numunelerin toplanmasında emeği olan Araş.Gör.Dr. Göktuğ SAVAŞ'a, Flow sitometri çalışmasında görüşlerinden yararlandığım Doç.Dr. Mustafa Yavuz KÖKER'e ve biyoistatistikten Doç.Dr. Ahmet ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman olduğu gibi bu tezin hazırlanmasında hep arkamda olduğunu bildiğim, beni sabırla bekleyen sevgili eşime ve beni yetiştirip bugünlere getiren aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Ahmet ŞEN

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR.....	I
TABLO LİSTESİ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
ÖZET	VI
ABSTRACT	VII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. KOLESTEROL	3
2.1.1. Kolesterol Sentezi.....	4
2.1.2. Kolesterol Emilimi	6
2.1.3. Kolesterolün Kanda Taşınması	6
2.1.3.1. Şilomikronlar	7
2.1.3.2. Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL).....	7
2.1.3.3. Ara yoğunluklu lipoproteinler (IDL)	7
2.1.3.4. Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL).....	8
2.1.3.5. Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL).....	8
2.1.4. Kolesterolün Önemi.....	9
2.1.4.1. Hücre zarı	9
2.1.4.2. Safra asitleri.....	9
2.1.4.3. Steroid hormonlar	10
2.1.5. Hiperkolesterolemi	10
2.1.6. Kolesterol Düzeyi ve Ateroskleroz	13
2.2. SİTOKİNLER.....	14
2.2.1. Tümör Nekroz Faktör (TNF)	15
2.2.2. İnterlökin-1 (IL-1)	17
2.2.3. İnterlökin-6 (IL-6)	18

2.3. OKSİDATİF STRES.....	19
2.3.1. Malondialdehid.....	20
2.3.2. Paraoksonaz	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. GEREÇ	24
3.2. ÇALIŞMA GRUBU	25
3.2.1. Hasta Grubu	25
3.2.2. Kontrol Grubu	25
3.2.3. Numune Alımı ve Saklanması	25
3.3.YÖNTEM.....	26
3.3.1.Rutin Analizler	26
3.3.2. Biyokimyasal Analizler	28
3.3.2.1.Flow (Akım) Sitometri.....	28
3.3.2.2.TNF- α , IL-6 ve IL-1 β 'nın Flow Sitometrik Ölçümü	30
3.3.2.3.TNF- α ELISA Ölçümü	34
3.3.2.4.IL-1 β ELISA Ölçümü	36
3.3.2.5.IL-6 ELISA Ölçümü	38
3.3.2.6.MDA Ölçümü	40
3.3.2.7.PON1 Ölçümü	42
3.4.İSTATİSTİKSEL ANALİZLER.....	44
4.BULGULAR	45
4.1. DEMOGRAFİK BULGULAR	45
4.2. RUTİN ANALİZ BULGULARI	46
4.3. BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI.....	48
5.TARTIŞMA.....	54
6.SONUÇLAR.....	64
7. KAYNAKLAR.....	65
8.TEZ ONAY SAYFASI	76

KISALTMALAR

ABC	: Avidin biyotin peroksidaz kompleksi
ADAM-17	: Metallopeptidaz bölge 17
APC	: Allophyocyanin
BAF	: B lenfosit aktivasyon faktörü
BD	: Becton Dickison
CBA	: Cytometric Bead Array
CV	: Varyasyon Katsayısı
EAS	: European Atherosclerosis Society
ELISA	: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ESC	: European Society of Cardiology
FITC	: Floresan-5-izotiosiyanat
FSC	: Forward Scatter : İleri Saçılım
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HMG-KoA	: Hidroksimetilglutaril KoA
IDL	: Ara Yoğunluklu Lipoprotein
IFN- γ	: İnterferon-gama
Ig	: İmmunglobulin
IL-1RA	: IL-1 Reseptör Antagonist
IL-1 β	: İnterlökin-1 Beta
IL-6	: İnterlökin-6
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
LAF	: Lenfosit Aktivasyon Faktörü
LCAT	: Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
MDA	: Malondialdehit
METSAR	: Türk Kalp Çalışması ve Metabolik Sendrom Sıklığı Araştırması
MFI	: Ortalama Floresans Yoğunluğu
MI	: Miyokard İnfarktüsü
NCEP	: National Cholesterol Education Programı
NO	: Nitrik Oksit
NPC1L1	: Niemann-Pick C1-benzeri 1 proteini

oxLDL	: Okside düşük-dansiteli lipoprotein
P450scc	: Sitokrom P450 Yan Zincir Kırıcı Enzim
PAF-AH	: Platelet Aktive Edici Faktör Asetil Hidrolaz
PBS	: Fosfat Tamponu
PE	: Phycoerithrin
PerCP	: Perdinin Chlorophil-P
PMT	: Photo Multiplier Tubes
PON	: Paraoksonaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
SREBP	: Sterol Düzenleyici Eleman Bağlayıcı Protein
SSC	: Side Scatter: Yan Saçılım
TBA	: Tiobarbitürik Asit
TBARS	: Thiobarbituric Acid Reactive Substance
TEKHARF	: Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri
TMB	: Tetra Metil Benzidin
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktör Alfa
TNFR	: Tümör Nekroz Faktör Reseptörü
VCAM	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VKI	: Vücut Kütle İndeksi
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Lipoproteinlerin sınıflandırması ve özellikleri.....	7
Tablo 2.2. Türkiye’de yapılan çalışmalarda cinsiyete göre kolesterol ortalamaları..	11
Tablo 3.1. Flow sitometrinin kullanım alanları	30
Tablo 3.2. Flow sitometrik ölçülen sitokinlerin varyasyon katsayıları.....	34
Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Bulguları.....	45
Tablo 4.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Rutin Çalışma Bulguları.....	46
Tablo 4.3. Çalışma gruplarının biyokimyasal analiz bulguları.....	48
Tablo 4.4. Parametreler arasındaki korelasyonlar.....	53

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Kolesterolün yapısı	3
Şekil 2.2. Kolesterol sentezinde izopentenildifosfat oluşumu	4
Şekil 2.3. Kolesterol sentezinde skualen oluşumu	5
Şekil 2.4. Skualenden kolesterol oluşumu	5
Şekil 2.5. Aterom pağı oluşumu	13
Şekil 2.6. Lipid oksidasyonu ve MDA oluşumu	20
Şekil 2.7. PON1'in üç boyutlu yapısı	22
Şekil 3.1. Flow sitometri cihazının prensibi	28
Şekil 3.2. Flow sitometri grafik örnekleri	32
Şekil 3.3. Sitokinlerinin konsantrasyonlarını gösteren Sayım-PE grafikleri	33
Şekil 3.4. FCAP Array programından elde edilen TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın Ortalama floresans yoğunluğu (MFI) - konsantrasyon grafikleri	33
Şekil 3.5. TNF- α standart grafiğı	36
Şekil 3.6. IL-1 β standart grafiğı	38
Şekil 3.7. IL-6 standart grafiğı	40
Şekil 3.8. MDA ölçüm reaksiyonu	40
Şekil 3.9. MDA standart grafiğı	42
Şekil 3.10. PON-1 standart grafiğı	44

Sayfa No

Şekil 4.1. Hesaplı LDL ve Direkt LDL karşılaştırılmasında regresyon analizi 47

Şekil 4.2. Hesaplı LDL ve Direkt LDL karşılaştırılmasında Bland-Altman grafiği 47

Şekil 4.3. TNF- α 'nın ELISA ve Flow karşılaştırılmasında regresyon analizi 49

Şekil 4.4. TNF- α 'nın ELISA ve Flow karşılaştırılmasında Bland-Altman grafiği 49

Şekil 4.5. IL-1 β 'nin ELISA ve Flow karşılaştırılmasında regresyon analizi 50

Şekil 4.6. IL-1 β 'nin ELISA ve Flow karşılaştırılmasında Bland-Altman grafiği 51

Şekil 4.7. IL-6'nın ELISA ve Flow karşılaştırılmasında regresyon analizi 52

Şekil 4.8. IL-6'nın ELISA ve Flow karşılaştırılmasında Bland-Altman grafiği 52

HİPERKOLESTEROLEMİLİ HASTALARDA BAZI SİTOKİN VE OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Amaç: Ateroskleroz oluşması ve gelişmesinde önemli etkisi olan hiperkolesteroleminin bazı sitokin ve oksidatif stres parametreleri ile ilgisinin araştırılması.

Gereç ve Yöntem: Rutin laboratuvar tetkikleri ile hiperkolesterolemi tanısı konulan, 50 hasta ve 30 sağlıklı birey çalışma kapsamına alındı. Her iki gruptan da lipid parametreleri (Total Kolesterol, Trigliserid, HDL, LDL), tümör nekroz faktör alfa (TNF- α), interlökin 1 beta (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), malondialdehid (MDA) ve paraoksonaz-1 (PON1) çalışılıp değerlendirildi. TNF- α , IL-1 β ve IL-6 hem boncuklu Flow sitometrik yöntemle hem de ELISA yöntemiyle analiz edilip yöntem karşılaştırması yapıldı.

Bulgular: Hiperkolesterolemililerde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yükselmiş TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve MDA ile azalmış PON1 seviyeleri bulundu. Bland-Altman grafiği ile yapılan yöntem karşılaştırmasında ELISA ve Flow yöntemleri, TNF- α ve IL-1 β için birbirleriyle uyumsuz, IL-6 için uyumlu olduğu görüldü.

Sonuç: Aterogenezin oluşmasında sitokinlerin ve oksidatif stresin önemli etkilerde bulunduğu görüşü desteklendi. Koroner arter hastalıklarının oluşma mekanizmasını aydınlatmada çalışmamızın katkı sağlayacağını düşünüyoruz. Ayrıca literatürde sayısı yetersiz olan Flow sitometri ve ELISA yöntemlerinin karşılaştırıldığı nadir çalışmalardan olmuştur. İki yöntem arasındaki uyumun daha kapsamlı çalışmalarla araştırılması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Flow sitometri, hiperkolesterolemi, oksidatif stres, sitokinler, yöntem karşılaştırması.

EVALUATION OF SOME CYTOKINES AND OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN PATIENTS WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA

ABSTRACT

Aim: In order to investigate the relationship between hypercholesterolemia that has a significant impact on the development of atherosclerosis and some cytokines, oxidative stress parameters.

Materials and Methods: Fifty patients who were diagnosed as hypercholesterolemia with routine laboratory tests and additionally 30 healthy individuals were included in the study. In both groups, the lipid parameters (total cholesterol, triglyceride, HDL, LDL), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin 1 beta (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), malondialdehyde (MDA) and paraoxonase-1 (PON1) levels were studied. TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels were analyzed with both bead flow cytometric assay and ELISA methods and these methods were compared to each other.

Results: When the hypercholesterolemic group compared to the control group it has found that; the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MDA were significantly increased and the levels of PON1 were decreased. When the Flow and ELISA methods compared to each other with Bland-Altman graphic it has found that they were incompatible for TNF- α and IL-1 β and compatible for IL-6.

Conclusion: The opinion that cytokines and oxidative stress were found to be significant influence in the formation of atherogenesis was supported. We believe that our study will contribute to the lighting the formation mechanism of the coronary artery diseases. In addition, this study is one of the few studies that have been compared to flow cytometry and ELISA methods in the literature. It has concluded that; the agreement between the two methods should be investigated with more comprehensive studies.

Keywords: Cytokines, flow cytometry, hypercholesterolemia, method comparison, oxidative stress.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Plazma kolesterol seviyesinin yükselmesi anlamına gelen hiperkolesterolemi, kardiyovasküler hastalıkların risk faktörleri arasında en önemlisidir. Hiperkolesterolemi ile ilişkili olan koroner arter hastalığı, miyokard infarktüsü, strok ve periferik damar hastalıkları; morbidite ve mortalite sebepleri arasında ilk sıralarda bulunmaktadır (1,2). Hiperkolesterolemide artan oksidatif stres ve diğer nedenlerle oluşan ateroskleroz ilerleyici hastalıkların altyapısını oluşturmaktadır (3,4).

Yapılan klinik araştırmalar, inflamasyon ile lipid metabolizması arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Hiperkolesterolemisi olan hastalarda serum tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) , interlökin-6 (IL-6) ve interlökin-1 beta (IL-1 β) düzeylerinde önemli değişiklikler olduğu bildirilmektedir (5,6). TNF- α , vasküler hücrelerde serbest radikal oluşumunu artırır. Serbest radikaller permeabiliteyi artırarak ödeme neden olur (7). Aterosklerozun oluşmasında ve gelişmesinde TNF- α 'nın önemli etkisi bulunmaktadır (8). IL-1, T hücresinin antijeni tanınması ve uyarımı ile salgılanabildiği gibi; TNF- α , interferon-gama (IFN- γ) ve lipopolisakkarit etkisiyle de salgılanabilir. Lipoksijenaz yolu ürünleri, IL-1 salınımını artırırken; siklooksijenaz yolu ürünleri ve steroidler IL-1 salınımını engellerler (9). IL-6'nın aterogeneizde görev alması ve obezitede koroner risklerin artmasının nedenlerinden biri olması, lipid metabolizmasındaki etkilerindedir (10).

Oksidatif stres; oksidan mekanizmanın antioksidan mekanizmayı aştığı durumlarda gözlenir. Canlı sistemlerinde bulunan reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit anyonu, hidroksil radikali, nitrik oksit (NO), peroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller oksidatif stresin önemli kaynaklarıdır. ROS, hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbohidratlar gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar (11). Bu oksidatif mekanizma elemanlarından biri olan paraoksonaz (PON), HDL'yi oksidasyondan koruyarak HDL'nin ters kolesterol taşıma fonksiyonunun devamını sağlar. Bu durum makrofajlarda kolesterol birikimini engelleyerek köpük hücre oluşumunu ve ateroskleroz gelişimini yavaşlatmaktadır (12). Yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda oluşan malondialdehit (MDA) ise; membran bileşenlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna neden olarak; membranın iyon transportu, enzim aktivitesi, akışkanlık ve permeabilite gibi özelliklerini değiştirir (13).

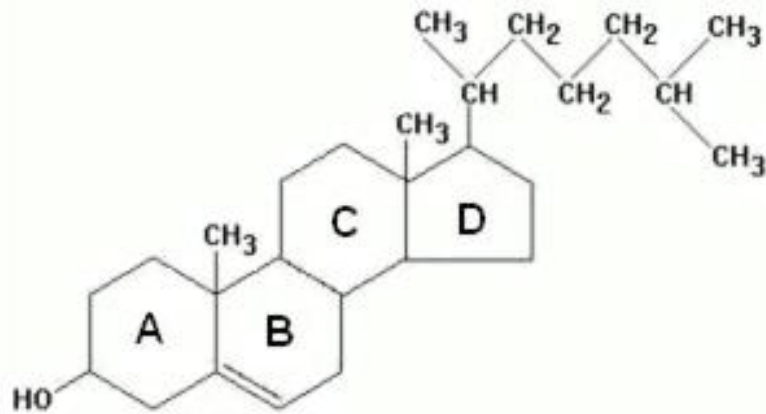
Bu çalışmada; hiperkolesterolemili hastalarda sağlıklı gönüllülere göre bu parametrelerin (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MDA ve PON1) karşılaştırılmasının yapılması ve sitokinleri hem Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi hem de Flow (akım) sitometri yöntemi ile çalışılıp; yöntem karşılaştırılmasının yapılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KOLESTEROL

Kolesterol, insan metabolizmasında önemli rol oynayan ve hücre membranında görevleri olan organik bir maddedir. Yunanca chole (safra) ve steros (katı) sözcüklerinin birleşiminden oluşan kolesterol; ilk kez 1815 yılında Fransız kimyacı M.E. Chevreul tarafından bulundu, 20. yüzyılın başlarında izole edildi ve kısmen tanımlandı. Ancak yapısı hakkında yeterli bilgi elde edilemedi. Bundan sonraki yüzyılda kolesterolün yapısı açıklandı, sentez yolları bulundu ve kolesterol metabolizmasını düzenleyen mekanizma ortaya konuldu (14).

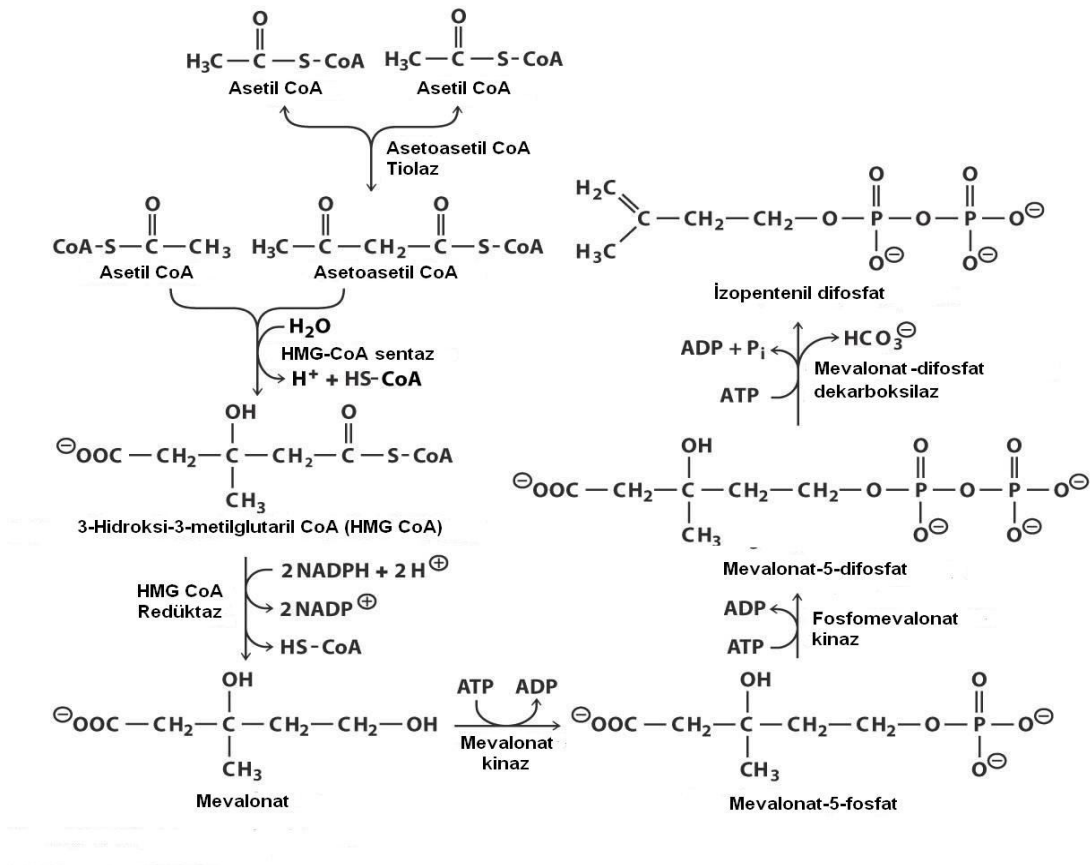
Kolesterol, birbiriyle kaynaşmış A, B, C ve D olmak üzere dört adet birleşik halkalardan ve D halkasına tutunmuş 8 üyeli dallanmış hidrokarbon zincirinden oluşan, 27 karbonlu siklopentanoperhidrofenantren yapısındadır (Şekil 2.1) (14).



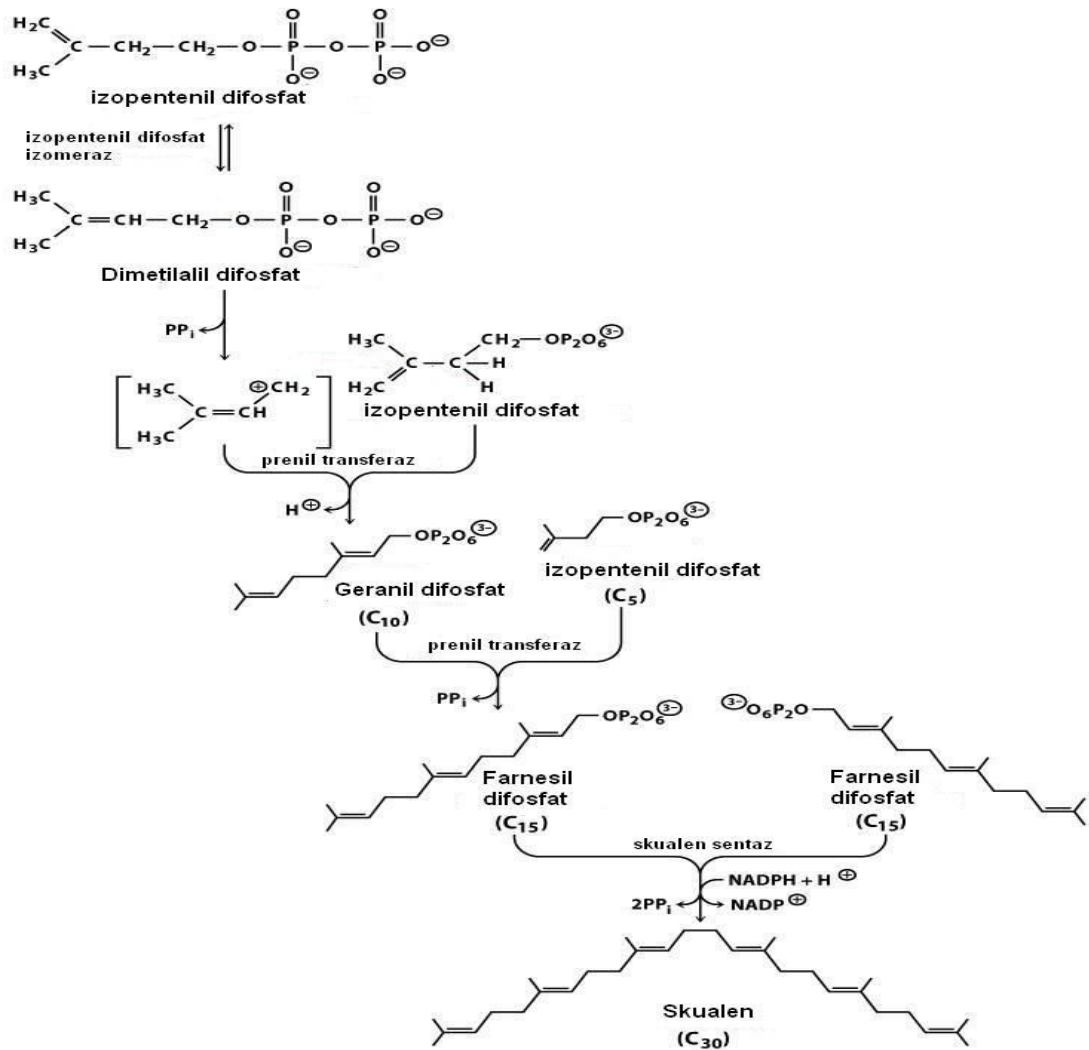
Şekil 2.1 Kolesterolün yapısı

2.1.1. Kolesterol Sentezi

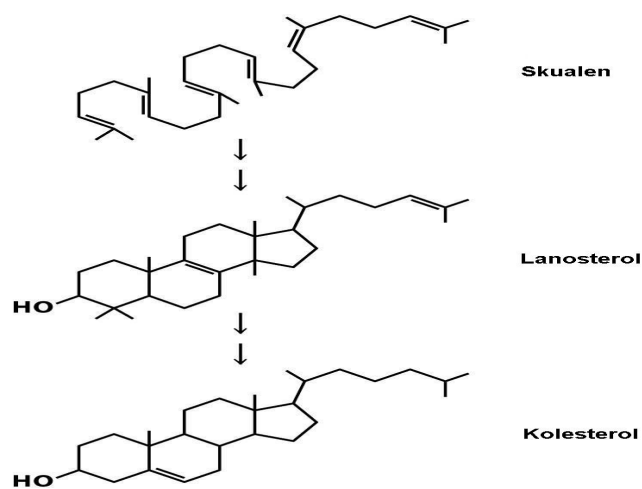
Kolesterol diyetten sağlanabilirken özellikle karaciğer ve bağırsak hücreleri başta olmak üzere vücuttaki hücrelerin çoğunda bulunan bir mekanizmayla sentez edilebilmektedir. Kolesterol sentezinin öncülü; glukoz, yağ asitleri veya amino asitlerden üretilen asetil CoA'dır. İki molekül asetil CoA, asetoasetil CoA oluşturduktan sonra hidroksimetilglutaril CoA (HMG-CoA) yapmak üzere bir diğer asetil CoA ile kondanse olur. HMG-CoA'nın indirgenmesi mevalonatı meydana getirir. HMG-CoA redüktaz tarafından katalizlenen bu tepkime kolesterol sentezindeki ana hız kısıtlayıcı basamaktır (Şekil 2.2). Mevalonat, izopren birimleri üretir ve bu birimler kondanse olup en sonunda skualen oluşturur (Şekil 2.3). Skualenin halkalanması steroid halka sistemini yapar ve daha sonra bir dizi tepkime ile kolesterol oluşur (Şekil 2.4). Adrenal bezler ve gonadlarda da önemli miktarda sentez edilen kolesterol, steroid hormon sentezinin öncülü olarak kullanılır. (15, 16).



Şekil 2.2. Kolesterol sentezinde izopentenildifosfat oluşumu (17)



Şekil 2.3. Kolesterol sentezinde skualen oluşumu (17)



Şekil 2.4. Skualenden kolesterol oluşumu (17)

2.1.2. Kolesterol Emilimi

Gıda ile alınan kolesterolün en yoğun olarak bulunduğu kaynaklar; karaciğer, yumurta sarısı, kırmızı et, tam yağlı süt ürünleri ve kabuklu deniz hayvanlarıdır (18). Besinlerle alınan kolesterol miktarı genellikle yağ tüketimiyle ilişkilidir ve gıdalarda bulunan kolesterolün çoğunluğunu serbest formu oluştururken yalnızca %8-15' lik bir kısmını kolesterol esterleri oluşturmaktadır (19).

Besinlerle alınan kolesterol ince bağırsağın proksimal kısmında yağ asitleri ve lizofosfolipidlerle birlikte safra tuzu miçellerinden emilir. Bağırsak lumeninden enterositler tarafından gerçekleştirilen emilim işleminin, kolesterol homeostazında görev alan HMG-KoA redüktaz ve sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein (SREBP) gibi sterole hassas bölge içeren bir anahtar protein olan Niemann-Pick C1-benzeri 1 proteini (NPC1L1) tarafından gerçekleştirildiği gösterildi (20, 21). NPC1L1, enterositlerin brush-border zarına yerleşerek; kolesterol ile fitosterollerin intestinal emiliminde görev yapmaktadır (22).

2.1.3. Kolesterolün Kanda Taşınması

Hidrofobik moleküller olduklarından dolayı kolesterol ve diğer lipidler plazmada protein molekülleri ile beraber lipoprotein halinde suda çözünebilen makromolekül kompleksleri şeklinde taşınırlar (17). Lipoproteinler genel olarak içte hidrofobik lipidleri (trigliserid ve ester kolesterol) içeren bir çekirdek barındırır. Dışta ise fosfolipid tabakası ve bu tabaka arasına yerleşmiş serbest kolesterol ile proteinlerden oluşur. Proteinler hücre membranında olduğu gibi bu tabaka arasında ve üzerinde yerleşik olabilir. Lipoproteinlerin protein kısımları apolipoprotein ile enzimlerden meydana gelir (23).

Lipoproteinler, santrifüjdeki hareketlerine, elektroforetik yüklerine, lipid fraksiyonlarına ve içerdikleri apoproteinlerine göre; Şilomikron, çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), ara yoğunluklu lipoprotein (IDL) ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) şeklinde ayrılırlar (17) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Lipoproteinlerin sınıflandırması ve özellikleri (17)

Sınıfı	Yoğunluğu (g/mL)	Çapı (nm)	Apolipoprotein
Şilomikron	<1.006	75 – 200	B48, AIV, CII, CIII, E
VLDL	0.95 – 1.006	30 – 80	B100, E, CI, CII, CIII
IDL	1.006 – 1.019	25 – 35	B100, E
LDL	1.019 – 1.063	18 – 25	B100
HDL	1.063 – 1.210	5 – 12	AI, AII, CI, CII, CIII, E

2.1.3.1. Şilomikronlar

Çapı en büyük, yoğunluğu en az olan şilomikronlar; trigliserit içeriği en yüksek olan lipoproteinlerdir. Şilomikronlar, ince bağırsak epitel hücrelerinin düz endoplazmik retikulumunda sentezlenirler; sonra lenfatik sisteme geçerler, daha sonra juguler venden kan dolaşımına katılırlar. Postprandiyal plazmada bulunan şilomikronların yapısında bulunan trigliseritler, bağırsaklardan dokulara taşınması sırasında lipoprotein lipazın etkisiyle hidroliz olur ve şilomikron kalıntıları haline gelir. Şilomikron kalıntıları karaciğere gelerek Apo E reseptörleriyle katabolize edilirler. Şilomikron kalıntıları kolesterol bakımından zengindirler (17).

2.1.3.2. Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL)

Endojen trigliserit ve kolesterol diyete bağlı olarak karaciğerde sentezlenip; VLDL yapısında paketlenerek dolaşıma verilirler. Olgun VLDL yapısındaki trigliseritler, lipazların hidrolizi ile dokulara verilerek kolesterolden zengin lipoprotein yapılarına dönüşürler (17).

2.1.3.3. Ara yoğunluklu lipoproteinler (IDL)

Lipolitik enzimler tarafından VLDL'den oluşturulan IDL, normal koşullarda plazmada düşük miktarlarda bulunur. IDL' nin yaklaşık % 50' si karaciğerde Apo E reseptörleriyle alınarak katabolize edilir. Geri kalanı trigliseritden fakir, kolesterolden zengin LDL' ye dönüşür (17, 23).

2.1.3.4. Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL)

Tek apoproteini Apo B100 olan, plazma kolesterolünün yaklaşık %70'ini taşıyan LDL'ler farklı büyüklükte ve yoğunlukta, farklı yapı ve fizikokimyasal kompozisyona sahip heterojen partiküller halinde bulunurlar. Yapısında zengin çeşitlilikte çoklu doymamış yağ asidi bulunmaktadır. İçeriğinde α -tokoferol, karotenoid gibi bazı antioksidanlar bulunmasına rağmen güçlü oksidasyon potansiyeline sahiptir (24). LDL'nin %75'i karaciğer parankim hücreleri tarafından alınmaktadır. Diğer dokular az miktarda LDL almaktadırlar. Bu alımların 2/3'üne LDL reseptörü aracılık eder (17).

LDL kolesterol düzeylerinin düşürülmesi; kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi için uzun yıllar farmakolojik tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde temel olarak üzerinde durulan bir konudur. Plasebo-kontrollü çalışmalar sürekli olarak, LDL'nin düşürülmesinin klinik vaka oranını azalttığını göstermektedir (2,25).

2.1.3.5. Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL)

Hacimleri düşük, yoğunlukları yüksek olan lipoproteinlerdir. HDL, dolaşımdaki diğer lipoproteinlerden kolesterol esterlerini toplar ve küre şekilli olgun HDL şekline dönüşür. HDL kütesinin %50'si protein, %30'u fosfolipid, %20'si kolesteroldür. Başlıca proteini Apo AI'dir ve protein içeriğinin yaklaşık % 70'ni oluşturur. Bundan başka Apo A-II, Apo A-IV, Apo C-I, C-II ve C-III, Apo-D, Apo-E, Apo-J (clusterin) ve Apo-L gibi diğer apoproteinler de bulunur. Bu apoproteinler lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT), PON, haptoglobulin, platelet aktive edici faktör asetil hidrolaz (PAF-AH) gibi özellikle antioksidan sistemle alakalı pek çok proteinin HDL'nin yapısına katılması, inhibisyon veya aktivasyonu ve ekstrahepatik dokularla etkileşimleri ile ilişkilidirler (17,26).

HDL seviyesi ile oluşabilecek kardiyovasküler hastalık riski arasında zıt etkileşim olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (27,28). Nitrik oksitin biyoyararlanımını artıran HDL, aynı zamanda ve antiinflamatuvar, antioksidan, antiapoptotik ve antitrombotik özelliklere de sahiptir (29).

2.1.4. Kolesterolün Önemi

2.1.4.1. Hücre zarı

Hücre zarının temel bileşeni olan kolesterol, çeşitli fosfolipid, sfingomyelin ve glikolipidlerin oluşturduğu lipid moleküllerinin yaklaşık olarak %20-25' lik kısmını oluşturmaktadır (30). Kolesterolün moleküler yapısı diğer zar lipidlerinden oldukça farklı olmasına rağmen hidrofobik ve hidrofilik grupları birlikte taşıma özelliği benzerdir. Fosfolipid çift tabakalı yapı içerisindeki kolesterol, polar hidroksil grubu ile sulu faza doğru yönelirken; hidrofobik steroid halka fosfolipidlerin hidrokarbon zincirleri arasında paralel olarak yer almaktadır (31).

Kolesterol tarafından gerçekleştirilen lipidlerin artmış lateral düzenlenmesi ile, zarda akıcılığın azalması ve polar moleküllerin geçirgenliğinin kısıtlanması sağlanmaktadır (32).

2.1.4.2. Safra asitleri

Karaciğerde kolesterolün dönüşümü ile sentezlenen ve fizyolojik deterjan özelliğinde olan safra asitleri; besinlerle alınan yağ, kolesterol ve yağda çözünen vitaminlerin ince bağırsakta emilimini kolaylaştırıp; kolesterol ve diğer maddelerin feçes ile atılmasını sağlayan yapılardır. Duedonumdan ince barsağa verilip ileumda tekrar emilen safra asitleri, portal venöz dolaşım ile yeniden karaciğere taşınır. Bu şekilde safra asitlerinin yalnızca %5' lik bir kısmı feçesle atılır; ki bu kayıp da kolesterolün dönüşümü ile gerçekleşen biyosentez yoluyla telafi edilir (33).

Vücuttaki kolesterolün yaklaşık %50'sini safra asitlerine dönüştürülen kolesterol oluşturmaktadır. Ekstrahepatik dokulardan karaciğere taşınan aşırı kolesterol, hepatositlerde safra asitlerine dönüşür. Bu biyosentez yolak, insanlarda kolesterol homeostazının sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (33).

Hepatik kolesterolün fazlası iki yolak ile safra asitlerine dönüştürülür. Birincisi, kolesterol 7 α -hidroksilazın hız kısıtlayıcı basamağı katalizlediği nötral ya da klasik yolak, ikincisi ise; sterol 27-hidroksilazın düzenleyici enzim olarak görev yaptığı asidik ya da alternatif yolaktır. İnsan safra içeriğinde en çok bulunan safra asitleri olan kolik asit ve kenodeoksikolik asit primer safra asitleri olarak adlandırılmaktadır. Primer safra asitlerinin dekonjugasyonu ve 7 α -OH grubunun da uzaklaştırılması ile sekonder safra asitleri olan deoksikolik asit ve litokolik asit oluşmaktadır (34).

2.1.4.3. Steroid hormonlar

Steroidojenik hücreler olan adrenalde, overde, testiste, plasentada ve beyinde normal üreme fonksiyonu ve vücut homeostazisinde kullanılmak üzere steroid hormonlar sentezlenirler. Kolesterolün hormon öncüsü olduğu steroid hormonlar, glikokortikoidler (21C), mineralokortikoidler (21C), androjenler (19C), östrojenler (18C) ve progesteronlar (21C) olmak üzere beş gruptur. Steroidogenezde, substrat olan kolesterol, sitokrom P450 yan zincir kırıcı enzim (P450_{scc}) tarafından pregnenolona metabolize edilir. Pregnenolon üzerinden gerçekleşen seri reaksiyonlar sonucunda steroid hormonlar sentezlenmektedir (35).

2.1.5. Hiperkolesterolemi

Hiperkolesterolemi, oluşumunda büyük rol oynadığı ateroskleroz etkisi nedeniyle majör kardiyovasküler risk faktörüdür. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz insanlarında da ölüm nedenlerinin başında hiperkolesterolemi sonucunda ortaya çıkan kalp hastalıkları ön sırada yer almaktadır. Ülkemizde lipit risk faktörlerinin durumunu ortaya koyan çalışmalar arasında Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri çalışması (TEKHARF), Türk Kalp Çalışması ve Metabolik Sendrom Sıklığı Araştırması (METSAR) gibi çalışmalar bulunmaktadır. TEKHARF çalışmasının 1990 yılı ilk taramasında, ülkemizde 35-64 yaş grubunda ortalama total kolesterol düzeyi erkeklerde 185 mg/dL, kadınlarda 192 mg/dL bulundu. Total kolesterol düzeyinin >200 mg/dL olması hiperkolesterolemi olarak kabul edildiğinde, erişkin yaş grubunda hiperkolesterolemi sıklığı yaklaşık %25'tir. Türk Kalp Çalışması'nda hiperkolesterolemi oranları erkeklerde %32, kadınlarda %22 olup TEKHARF verilerine yakındır. TEKHARF 2001 yılı taramasında; normal popülasyonda ortalama kolesterol düzeyi erkeklerde 186 mg/dL, kadınlarda 195 mg/dL olarak bulunduğu ve 1990 yılı taramasına göre de ciddi bir artış gösterdiği rapor edildi. TEKHARF'te 2001 taramasında LDL düzeyleri, erkeklerde 114.6 mg/dL, kadınlarda 122.4 mg/dL bulundu. Türk Kalp Çalışması'nda LDL; erkeklerde 136 mg/dL, kadınlarda 111 mg/dL bulundu ve >130 mg/dL sınır değerine göre erkeklerde %37, kadınlarda %28 oranında LDL kolesterol yüksekliği saptandı. METSAR'da LDL, erkeklerde 98.5 mg/dL, kadınlarda 100.5 mg/dL bulundu. Ülkemizdeki ortalama LDL kolesterol düzeyleri, Amerika Birleşik Devletleri ve Kuzey Avrupa ülkelerine göre oldukça düşüktür (Tablo 2.2) (36-38).

Tablo 2.2. Türkiye’de yapılan çalışmalarda cinsiyete göre kolesterol ortalamaları

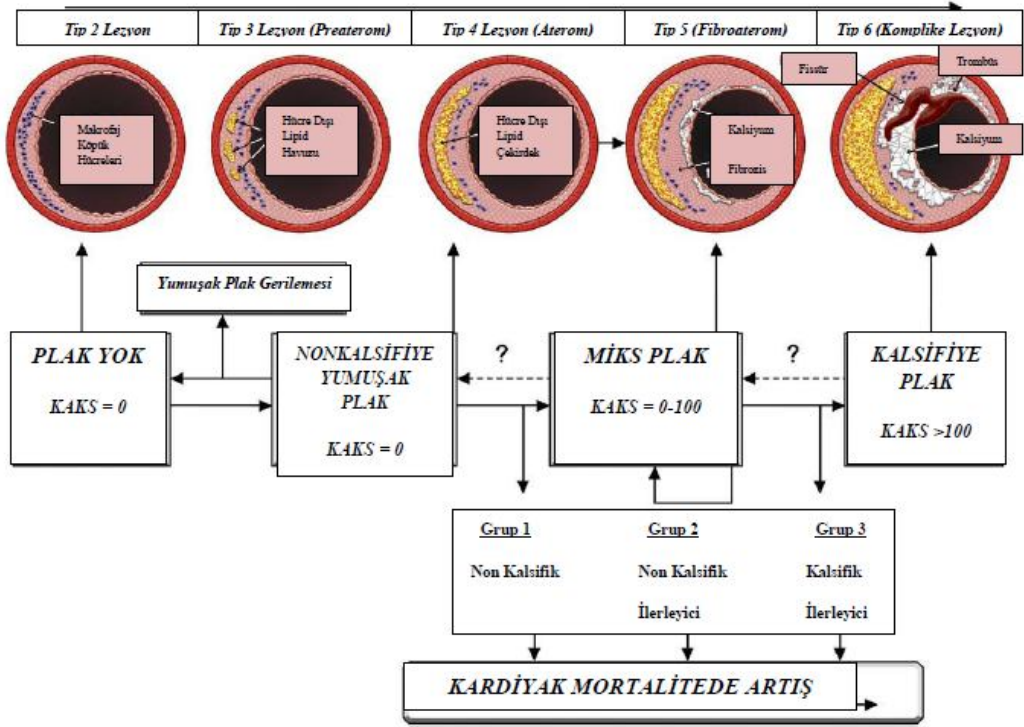
Araştırma	Yılı	Erkek	Kadın
TEKHARF	1990	185.0	192.0
Türk Kalp Çalışması	1993	174.0 ± 1.5	175.0 ± 1.3
Erem C.	2003	189.3 ± 0.9	190.7 ± 0.8
Demiral Y.	2004	203.4 ± 49.2	203.0 ± 45.7
METSAR	2005	173.6 ± 40.9	179.6 ± 41.4
BAK Projesi	2007	208.36 ± 0.63	211.32 ± 0.44

Ateroskleroz patogenezinde çeşitli teoriler bulunmaktadır. Literatürde öne sürülen bir teoriye göre; çeşitli travmalar ile damar endotelinin bütünlüğünde bozulma olur ve subendotelyal tabaka açığa çıkar. Dolaşımda bulunan monositler makrofajlara dönüşerek inflamasyonla seyreden tamir ve hatalı iyileşme sürecini başlatırlar. Bir diğer teori de lipid infiltrasyon teorisidir. Buna göre; aterosklerozun sebebi hiperlipidemi ve özellikle hiperkolesterolemidir. Dolaşımda fazla miktarda bulunan aterojenik lipoproteinler oksidasyona uğrarlar ve damar duvarında birikerek lezyonlara yol açarlar (39).

Aterogenezin ilk evresi hayatın erken dönemlerinden itibaren başlayan yağlı çizgilenmelerdir. Bu çizgilenmelerin histopatolojisinde, LDL fagosit etmiş makrofajlar bulunur. İkinci evrede lipidden zengin bir çekirdek etrafında fibröz plaklardan oluşan bir skar dokusu izlenir. Diğer risk faktörleri bu andan itibaren plak büyümesinde etkilidirler. Üçüncü evre ise; plakların yırtılıp damar içi pıhtı oluşumu ile sonuçlandığı stabil olmayan plak dönemidir. Yüksek LDL seviyeleri olgun koroner plak gelişiminde ve plak stabilizasyonunun bozulmasında rol oynar (40,41). Aterosklerotik koroner arter hastalığında (KAH); kaygan ve antitrombotik özellikte olan endotel, risk faktörlerinin etkisi ile kayganlık özelliğini kaybederek yapışkan ve tromboza meyilli hale gelir. Endotelden adezyon molekülleri, büyüme faktörleri ve çeşitli sitokinler salınmaya başlar. Okside LDL, IL-1 ve TNF- α 'yı aktive eder. Bu birincil proinflamatuvar sitokinler IL-6'yı aktive ederek karaciğerden akut faz reaktanlarının salınmasına yol açarlar (42).

Risk faktörlerinin varlığında plaktaki inflamasyon devam eder ve subendotelyal birikim giderek artar. İntimada biriken LDL, inflamatuvar yanıtı bizzat artırır.

Okside LDL, fosfolipid salınımı yolu ile endoteli aktive eder. Hemodinamik stres de adezyon molekül birikimini arttırıp olaya katkıda bulunur. Kolesterol esterlerinin makrofajlarda birikimi ile köpük hücreleri oluşur. Makrofajlar bir yandan lipid biriktirirken öte yandan inflamatuvar mediyatörleri salmaya devam ederler. T lenfositler de intimada birikip proinflamatuvar sitokinleri salmaya devam ederler. T hücrelerinin bir görevi de makrofajları aktive ederek kollajen, matriks metalloproteinazları ve sitokin salınımını teşvik etmesidir. Böylece aterom plağı dışta fibröz, içte ise lipid çekirdek ve düz kas hücrelerinden oluşan bir yapıya dönüşür ve giderek büyür. İntima ve mediya tabakalarını ilgilendiren bu süreç ilerledikçe lezyonlarda lipidden zengin nekrotik kısımlar kalsifiye olabilirler (39). Meydana gelen aterom plakları; ince, fibröz bir dış kılıfa ve yumuşak lipid birikimlerine sahiptirler. İnflamasyon hücrelerinin de sayıca daha fazla ve daha aktif olması nedeniyle yırtılmaya son derece hassastırlar. Serum kolesterol konsantrasyonunun statin grubu antihiperlipidemik ilaçlar ile azaltılması hem plağın lipid içeriğini azaltmakta hem de antiinflamatuvar özellik gösterip makrofajların birikimini de azaltarak hassas plakların daha az aktifleşmesine sebep olmaktadır. Plakların yırtılması sonucu subendotelyal bölge kan ile temas ederek damar duvarında trombüs oluşumu başlar. Böylece anstabil anginadan ST yükselmesi ile miyokard infarktüsüne (MI) kadar değişebilen olaylar zinciri de başlamış olur (43) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Aterom pağı oluşumu, KAKS: Koroner arter kalsifikasyon skoru (44).

2.1.6. Kolesterol Düzeyi ve Ateroskleroz

Serum LDL düzeyleri 25-60 mg/dL arasında fizyolojik olarak güvenlidir. Hayvan çalışmalarında aterosklerozun gelişmediği LDL düzeyi genellikle 80 mg/dL'nin altındaki değerlerdir (45). Ailesel hipobetalipoproteinemi sonucu aşırı düşük LDL düzeyi olanlarda yaşam süresinin daha uzun olduğu izlenmiştir (46). KAH olmayan bireylerin LDL seviyeleri ile yeni başlayan KAH arasında doğru orantılı bir ilişki vardır. 100 mg/dL'nin üzerindeki LDL seviyelerinin aterojenik olduğu görülmüştür (47,48). Sadece total kolesterol seviyesini <150 mg/dL (LDL <100 mg/dL)'nin altında tutmayı başarabilen toplumlarda yaşam boyu klinik KAH'ın neredeyse hiç izlenmediği görüldü (49).

Serum LDL düzeyi; <100 mg/dL optimal (yaşam boyu KAH riski çok düşük), 100-129 mg/dL optimale yakın, 130-159 mg/dL sınırdan yüksek, 160-189 mg/dL yüksek, >190 mg/dL çok yüksek riskli grup olarak belirlendi (25,43,50).

2.2. SİTOKİNLER

İlk kez 1974'de Stanley Cohen tarafından adlandırılan sitokin sözcüğü, 1969'da Dudley Dumonde tarafından 'lenfokin' olarak tanımlandı. 1979'da düzenlenen Uluslararası Lenfokin Çalıştayı'nda interlökinler 'lökositler arası sinyal iletişimini sağlayan proteinler' olarak tanımlanmalarının ardından 1989'da Balkwill ve Burke tarafından sitokinler çeşitli hücreler tarafından üretilen, fizyolojik yanıtlarda önemli roller üstlenen, birçok farklı hastalığın patofizyolojisinde yer alan ve terapötik potansiyeli olan, lenfokin, monokin, interlökin, interferon olarak adlandırılan bir grup protein olarak ifade edildi (6, 51).

Sitokinler doğal ve spesifik immunitenin efektör fazında üretilirler ve bağışıklık ve inflamatuvar yanıtların oluşmasını ve düzenlenmesini sağlarlar. Sitokin salınımı kısa, kendini sınırlayan bir olgudur. Genel olarak sitokinler öncül moleküller olarak depolanmazlar ve sentezleri yeni gen transkripsiyonu ile başlatılır. Bu transkripsiyonel aktivasyon genellikle geçicidir ve sitokinleri kodlayan mRNA'lar stabil değildir. Bu nedenle sitokinler bir kez sentezlendiğinde, hızla salınırlar ve geçici etki oluştururlar. Sitokinlerin aynı hedef hücrede farklı birçok etkileri vardır. Bazı etkiler aynı anda meydana gelirken, bazı etkiler farklı zaman aralıklarıyla oluşabilir. Sitokinler, diğer polipeptid hormonlarda olduğu gibi hedef hücrenin yüzeyindeki özel membran reseptörlerine bağlanarak etkilerini başlatırlar (51).

Sitokinler genellikle diğer sitokinlerin salınımını ve fonksiyonlarını da etkilerler. İki sitokin birbirini antagonize edebilir, benzer etkide bulunabilir veya sinerjik etki gösterebilirler. Birçok sitokin reseptörünün ekspresyonu özel sinyaller tarafından üretilir. Sitokinlere verilen hücresel yanıtların çoğu yeni mRNA ve protein sentezini gerektirmektedir. Sitokinler hem otokrin (salgılandığı hücreye), hem de parakrin (komşu hücreye) etkilidirler. Bazen de kan dolaşımıyla taşınıp uzak hücrelere ulaşarak endokrin özellikler gösterebilmektedirler. Birçok hedef hücre için sitokinler hücre bölünmesini düzenlerler (52).

Hücre gelişmesi, çoğalması, aktivasyonu, iltihabi olay, bağışıklık, doku tamiri ve morfogenezis gibi önemli biyolojik faaliyetleri düzenleyen sitokinler antijen için spesifik olmamakla birlikte oluşmaları ve hedef hücreleri etkilemeleri için antijenik stimülasyona ihtiyaç duyarlar. Genellikle kısa mesafelere, kısa süreliğine, çok düşük konsantrasyonlarda ve spesifik membran proteinine bağlanarak etki ederler. Şimdiye kadar 100'ün üzerinde sitokin tanımlandı (51, 52).

Etki mekanizmalarına göre sitokinler; doğal bağışıklıkta etkili olanlar (TNF, IL-1, IL-6, interferonlar gibi), lenfosit aktivasyonu ve gelişmesinde etkili olanlar (IL-2, IL-4 gibi), inflamatuvar hücreleri aktive edenler (IL-5, IL-10, IFN- γ gibi) ve hematopoezi stimüle edenler (IL-7, IL-9 gibi) olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Hiperkolesterolemide sitokinlerden TNF- α , IL-1 ve IL-6'nın önemli derecede etkileri bulunmaktadır (52).

2.2.1. Tümör Nekroz Faktör (TNF)

Tümör hücrelerinde hemorajik nekroza neden oluklarından bu ismi alan TNF'ler, α ya da β formunda olabilirler. T-hücreler, makrofajlar ve diğer hücreler tarafından üretilen TNF- α , 157 aminoasit içerirken, TNF- β ise 171 aminoasitten oluşan bir lenfotoksindir. Kaşektin, sitotoksin, makrofaj sitotoksik faktör, nekrozin, hemorajik faktör gibi isimlerle de tanınan TNF- α ile lenfotoksin ya da sitotoksin olarak da bilinen TNF- β , hem yapısal hem de biyolojik olarak benzerdirler (53).

Yaklaşık 25 kDa ağırlığındaki nonglikolize bir protein olarak sentezlenen TNF- α , aminoterminal ucu intraselüler, karboksiterminal ucu ise ekstraselüler bölgede olacak şekilde ters yönelimlidir. Sentezlendikten sonra, latent pro-TNF- α monositlerin ya da diğer hücrelerin, hücre yüzeyinde depolanır. pro-TNF- α , metallopeptidaz bölge 17(ADAM-17) ile parçalandıktan sonra 17 kDa ağırlığındaki çözünebilir, aktif formuna dönüşür. Karboksi terminal ucunu da içeren 17 kDa'luk membran fragmanları, mononükleer fagositlerin plazma membranındaki matriks metalloproteinazlar tarafından yıkılarak stabil ve biyolojik aktif formuna dönüşürler (53).

Hem TNF- α , hem de TNF- β 6p21.3'de lokalizedir ve 4 ekzon içerir. Salınan proteinin %80'den fazlası son ekzonda kodlanır. TNF- α öncelikle aktive monosit ve makrofajlar tarafından olmak üzere aktive T hücreler, B hücreler, NK hücreler, mast hücreleri, endotelyal hücreler, fibroblastlar, keratinositler, mikroglia, astrositler, Kupffer hücreleri, düz kas hücreleri, sinovyal hücreler ve basofiller tarafından üretilir. Asıl kaynağı CD14 monosit ve makrofajlarıdır. IL-6, IL-10 ve TNF- α sekresyonları arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır (53).

TNF- α , bakteri, virüsler, protozoa, sitokinler (IL-1, IL-2, IFN γ ve TNF- α 'nın kendisi), immün kompleksler, komplement komponent C5a, substans P ve reaktif oksijen bileşiklerine yanıt olarak salınırken; IL-10, siklosporin A, deksametazon, ibuprofen, metilprednizolon ve pentoksifilin tarafından üretimi inhibe olur. Aynı genler tarafından kodlanan iki ayrı TNF reseptörü her iki TNF'ye de bağlanır. Eritrositler ve dinlenme T hücreleri dışındaki birçok hücre Tip I reseptörü (TNFR-1, tip B, p55, CD120a) eksprese ederken, Tip II (TNFR-2, tip A, p75, CD120b) hematopoetik hücreler tarafından salınır. TNF- α aktivitesi için TNFR-1 temel aracı iken, TNFR-2 yardımcı roller oynar (52, 53).

Spesifik ve nonspesifik biyolojik yanıtların aracısı olan TNF'ler immün ve inflamatuvar reaksiyonlar arasında önemli bağlantılardır. Kontrolsüz aşırı sitokin üretimiyle ciddi katabolik etkilere (kaşeksi), doku hasarına ve ölüme neden olabilmesiyle iki uçlu bir kılıç olarak tanımlanabilirler. Önce tümör nekrozu oluşturabilmedeki kapasiteleriyle tanımlanan TNF'lerin ciddi gram-negatif infeksiyonlar sonrası görülen antitümör sitotoksitesinde de aracı olabildikleri anlaşılmıştır. Birçok biyolojik aktivitede (antiviral, antiparazitik, lipolitik, glikojenolitik, osteoklastik) roller alır ve bunların bir kısmını IFN- γ ve IL-1 ile sinerjistik olarak gerçekleştirir. İnflamasyon ve iyileşmede geniş etkileri vardır. Granulama oluşumunda, doku nekrozunda, fibroziste ve şokta yer alırlar. TNF- α , yine IFN- γ ile birlikte immün yanıtın güçlü düzenleyicisidir. Adezyon molekülleri ile diğer sitokinlerin (IL-1 ve IL-6) indüksiyonunda ve fagosit aktivasyonunda aracılırlar. Fibroblastlar için büyüme faktörüdür ve akut faz yanıtının ana indükleyicisidir. IL-1 ile birlikte birçok hücre tipinin davranışını etkiler. Genellikle IL-1 toksik değildir, TNF- α ise güçlü bir sitotoksik efektördür (54).

Makrofaj aktivasyonunu da içine alan birçok fonksiyonu olan TNF- α 'nın kardiyovasküler hastalıklar için birer risk faktörü olan obezite ve insülin direnci gibi inflamatuvar hastalıklarda güçlü proinflamatuvar etkileri vardır (55). TNF- α 'nın ateroskleroz patogenezindeki yeri, insan aterosklerotik plaklarında bulunmasıyla da desteklenmiştir. Ayrıca dolaşımdaki TNF- α düzeyleri, artmış rekürren MI, karotid intima-mediasında aterosklerotik kalınlaşma, trigliserit ve glukoz homeostazında bozukluklar ve yaşa bağlı aterosklerozla ilişkilidir (8). Bu fonksiyonlarının yanı sıra lipoprotein lipazı inhibe ederek, ateroskleroz gelişimine katkıda bulunan TNF - α , hipertrigliseridemi oluşumuna da katılır (56).

2.2.2. İnterlökin-1 (IL-1)

Endojen pirojen veya lenfosit aktivasyon faktörü (LAF) ile B lenfosit aktivasyon faktörü (BAF) olarak da bilinen IL-1 immünolojik reaksiyonların ve inflamasyonun başlaması için önemlidir. IL-1 ailesinin aynı reseptör üzerinde etkili, IL-1 α , IL-1 β ve IL-1 reseptör antagonist (IL-1RA ya da IL-1 γ) olmak üzere 3 üyesi vardır. Stabil tetrahedral globüler proteinler olan IL-1 α ve IL-1 β hücre membranında ya da ekstraselüler ortamda işlenirler ve agonistlerdir. IL-1RA ise antagonisttir. 17,5 kDa ağırlığındaki IL-1'in birçok fonksiyonu TNF ile ortak olsa da aralarındaki en önemli fark genel olarak IL-1'in toksik olmamasıdır. Ortak fonksiyonları ise; endotelden vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) ekspresyonudur (53).

Kromozomal yerleşimi IL-1 2q14'de lokalizedir ve 7 ekzondan oluşur. Tip I (CDw121a) ve Tip II (CDw121b) olmak üzere 2 tip reseptörü vardır. İmmunglobulin (Ig) süper ailesi üyesi olan bu transmembran glikoproteinler IL-1 α , IL-1 β ve IL-1RA'ya bağlanırlar. Birçok hücre tipinde bulunurlar ancak sadece Tip I reseptör (IL-1RI) intraselüler sinyal sağlar. Kaynaklandığı ana hücreler aktive mononükleer fagositler olmakla birlikte, hemen hemen bütün çekirdekli hücreler uyarı sonrası IL-1 α ve IL-1 β salgılayabilirler. Diğer önemli kaynakları, monosit ve makrofajlar, Langerhans hücreleri, dendritik hücreler, B lenfositler, endotelial hücreler, T hücreler, NK hücreler, astrositler, keratinositler ve fibroblastları da içine alan antijen-sunucu hücrelerdir (53, 54).

IL-1'in olgun formu, sitoplazmada prekürsör formun (prointerlökin-1) proteolitik yıkımı ile oluşur. Prekürsör IL-1 α 'dan, ekstraselüler proteazlar ve kalsiyum bağımlı membranla ilişkili kalpainler aracılığıyla N-terminal aminoasitlerin ayrılmasıyla olgun form oluşur. IL-1 α prekürsörü spesifik hücre bağlanabilme özelliğiyle biyolojik olarak aktifken, IL-1 β prekürsörü inaktiftir (53).

Hematopoez, lösemi, ateroskleroz ve solid tümör büyümesinde rolü olan IL-1, inflamatuvar yanıt ve doku tamirinde merkezi bir role sahiptir. Biyolojik aktivitesi salınan sitokin miktarına bağlıdır. Düşük konsantrasyonlarda, lokal immunoinflamatuvar reaksiyon aracısı gibi davranır, birçok hücrede (makrofaj, endotelial hücre, fibroblast, sinoviyal hücre, keratinosit) sekonder sitokin kaskadını indükler, lökosit ve endotelial hücre adezyonunu artırır, CD4 T hücre çoğalmasını, B hücre büyüme ve farklılaşmasını indükler. Yüksek konsantrasyonlarda IL-1 kana

difüze olur ve ardından beyin, karaciğer, adrenal ve diğer organlarda endokrin etkiler gösterir. Endojen pirojen gibi davranarak ateşi ve kaşeksiyi indükler, akut faz proteinlerinin sentezini uyarır. IL-1, hem kendi üretimi hem de diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimine aracılık ederek, infeksiyon ve inflamasyona patofizyolojik yanıtta önemli roller oynar. Yapılan çalışmalarda IL-1'in diyetle ilişkili olan aterosklerozda inflamatuvar katkı sağladığı ve ateroskleroz gelişimini artırdığı gösterilmiştir (9, 57, 58).

2.2.3. İnterlökin-6 (IL-6)

Hem pro-inflamatuvar hem de antiinflamatuvar bir sitokin olan IL-6, 184 aminoasit büyüklüğünde bir polipeptiddir. Damarda tunika mediadaki düz kas hücrelerinden üretilen IL-6 proinflamatuvar iken, IL-1Ra ve IL-10 için aktivatör etkileri aracılığıyla antiinflamatuvar özellik de gösterir. Aktive T hücreler, fibroblastlar, makrofajlar ile B hücreleri ve timositler için farklılaşma faktörü gibi hizmet eden bir lenfokin olan IL-6, B hücrelerden immunoglobulin üretimini uyarır. Dört α -helikal uzun zincir ailesine ait, 26kDa ağırlığında pleiotropik bir sitokindir. T ve B hücre fonksiyonu, Ig salgılanması, akut faz reaksiyonları, hematopoez gibi birçok farklı biyolojik alanı etkiler. IL-1 ve TNF- α gibi sitokin kaskadında yer alır ve infeksiyona karşı immünoinflamatuvar yanıtı düzenler (53).

IL-6 ve reseptörleri 7p21-14, 1(IL-6R α), 5 ve 17 (gp130) kromozom bölgelerinde lokalizedir. Reseptörü olan IL-6R, nonkovalent bağlarla bağlı α -ligand-bağlama zincir birimiyle (CD126), β -sinyal-transdüksiyon biriminden (CD130, gp130) oluşur. T ve B lenfositler, monosit ve makrofajlar, fibroblastlar, endotelial hücreler, mast hücreleri, nöronal hücreler, astrositler, mikrogliya, mezengial hücreler, osteoblastlar, epidermal langerhans adacıkları, dendritik hücreler, keratinositler ve kemik iliği stromal hücrelerinden salgılanırlar (53).

IL-6 diğer sitokinlerin üretimini ve etkilerini artırır. IL-6, antijen ya da mitojenle aktive B hücrelerde farklılaşma ve büyümede, Ig salgılanmasının olgunlaşması ve artırılmasında yer alır. Mukozal IgA yanıtının indüklenmesi ve düzenlenmesinde, T-helper 2 (Th2) tip hücrelerden salınan IL-6 ve IL-10 önemli dengeleyici roller oynarlar. Akut faz yanıtının temel indükleyicisi olan IL-6, hepatositte CRP gibi akut faz proteinlerinin, komplement komponentlerinin, haptoglobinin, fibrinojen, proteaz inhibitörlerinin sentezini sağlar. Akut faz yanıtında IL-1 ve TNF ile sinerjistik etki gösterir. T hücre ve timositler için ko-stimulatördür. T hücreden IL-10 üretimi, IL-6

tarafından arttırılır. NK-hücre aktivitesini tetikler. IL-6, endotelial hücrelerin lenfositlere yapışabilmesini arttırmada rol oynar ve bunu ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin ekspresyonunu artırarak yapar. Epidermal Langerhans adacıkları ve dendritik hücreler ürettikleri IL-6 ile kütanöz immünoinflamatuvar yanıtındaki rollerini açıklar. IL-1 ve TNF ile birlikte endojen pirojen gibi davranarak ateşi indükleyen IL-6, ACTH salınımını ve adrenal bezlerden glukokortikoid üretimini artırır (53).

HDL düzeyleri düşük ve yüksek olan hastalarda proinflamatuvar sitokinlerin (IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α) lipopolisakkarit yanıtının farklı bulunması, inflamasyon ve aterogenezdeki önemlerini işaret etmektedir. Proinflamatuvar sitokin sekresyonuyla, mast hücreleri monositlerin ve T lenfositlerin vasküler hücreye alınmasına yardımcı olurlar. Böylece monosit ve makrofajdan türeyen, kolesterol-esterleri içeren köpük hücre oluşumu gerçekleşir. Mast hücrelerinden tüevlenen sitokinler ve büyüme faktörleri vasküler düz kas hücresi ve fibroblast çoğalmasını aktive ederek aterosklerozda görülen obstrüktif lezyonların gelişimine neden olur (59). Proaterojenik bir sitokin gibi davranarak yağlı çizgilenmelerin artmasına neden olan IL-6 , bir yandan da IL-1Ra sentezi ve sTNFR salınımını indükler (6, 60).

2.3. OKSİDATİF STRES

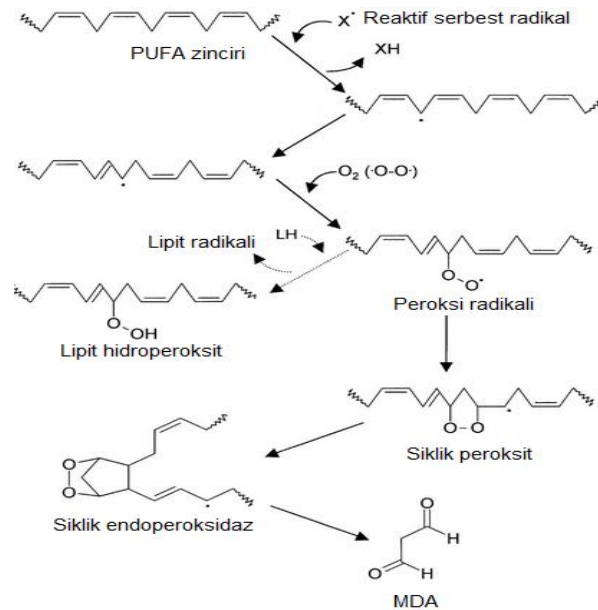
Organizmada oksidan-antioksidan sistemler bir denge içerisinde. Serbest oksijen radikallerinin aşırı miktarda üretildiği veya antioksidan savunma mekanizmalarının yetersiz kaldığı durumlarda; bu dengenin bozulması, oksidatif stres olarak tanımlanır. Oksidatif stresle oluşan doku hasarları arasında başlıca; lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, karbohidratların yıkımı, DNA ve membran yapısının bozulması gibi oksidatif modifikasyonlar sayılabilir (61,62).

Lipit peroksidasyonu, doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren ve otokatalitik biçimde yürüyen bir olay olarak tanımlanmaktadır. Membrandaki yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikaller ile kolaylıkla reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturabilir. Bir hücrede lipit hidroperoksitlerinin birikimi, fonksiyon bozukluğuna yol açabileceği gibi yüksek miktarda sitotoksik ürünler de oluşturabilir. Plazma lipoproteinleri, özellikle LDL, oksidasyona karşı oldukça duyarlıdır (63).

Aterosklerozun oksidatif modifikasyon hipotezi oksidatif stresin aterosklerotik lezyon oluşumunu başlatması için mekanik bir zaruret olduğunu belirtmektedir. Okside düşük-dansiteli lipoproteinler (oxLDL), makrofajlar tarafında yutulduktan sonra fenotip modülasyonu geçirir ve köpük hücreğine dönüşür, aterosklerotik plağın gelişimi için çekirdek olmuş olur (64). Lipid oksidasyonu ile ilişkili parametreler arasında malondialdehid ve paraoksonaz bulunmaktadır.

2.3.1. Malondialdehid

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehit (MDA); düşük molekül ağırlıklı (72.07 kDa), kısa zincirli, 1,3-dikarbonil bileşiği olan, orta derecede zayıf bir asittir. Memelilerde okside olan yağ asitleri en çok araşidonik asit ve dokosahekzaenoik asittir. Oleik asit ve linoleik asidin oksidasyonundan çok az MDA oluşur. MDA çoklu doymamış yağ asitlerinin yapısında molekül içi yeniden düzenlenme esnasında oluşan endoperoksidlerin yıkımının geç evreleri sırasında oluşur. Linoleik asit gibi iki çift bağ içeren yağ asitleri peroksidasyon esnasında MDA oluşturabilmesine rağmen, üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitleri MDA'nın esas kaynağıdır. Bazı dokularda MDA enzimatik reaksiyonlar sonucu da oluşabilir. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik kantitatif bir indikatörü değildir ancak, lipid peroksidasyonunun derecesiyle korelidir (Şekil 2.6) (13,65).



Şekil 2.6. Lipid oksidasyonu ve MDA oluşumu

MDA, hücre membranının deformasyonuna, iyon geçişinin ve enzimatik fonksiyonların bozulmasına neden olur. Hücre zarlarından kolayca geçebileceği için hücre içindeki protein sentezini, enzimatik olayları ve DNA yapısını da olumsuz yönde etkilemektedir. MDA bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir ve oksidan hasarı değerlendirilmede sıklıkla kullanılır. MDA, hücre düzeyinde, karaciğer aldehid dehidrogenaz tarafından ya da mitokondrial yolla enzimatik olarak yıkılır ve vücuttan atılır. MDA'nın majör idrar metabolitleri, amino grupları yoluyla MDA ile reaksiyon yapmış protein, fosfolipid ve nükleik asitlerin yıkımından ortaya çıkmaktadır. Ana katabolik yol ara maddeler olarak malonik semialdehid, asetaldehid ve ürün olarak karbon dioksiti (CO₂) içerir (66, 67).

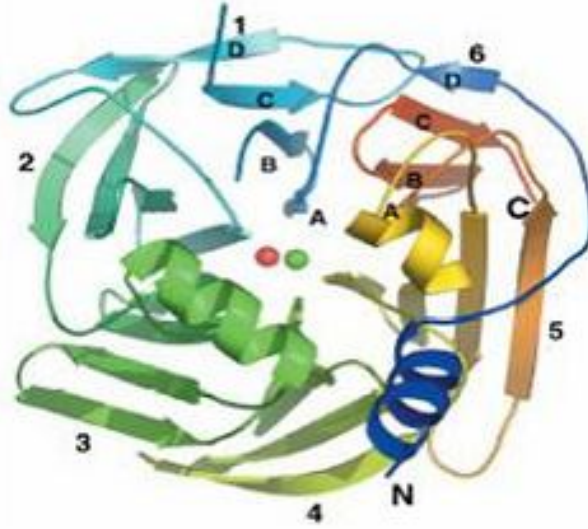
2.3.2. Paraoksonaz

Paraoksonaz (PON), ilk olarak, 1953 yılında Aldridge tarafından p-nitrofenil'in asetat, propiyonat ve bütirat esterlerini hidroliz eden esteraz olarak tanımlandı. Enzim, paraokson, metil paraokson ve klormetil paraokson'a yüksek derecede seçicilik gösterdiği için paraoksonaz olarak adlandırıldı (68). Önceki yıllarda organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışıldı, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile koroner kalp hastalığı riskinden korunulabileceği düşünülerek güncellik kazandı. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelendi, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişki araştırıldı, ayrıca genetik çalışmalarda yoğunluk kazandı (69, 70).

İnsanlarda 7. kromozomun uzun kolunda, q21.3 ile q22.1 bölgesinde lokalize oldukları gösterilen üç ayrı PON geni (PON1, PON2, PON3) bulunmaktadır. PON1 geni, karaciğer, böbrek, kalp, beyin ve ince bağırsak dokularında bulunmakta ve PON1 proteini plazmada HDL yapısında taşınmaktadır. PON2' nin dokular arasındaki dağılımı daha geniştir. PON 3 gen ürününün ise; en çok plazmada, HDL yapısında bulunduğu bildirilmektedir (12, 71).

İnsan serumundan saflaştırılan PON1, 43 kDa ağırlığında 354 amino asit içeren bir glikoproteindir. Ağırlığın % 15.8'ini oluşturan üç karbohidrat zinciri, dört farklı konumdan proteine bağlıdır. Sistein kalıntıları, PON1'in yapısal ve fonksiyonel özelliklerine katkıda bulunmaktadır. 284. konumdaki sistein kalıntısı, enzimin aktif

bölgesinin bir bileşeni durumundadır. Bu sistein kalıntısı, peroksidaz aktivitesi için esansiyeldir. PON1'in sisteine bağımlı antioksidan bölge ve kalsiyuma bağımlı organofosfat hidrolizinden sorumlu bölge olmak üzere, iki ayrı aktif merkezi bulunmaktadır. Organofosfatlara karşı PON1'in hidrolitik aktivitesi Ca^{+2} bağımlı iken; lipid peroksitlerin birikmesini önlemede gerekli değildir (Şekil 2.7) (72-74).



Şekil 2.7. PON1'in üç boyutlu yapısı. Altı adet β -kırmalı yapı, N ve C terminal bölgeleri ve merkezde yer alan iki adet kalsiyum iyonu görülmektedir (75).

PON1 proteini üç adet sistein içerir ve bu üç sistein molekülünden ikisi arasında disülfid bağı bulunur. Protein yapısında bulunan 42. ve 352. sistein amino asitlerinin oluşturduğu tek disülfid bağı, polipeptid zincirinin halka yapıda olmasına neden olmaktadır. PON1'in aktivitesi ve stabilitesi için, histidin, triptofan, aspartat/glutamat amino asitlerini bulundurması gerekmektedir. Özellikle aktif bölgede en az bir tane triptofan bulunduğu ve bunun substrata bağlanmada önemli rolünün olduğu bildirilmektedir (69, 73). Karaciğerde sentezlenen PON1'in seruma salgılanabilmesi için alıcı olan HDL'den fosfolipidler tarafından yarışmalı olarak uzaklaştırılır, bu sayede HDL ve hücre membranları ile hasarlı lipid alanları gibi fosfolipitten zengin alanlar arasında hareket edebilir (71).

Enzimin aktif bölgesinde bulunan His-His çifti, kalsiyum iyonu ve su molekülü, esteraz aktivitesinde önemli rollere sahiptir. Katalitik etkinlik gösteren Ca^{+2} iyonu, substrattaki fosfat iyonunun negatif yüklü oksijenine 2,2 Å uzaklıktadır. Aktif bölgedeki His-His çifti, su molekülünün bir protonunu alarak bu molekülün nükleofilik gücünü artırır. Oluşan hidroksil iyonu karbonil veya fosfat esterine saldırır. Oluşan yapıdaki Ca^{+2} iyonu negatif yüklü oksijenden uzaklaşarak bağ tekrar fosfat veya karbonilin üzerine yıkılır ve ester bağı kopar (73).

PON1'in mekanizmasını açıklamak amacıyla yapılan çalışmalarda esteraz aktivitesi için 2-naftilasetat ve fosfotriesteraz aktivitesi için paraokson substratları kullanıldı. Bu substratların optimum pH aralıkları saptandı ve substratın yapısında bulunan yan zincirin katalizlenmeye direkt katılmadığı sonucuna varıldı(68,76).

İnsanlardaki HDL ilişkili PON1, LDL'yi oksidasyondan koruyabilme yeteneğinin açıklanmasında çeşitli mekanizmalar önem kazanmaktadır. HDL ile ilişkili enzimlerin oksidatif modifikasyonlara karşı lipoproteinleri koruduğu düşünülmektedir. PON1; LDL'yi, bakır iyonunun ve serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan korumaktadır (77). PON1, oksidatif hasardan HDL'nin korunmasında da etkindir. Okside HDL'deki lipid peroksitler ve kolesteril linoleat hidroperoksitlerin PON1 aracılı hidrolizi iki mekanizmayla olmaktadır. 5' pozisyonunda hidroksil grubu olan okside lipidler veya ilişkili türevleri lizofosfatidil kolin ve valerolakton ürünleri oluşturmak için PON1 tarafından laktolize edilir. Daha sonra ortamın pH'ı ve su içeriğine bağlı olarak PON1 tarafından 5-hidroksikarboksilik asit oluşturmak üzere hidrolize edilir ya da değişmeden kalır. PON1'in ayrıca hidrojen peroksiti büyük ölçüde hidroliz edebildiği bulundu. PON1, kolesterol biyosentezinin inhibisyonu ve çöpçü reseptör yoluyla okside LDL'nin kaldırılması ile makrofaj kolesterol birikiminde azalmaya katkıda bulunur. PON1 HDL'nin makrofajlara bağlanmasını artırır ve böylece makrofaj fosfolipidlerindeki hidrolitik etkisiyle HDL aracılı makrofaj kolesterol çıkışını uyarır, lizofosfatidil kolin meydana gelir ve HDL'nin hücrelere bağlanması artar (78, 79).

3- GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan (05.02.2013 tarih, karar no: 2013/119) ve Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen (Proje no: TTU-2013-4523) bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı ile Hematoloji Bilim Dalında yapıldı.

3.1. GEREÇ

Çalışma sırasında distile su cihazları (MINIpure, EASYpure RF), soğutmalı santrifüj (Sigma 3K 30), pH metre (WTW-330İ/SET), etüv (Nüve FN400), su banyosu (Köttermann), derin dondurucu (Revco), manyetik karıştırıcı (Labor Brand Hotplate Stirrer), vorteks (Velp scientifica 2x³), buzdolabı (Frigidaire), kronometre, mikro ELISA okuyucu (BioTek ELx800), mikro ELISA yıkayıcı (BioTek ELx50), Becton Dickison (BD) marka FACSCanto II model Flow Sitometri cihazı, BD marka 12 x 75 mm'lik flow tüpleri, otomatik pipetler (Socorex, Nichipet EX, Genex Gamma), balon jojeler, polipropilen cam ve ependorf tüpler, beher, mezür ve cam pipetler kullanıldı. Çalışmada kullanılan çözeltiler, deiyonize su ile hazırlandı. Çalışmada kullanılan tüm cam malzemeler deiyonize su ile yıkandıktan sonra bir gün boyunca %20'lik nitrik asit (HNO₃) içinde bekletildi ve sonrasında tekrar deiyonize su ile yıkandı.

3.2. ÇALIŞMA GRUBU

3.2.1. Hasta Grubu

Mart 2013 - Kasım 2013 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji polikliniğinde muayene edilen ve rutin laboratuvar tetkikleri ile hiperkolesterolemi tanısı konulan ($LDL > 160$ mg/dL), 18-65 yaş aralığında olan 50 hasta çalışma kapsamına alındı. LDL sınırını belirlemede National Cholesterol Education Programındaki (NCEP), European Society of Cardiology (ESC) ile European Atherosclerosis Society (EAS) klavuzundaki ve Current Medical Diagnosis & Treatment 2013 kitabındaki değerler kaynak alınmıştır (80, 81). Hastalara, yapılacak testler hakkında bilgi verildi. Çalışmayı kabul edenlerden Helsinki Deklarasyonu'na uygun olarak imzalı onam kağıdı alınıp protokole dahil edildi.

Böbrek yetmezliği, koroner arter hastalıkları, karaciğer yetmezliği, immun sistem hastalıkları, diyabet, hipertansiyon gibi sistemik bir hastalığı olanlar, daha önce lipid düşürücü ilaç tedavisi alanlar ve almakta olanlar, ailesel hiperlipidemi, izole hipertrigliseridemi gibi lipid bozuklukları bulunanlar, yaşı 18'den küçük 65'ten büyük olanlar, herhangi bir nedenle sürekli ilaç tedavisi alanlar, vücut kütle indeksi (VKI) $18,5 \text{ kg/m}^2$ 'den küçük, 25 kg/m^2 'den büyük olanlar çalışma dışında bırakıldı.

3.2.2. Kontrol Grubu

Çalışılan rutin laboratuvar sonuçları; referans aralıkları içerisinde bulunan, sistemik hastalığı olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan, sigara içmeyen, VKI, $18,5 - 25 \text{ kg/m}^2$ aralığında olan, hasta grubunun yaş ve cinsiyet dağılımına benzer şekilde seçilen 30 gönüllü, kontrol grubu olarak çalışma kapsamına alındı.

3.2.3. Numune Alımı ve Saklanması

Çalışmaya dahil edilen hasta ve kontrol grubundan 12 saatlik açlık sonrasında sabah 08:00-09:00 arasında, 1 adet EDTA içeren CBC tüpüne (3mL) ve 1 adet düz biyokimya tüpüne (5mL) venöz kan örnekleri alındı. Tüpler, 30 dakika sonrasında, 4°C 'de 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Ayrılan plazma ve serum örnekleri alikotlanarak ependorf tüplerde -40°C 'de dondurulup analiz gününe kadar saklandı.

3.3.YÖNTEM

3.3.1.Rutin Analizler

Total Kolesterol, Trigliserid, HDL, LDL düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda, Architect C16000 marka otoanalizörde, Abbott marka kitler kullanılarak analiz edildi.

Total Kolesterol: Kit içeriğinde bulunan hazır reaktiflerle, enzimatik metoda göre otoanalizörde çalışıldı. Allain ve arkadaşlarının tanımladığı ve Roeschlau'nun geliştirdiği (82, 83) bu metoda göre; kolesterol esterler enzimatik olarak kolesterol esteraz tarafından kolesterol ve serbest yağ asitlerine hidrolize edilirler. Başlangıçta mevcut olan da dahil olmak üzere serbest kolesterol, kolesterol oksidaz tarafından kolest-4-ene-3-one ve hidrojen peroksit oksitlenir. Hidrojen peroksit, 500 nm dalga boyunda kantite edilen bir kromofor (kinonimin boyası) oluşturmak için hidroksibenzoik asit ve 4-aminoantipirin ile birleşir. Elde edilen absorbans değeri ile daha önceden değerleri belirlenmiş olan kalibratörler ile oluşturulmuş kalibrasyon eğrisinden, total kolesterol hesabı cihaz bilgisayarı tarafından otomatik olarak yapılır. 7D62-21 katalog numaralı Abbott marka kitin total varyasyon kat sayısı (CV) <math><3\%</math>'tür.

Trigliserid: Kit içeriğinde bulunan hazır reaktiflerle, gliserol fosfat oksidaz metoduna göre otoanalizörde çalışıldı. Fossati ve arkadaşlarının tanımladığı, McGowan ve arkadaşlarının geliştirdiği (84,85) bu metoda göre; trigliseridler lipoprotein lipaz tarafından yağ asitlerine ve gliserole hidrolize edilirler. Gliserol, gliserol kinazlı adenzin trifosfat tarafından gliserol-3-fosfat ve adenzin difosfat oluşturmak için fosforile edilir. Gliserol-3-fosfat, gliserol fosfat oksidaz ile dihidroksiaseton fosfata okside edilir ve hidrojen peroksit üretilir. Peroksidaz ile katalize edilen reaksiyonda, hidrojen peroksit kırmızı renkli bir boya oluşturmak için 4-aminoantipirin ve 4-klorofenol ile reaksiyona girer. Bu boyanın absorbansı örnekteki trigliserid konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 7D74 katalog numaralı Abbott marka kitin CV <math><5\%</math>'tir.

HDL: Kit içeriğinde bulunan hazır reaktiflerle, hızlandırıcı seçici deterjan metoduna göre otoanalizörde çalışıldı. Bu yöntem kolesterol oksidazın non-HDL esterleştirilmemiş kolesterol ile reaksiyonun hızlandırılması ve HDL kolesterolün özgül bir deterjan yardımıyla seçici bir şekilde çözündürülmesine dayanmaktadır. İlk reaksiyonda oluşan peroksit, renksiz bir ürün ortaya çıkaracak şekilde N, N-bis(4-sülfobutil)-m-toluidin, disodyum (DSBmT) ile bir peroksidaz reaksiyonu ile tüketilir. İkinci reaksiyon, özel deterjan kolesterol esteraz ve HDL kolesterolün kantitatif belirlenebilmesi için boya verecek kromojenik bağlayıcıdan oluşur. Elde edilen absorbans değeri ile daha önceden değerleri belirlenmiş olan kalibratörler ile oluşturulmuş kalibrasyon eğrisinden, HDL hesabı cihaz bilgisayarı tarafından otomatik olarak yapılır. 3K33-21 katalog numaralı Abbott marka kitin CV <% 4'tür.

LDL: Serum LDL düzeyleri, *Friedewald* formülü ile hesaplandı (86):

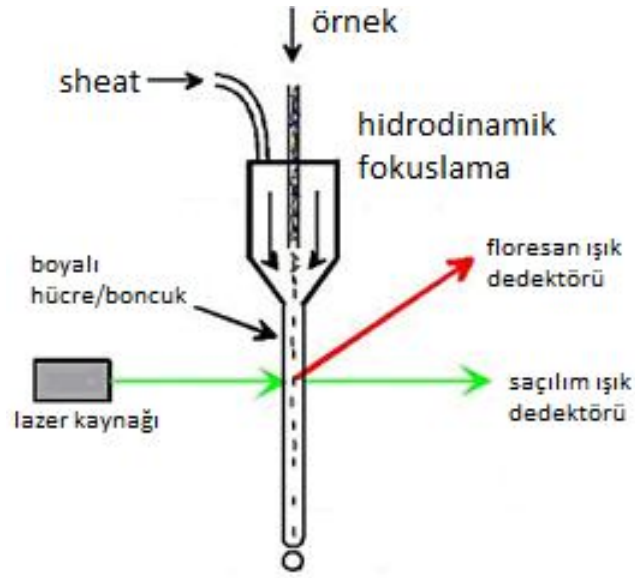
$$\text{LDL} = \text{Total Kolesterol} - [\text{HDL} + \text{Trigliserid} / 5]$$

Trigliserid düzeyi > 400 mg/dL olan hastalarda bu formül yerine Direkt LDL kiti ile ölçüm yapılması gerekmektedir. Bu çalışmada trigliserid düzeyi yüksek olan hastalar dışlandığı için direkt ölçüme gerek kalmamıştır. Fakat formül ve direkt ölçüm karşılaştırması da yapmak amacıyla tüm örneklerden Direkt LDL, kit içeriğinde bulunan hazır reaktiflerle, sıvı seçici deterjan metoduna göre otoanalizörde çalışıldı. Bu metoda göre özgül bir deterjan yalnızca LDL olmayan partikülleri çözündürür. Serbest kalan kolesterol kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz tarafından renk oluşturmayan bir reaksiyonla tüketilir. İkinci bir deterjan da kalan LDL partiküllerini çözündürür ve kromojenik bir bağlayıcının renk oluşumuna olanak tanır. Bağlayıcı varlığında LDL ile olan enzimatik reaksiyon sonunda ölçülen absorbans örnekteki LDL konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 1E31-20 katalog numaralı Abbott marka kitin CV <% 4'tür.

3.3.2. Biyokimyasal Analizler

3.3.2.1. Flow (Akım) Sitometri:

Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Akım sitometri ise, akan bir sıvının içerisindeki hücrelerin özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanılır. Flow sitometri cihazı çeşitli hücrelerin veya partiküllerin bir süspansiyon halinde bir akış kanalı boyunca tek tek geçmesi ve bu sırada lazer aracılığı ile hücre/partikül büyüklüğü ve granülaritesine göre sınıflandırılması esasına dayanan bir cihazdır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Flow sitometri cihazının prensibi

Flow sitometrinin çalışma prensibi 3 ana sistemden oluşur.

-Hidrolik Sistem: Partiküllerin lazer önünden geçişi için taşıyıcı sistem

-Optik Sistem: Lazer önünden geçen hücrelerden açığa çıkan floresan saçılımının çapraz ve silindirik filtreler ile toplanarak düzgün bir şekilde fotodedektörlere aktarılmasında görev alır

-Elektronik Sistem: Elde edilen optik sinyalin Photo Multiplier Tubes (PMT) ile amplifiye edilerek elektrik sinyaline çevriminden ve analiz için bilgisayara aktarımından sorumludur.

Oluşan sinyallerin kaynağı, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özellikleri olabildiği gibi hücreye bağlanan çeşitli fluorokromlar da olabilir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir. Hücre/partikül çapı ile yaklaşık orantılı olarak düşük açıda ileri saçılma (forward scatter=FSC) yoğunluğu, içindeki granül yapı sayısı ile yaklaşık orantılı olarak ortogonal saçılma (side scatter=SSC) yoğunluğu ve çeşitli dalga boylarındaki floresan yoğunluğu gibi birçok parametre aynı anda ölçülür. Her bir hücre veya partikül lazer demetinin içinden geçerken saptırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan floresan ışığı bir araya getirilip, optik filtreler ve aynalar tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılarak, analog sinyallere dönüştürülürler. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, grafik olarak ekrana aktarılır. Grafikler, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarının görsel sunumudur.

Flow sitometrideki analizler için hücrelerin sıvı içinde süspansiyon halinde bulunması gerektiğinden kan hücreleri, akım sitometride en çok incelenen hücreler olmuşlardır. Solid dokular ise hücreler disaggrege edilip hücre süspansiyonu hazırlanarak analizde kullanılmaktadır. Hücreler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikorlarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor floresan-5-izotiosiyanat (FITC), phycoerithrin (PE), perdinin chlorophil-P (PerCP) gibi floresan boyalarla işaretlenmiştir. Böylece belirli antijene sahip hücrelerin lazer ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir. Hücrelerin taşıdıkları antijenler yanı sıra hücre içi enzimlerin, DNA, RNA miktarlarının da uygun florokromlar ile işaretlenerek belirlenmesi mümkündür.

Son yıllarda gelişen teknolojiler sayesinde flow sitometrik analizlerde sadece hücreler değil boncuklu sistem kullanılarak plazma veya serum içerisindeki sitokinler de ölçülebilmektedir (Tablo 3.1). Yöntem, saniyede binlerce partikül değerlendirmesi yapılabildiğinden dolayı hızlı; spesifik antikorların kullanımından dolayı duyarlı; tek tip mikro küreciklerin ışık saçılımı ve floresan ölçümleri için bile düşük varyasyon katsayısı (CV) olduğundan dolayı da kesinliği yüksektir.

Tablo 3.1. Flow sitometrinin kullanım alanları

- Lösemi, lenfoma gibi hematolojik hastalıkların teşhis ve sınıflandırılması	-Membran permeabilite ve potansiyellerinin değerlendirilmesi
- DNA analizi	- Hücre içi kalsiyum iyon teknikleri
- RNA ve protein içerik analizi	- pH ölçümleri
- Virüs ve viral ürün tayinleri	- Glutasyon ölçümü
- Hücre proliferasyonu	- İmmun fenotipleme
- Apoptozis	- Sitokinlerin ölçümü

Flow sitometri yönteminin ELISA yöntemine göre avantajları:

- 30 adet parametreyi tek seri standart hazırlayarak analiz edebilme
- 50 µL miktarındaki tek örnekten aynı anda 30 parametre çalışabilme
- 0 ve 2500 pg/mL'lik standart değerlerinin olması nedeniyle daha düşük ve daha yüksek konsantrasyonlardaki parametreleri ölçebilme
- Konsantrasyonları çok yüksek olan numunelerin dilüsyonunu son okuma aşamasında da istenilen oranda yapabilme
- Daha kısa sürede sonuç alabilme
- Spesifik antikor kaplı boncukların tek tek değerlendirilmesi, çoğu parametre için CV< %5 olması ve kirliliğin dışlanabilmesi nedeniyle daha duyarlı sonuç alabilme

3.3.2.2. TNF- α , IL-6 ve IL-1 β 'nın Flow Sitometrik Ölçümü

Üç adet sitokin BD marka CBA (Cytometric Bead Array) Flex setler kullanılarak BD FACS Canto II cihazında ölçüldü (katalog numaraları: TNF- α :560112, IL-6: 558276, IL-1 β :558279).

Prensip: Flex setlerden hazırlanan spesifik antikor kaplı boncuklar numunedeki TNF- α , IL-6 ve IL-1 β sitokinlerine bağlanır. Bunun üzerine de yine spesifik antikorlu phycoerithrin (PE) eklenir. Flow sitometri cihazında akımdan geçirilerek elde edilen grafikte farklı sitokinlerin bağlı olduğu boncuklar farklı noktalarda yoğunlaşır. İlgili PE'nin artışı sitokin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Reaktif ve Materyaller

- 1-TNF- α 'nın liyofilize standardı, PE detection reagenti ve capture bead'ı (boncuğu)
- 2-IL-6'nın liyofilize standardı, PE detection reagenti ve boncuğu
- 3-IL-1 β 'nın liyofilize standardı, PE detection reagenti ve boncuğu
- 4-Human Soluble Protein Master Buffer Kit (BD marka, katalog no:558265) içinde:
 - a-Assay dilüent
 - b-Boncuk dilüenti (serum/plazma için)
 - c-PE dilüenti
 - d-Yıkama tamponu
- 5-BD marka 5 mL'lik (12 x 75 mm) flow tüpleri

Standartların Hazırlanması: Tüm sitokinlerin top şeklindeki liyofilize standartları 15 mL'lik tek falkon tüpe konulup 4 mL assay dilüent ile vortexleme yapmadan çözüldü. Her sitokin için 2500 pg/mL konsantrasyonda olan bu tüp, assay dilüent ile 8 tüple seri dilüsyonlar yapıldı. İçinde sadece assay dilüent olan 0 pg/mL'lik tüple beraber toplam 10 adet standart seri elde edildi (2500, 1250, 625, 312.5, 156, 80, 40, 20, 10, 0 pg/mL).

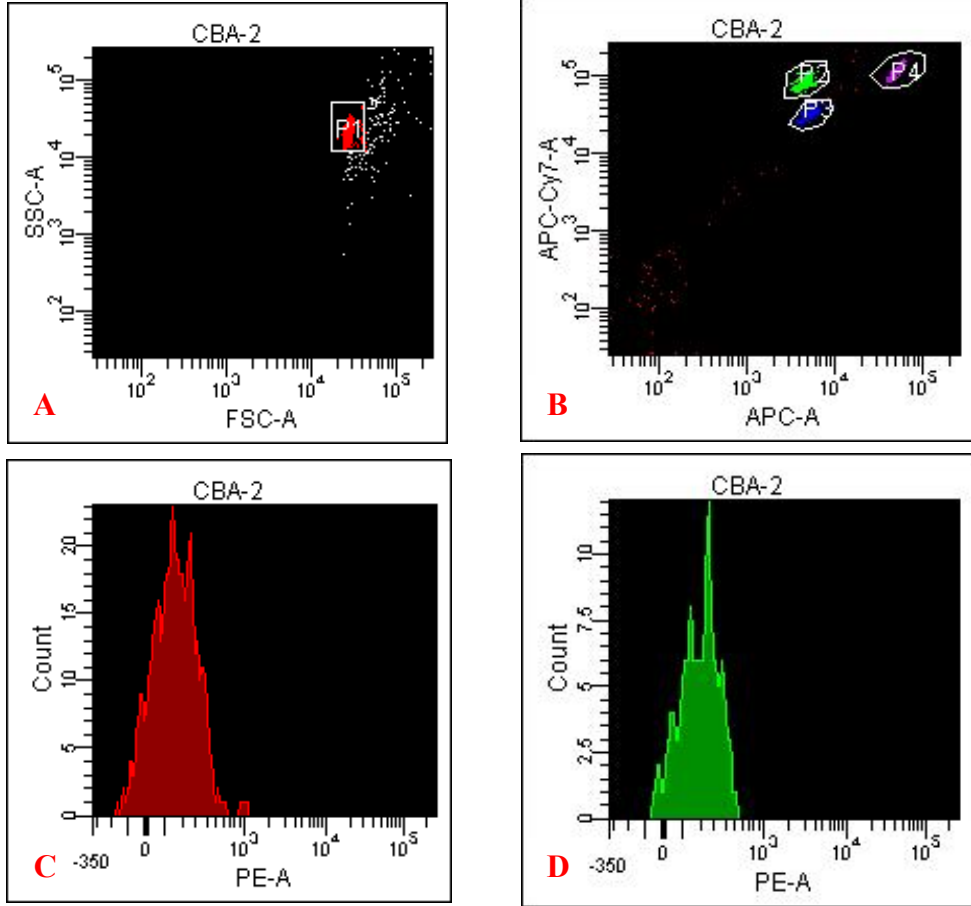
Boncukların Hazırlanması:Üç sitokinin boncukları her numune ve standarda 1 μ L olacak şekilde tek tüpe eklendi. 500 μ L yıkama tamponu ile karıştırıldı ve 5 dk 200 g'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve her numune ve standarda 50 μ L olacak şekilde boncuk dilüenti ile sulandırıldı.

PE Detection Reagent Hazırlanması: Üç sitokinin PE detection reagenti her numune ve standarda 1 μ L olacak şekilde tek tüpe konuldu. PE dilüenti ile her numune ve standarda 50 μ L olacak şekilde dilüe edildi.

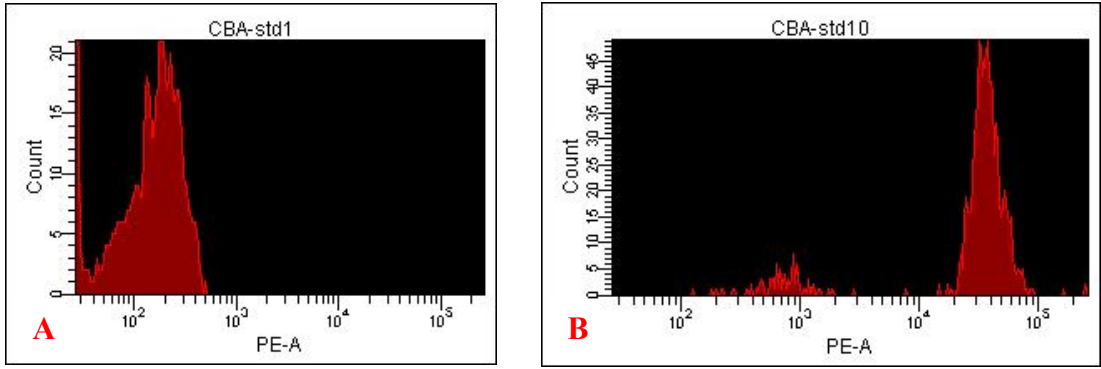
Flow sitometri cihazının hazırlanması: Erciyes Üniversitesi'nde ilk defa uygulanacak olan yöntem için BD firmasından gelen aplikasyon görevlileri tarafından ; Hematoloji Bilim Dalı bünyesinde rutin analizlerde kullanılan BD FACS Canto II cihazında, Human Soluble Protein Master Buffer Kit içerisinde bulunan A1, A9, F1, F9, PE F1 boncukları ile gerekli kalibrasyonlar yapıldı. F1= boyasız, F9= Allophycocyanin (APC), A1= APC-Cy7 olarak tanımlandı. Parametre başına okutulacak boncuk sayısı 300 olarak belirlendi.

Çalışma Prosedürü:

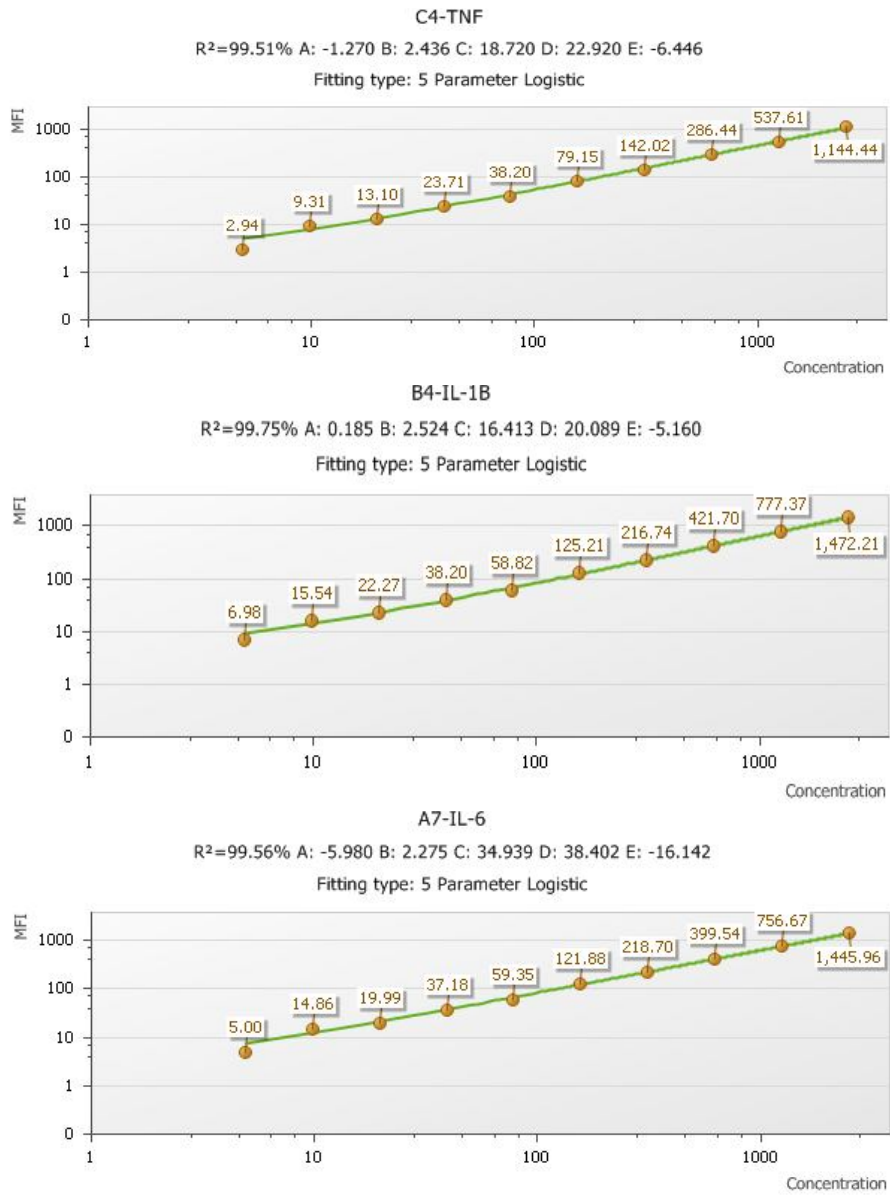
- 1-Standartlardan ve numunelerden kendi tüplerine 50'şer μL konuldu
- 2-Her tüpe 50 μL boncuk karışımı eklendi
- 3-1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi
- 4-Tüm tüplere 50 μL PE detection reagent eklendi
- 5-2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi
- 6-Tüm tüplere 1 mL yıkama tamponu eklendi
- 7-200 g'de 5 dk santrifüj edildi
- 8-Süpernatant dikkatlice uzaklaştırıldı
- 9- Tüm tüplere 300 μL yıkama tamponu eklendi ve okunmaya hazır hale geldi
- 10-FACS Canto II cihazında sırayla standartlar sonra da tek tek numuneler okundu.Elde edilen grafikler aşağıda gösterildi (Şekil 3.2 ve Şekil 3.3).



Şekil 3.2. A: Bir hastanın ileri-yan saçılım grafiği. Tüm boncukların yoğunlaştığı P1 alanı kapılanmış. **B:** Farklı sitokinlerin farklı yerlere düştüğünü gösteren Allophycocyanin (APC)-APC Cy7 grafiği. P2=IL-1 β , P3=TNF- α , P4=IL-6. **C:** Aynı hastanın toplu sitokin konsantrasyonunu gösteren Sayım- Phycoerithrin (PE) grafiği. **D:** Aynı hastanın sadece IL-1 β konsantrasyonunu gösteren Sayım-PE grafiği.



Şekil 3.3. A'da standart 1'in, B'de standart 10'un tüm sitokinlerinin konsantrasyonlarını gösteren Sayım-PE grafikleri



Şekil 3.4. FCAP Array programından elde edilen TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın Ortalama floresans yoğunluğu (MFI) - konsantrasyon grafikleri

Hesaplama: FACS Canto II'den elde edilen veriler, fcs2.0 formatında FCAP Array V3.0 programına aktarılarak hesaplama yapıldı. Her sitokinin grafikte düştüğü alanlar belirlendi. Spesifik PE'lerin yoğunluğu tespit edildi ve kirlilik temizlenerek otomatik hesaplama yapıldı. Üç sitokinin standartları için de ortalama floresans yoğunluğu (MFI) – Konsantrasyon grafikleri belirlendi (Şekil 3.4). Flex setlerde belirtilen varyasyon katsayıları Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Flow sitometrik ölçülen sitokinlerin varyasyon katsayıları

Sitokinler	Çalışma İçi		Çalışmalar Arası	
	Ortalama (pg/mL)	% CV	Ortalama (pg/mL)	% CV
TNF- α	39.7	3	38.4	3
IL-6	38.8	6	35.6	3
IL-1 β	38.9	10	33.3	3

3.3.2.3. TNF- α ELISA Ölçümü

Serum TNF- α düzeyleri, BOSTER marka ticari kit kullanılarak (katalog no: EK0525) sandviç tip ELISA yöntemi ile, kit prospektüsündeki talimatlar uygulanarak tayin edildi.

Prensip: Kitte bulunan 96 adet kuyucuğa kaplanmış olan, fare kaynaklı TNF- α 'ya spesifik monoklonal antikorlar; serumdaki ve standartlardaki antijen olan TNF- α 'ya bağlanır. Daha sonra bu antijen-antikor kompleksinin üzerine biyotinlenmiş poliklonal antikor bağlanır. Böylece altta ve üstte spesifik antikor, ortada antijen olmak üzere sandviç kompleks meydana gelir. Plate yıkama işlemleri ile bağlanmayan materyaller ortamdaki uzaklaştırılır. Son aşamada kromatik solüsyonun eklenmesi ile oluşan rengin şiddeti serumda bulunan TNF- α konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Reaktifler ve materyaller:

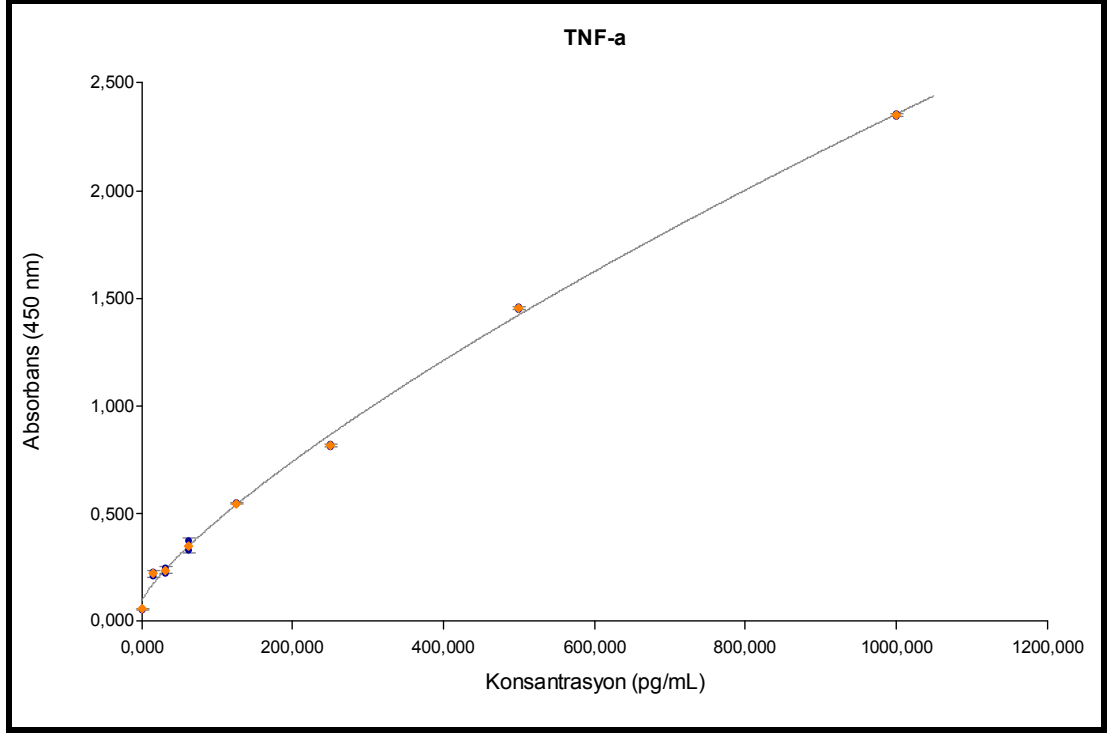
- 1- 96 adet anti-TNF- α antikorlu ile kaplanmış kuyucuk
- 2- Liyofilize rekombinant TNF- α standardı
- 3- Biyotinlenmiş anti- TNF- α antikorlu
- 4- Avidin biyotin peroksidaz kompleksi (ABC) solüsyonu

- 5- Örneklerin ve antikorun dilüentleri
- 6- ABC tamponu
- 7- Tetra metil benzidin (TMB) solüsyonu
- 8- TMB stop solüsyonu
- 9- pH: 7.4 olan, 0.01 molar fosfat tamponu (PBS)

Çalışma prosedürü:

Tüm reaktifler ve serumlar oda ısısına getirildi. Serumlar örnek dilüenti ile birebir sulandırıldı. Liyofilize olan standart, örnek dilüenti ile çözülüp arka arkaya seri dilüsyonlar yaparak yarı yarıya azalan konsantrasyonlarda 7 standartlı seri (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.5, 15.6 pg/mL) elde edildi. Örnek dilüenti, içeriğinde TNF- α olmayan kör solüsyonu kabul edilip belirlenmiş kuyucuklara eklendi. Daha sonra aşağıdaki şekilde çalışmaya devam edildi.

- 1-Yapılan plate planına göre önceden belirlenmiş kuyucuklara; örnek dilüentinden, yedi adet standarttan ve numunelerden 100'er μ L konuldu.
- 2-Plate, cover ile kapatılıp 37°C'de 90 dakika inkübe edildi.
- 3-İnkübasyon sonunda cover açılıp kuyucukların içi yıkama yapmadan boşaltıldı.
- 4-Tüm kuyucuklara 100 μ L biyotinlenmiş anti- TNF- α antikoruna eklendi ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
- 5- Kuyucuklar plate yıkayıcıda 3 kez PBS ile yıkandı.
- 6-Tüm kuyucuklara 100 μ L ABC eklendi ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.
- 7- Kuyucuklar plate yıkayıcıda 5 kez PBS ile yıkandı.
- 8-Tüm kuyucuklara 90 μ L TMB solüsyonu eklendi ve karanlıkta, 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklar TNF- α konsantrasyonuna bağlı mavi renk aldı.
- 9-Tüm kuyucuklara 100 μ L stop solüsyonu eklendi ve kuyucuklar sarı renk aldı.
- 10-Kuyucukların absorbansları 450 nm dalga boyunda Biotek marka ELISA okuyucu kullanılarak okundu.



Şekil 3.5. TNF- α standart grafiği (r^2 :0.998, formül: 4 parametrelı lojistik)

Hesaplama: Gen 5 programı sayesinde elde edilen Standart grafiği yardımıyla (Şekil 3.5) numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları hesaplandı. Serum TNF- α düzeyleri, pg/mL olarak verildi. Kite belirtilen çalışma içi CV = %8.1 (n:16, mean: 44.4 pg/mL) , çalışmalar arası CV= %9.8 (n:24 mean: 104 pg/mL).

3.3.2.4.IL-1 β ELISA lümü

Serum IL-1 β düzeyleri, INVITROGEN marka ticari kit kullanılarak (katalog no: KHC0011) sandviç tip ELISA yöntemi ile, kit prospektüsündeki talimatlar uygulanarak tayin edildi.

Prensip: Kitde bulunan 96 adet kuyucuğa kaplanmış olan IL-1 β 'ya spesifik monoklonal antikolar; serumdaki ve standartlardaki antijen olan IL-1 β 'ya bağlanır. Daha sonra bu antijen-antikor kompleksinin üzerine biyotinlenmiş poliklonal antikor bağlanarak sandviç kompleks meydana gelir. Plate yıkama işlemleri ile bağlanmayan materyaller ortamdan uzaklaştırılır. Son aşamada kromatik solüsyonun eklenmesi ile oluşan rengin şiddeti serumda bulunan IL-1 β konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

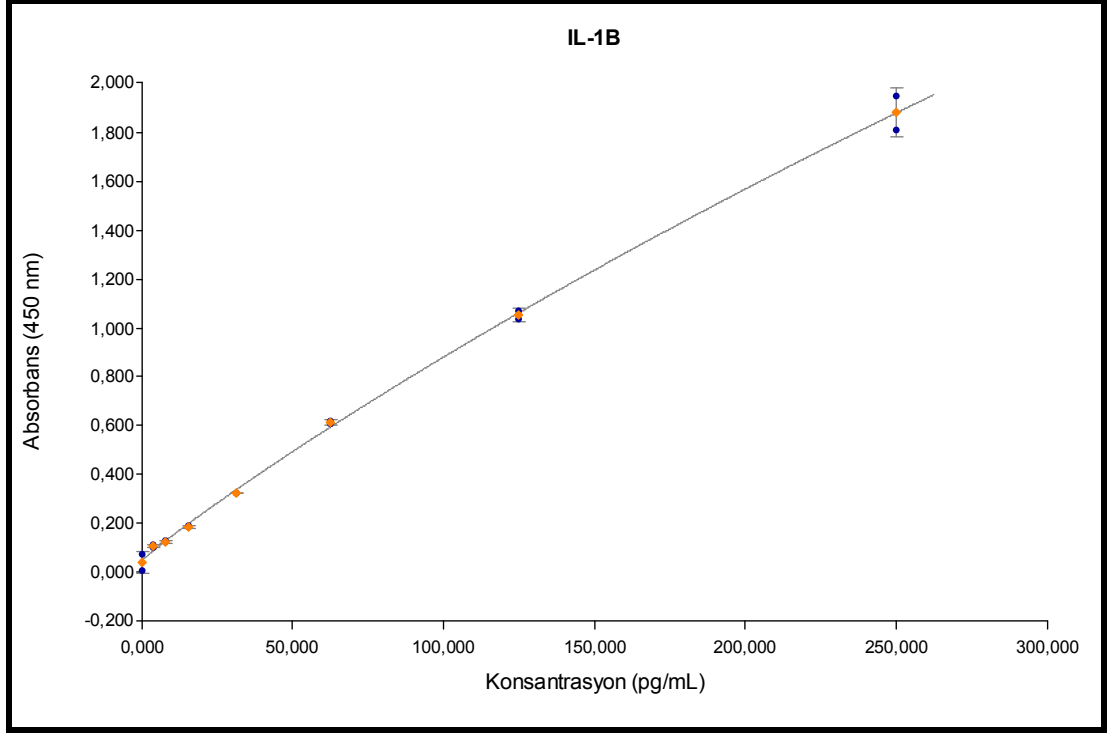
Reaktifler ve materyaller:

- 1-96 adet anti- IL-1 β antikoru ile kaplanmış kuyucuk
- 2-Recombinant Human IL-1 β standartı
- 3-Standart dilüent tamponu
- 4-Biyotinlenmiş anti- IL-1 β antikoru
- 5-Streptavidin-Peroksidaz (HRP) konsantratu
- 6-Streptavidin-HRP dilüenti
- 7-Yıkama tamponu
- 8-TMB solüsyonu
- 9-Stop solüsyonu

Çalışma prosedürü:

Tüm reaktifler ve serumlar oda ısısına getirildi. Liyofilize olan standart, standart dilüenti ile çözülüp arka arkaya seri dilüsyonlar yaparak yarı yarıya azalan konsantrasyonlarda 7 standartlı seri (250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9 pg/mL) elde edildi. Standart dilüenti, içeriğinde IL-1 β olmayan kör solüsyonu kabul edilip belirlenmiş kuyucuklara eklendi. Daha sonra aşağıdaki şekilde çalışmaya devam edildi.

- 1-Yapılan plate planına göre önceden belirlenmiş kuyucuklara; standart dilüentinden, yedi adet standarttan ve numunelerden 50'şer μ L konuldu.
- 2-Kör hariç tüm kuyucuklara 100 μ L biyotinlenmiş anti- IL-1 β antikoru eklendi.
- 3-Plate, cover ile kapatılıp oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- 4-Kuyucuklar plate yıkayıcıda 4 kez yıkama tamponu ile yıkandı.
- 5-Kör hariç tüm kuyucuklara 100 μ L Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- 6- Kuyucuklar plate yıkayıcıda 4 kez yıkama tamponu ile yıkandı.
- 7-Tüm kuyucuklara 100 μ L TMB solüsyonu eklendi ve karanlıkta, oda sıcaklığında 25 dakika inkübe edildi. Kuyucuklar IL-1 β konsantrasyonuna bağlı mavi renk aldı.
- 8- Tüm kuyucuklara 100 μ L stop solüsyonu eklendi ve kuyucuklar sarı renk aldı.
- 9- Kuyucukların absorbanları 450 nm dalga boyunda Biotek marka ELISA okuyucu kullanılarak okundu.



Şekil 3.6. IL-1 β standart grafiği (r^2 :0.999, formül: 4 parametrelı lojistik)

Hesaplama: Gen 5 programı sayesinde elde edilen standart grafiği yardımıyla (Şekil 3.6) numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları hesaplandı. Serum IL-1 β düzeyleri pg/mL olarak verildi. Kıtte belirtilen çalışma içi CV = %4.5 (mean: 60.2 pg/mL), çalışmalar arası CV= %7.3 (mean:56.3 pg/mL).

3.3.2.5.IL-6 ELISA Ölçümü

Serum IL-6 düzeyleri, INVITROGEN marka ticari kit kullanılarak (katalog no: KHC0061) sandviç tip ELISA yöntemi ile, kit prospektüsündeki talimatlar uygulanarak tayin edildi.

Prensip: Kıtde bulunan 96 adet kuyucuğa kaplanmış olan IL-6'ya spesifik monoklonal antikorlar; serumdaki ve standartlardaki antijen olan IL-6 'ya bağlanır. Daha sonra bu antijen-antikor kompleksinin üzerine biyotinlenmiş poliklonal antikor bağlanarak sandviç kompleks meydana gelir. Plate yıkama işlemleri ile bağlanmayan materyaller ortamdan uzaklaştırılır. Son aşamada kromatik solüsyonun eklenmesi ile oluşan rengin şiddeti serumda bulunan IL-6 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

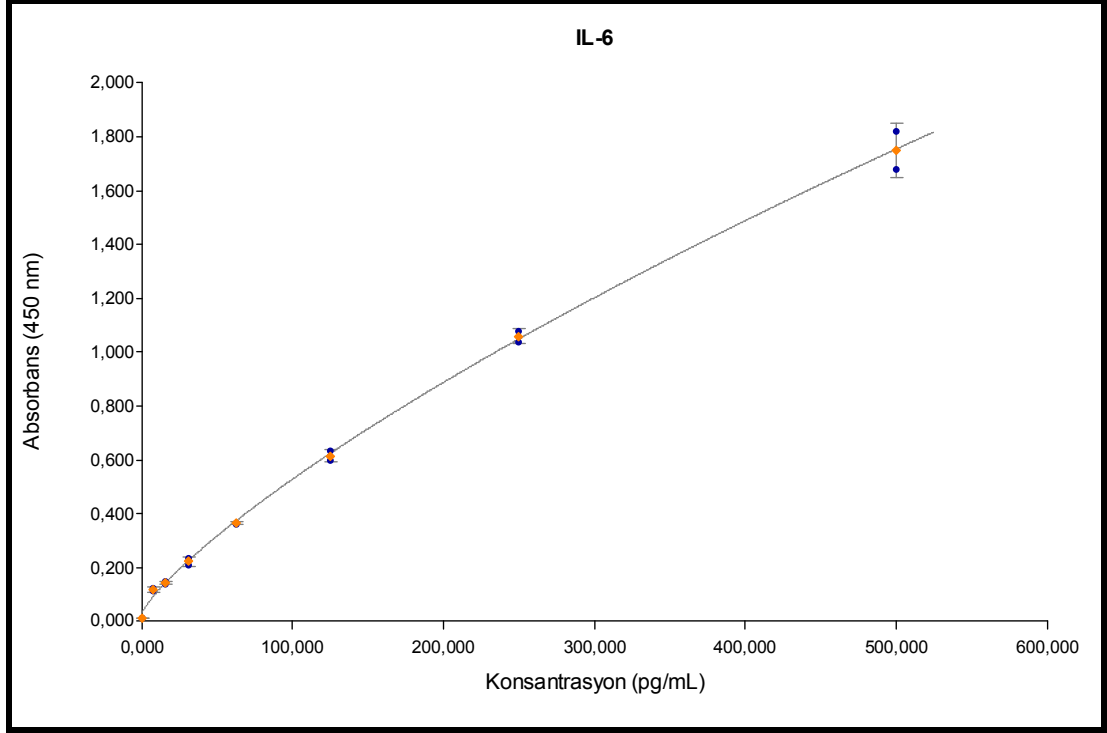
Reaktifler ve materyaller:

- 1-96 adet anti- IL-6 antikoruna ile kaplanmış kuyucuk
- 2-Recombinant Human IL-6 standartı
- 3-Standart dilüent tamponu
- 4-Biyotinlenmiş anti- IL-6 antikoruna
- 5-Streptavidin-HRP konsantratu
- 6-Streptavidin-HRP dilüenti
- 7-Yıkama tamponu
- 8-TMB solüsyonu
- 9-Stop solüsyonu

Çalışma prosedürü:

Tüm reaktifler ve serumlar oda ısısına getirildi. Liyofilize olan standart, standart dilüenti ile çözülüp arka arkaya seri dilüsyonlar yaparak yarı yarıya azalan konsantrasyonlarda 7 standartlı seri (500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8 pg/mL) elde edildi. Standart dilüenti, içeriğinde IL-6 olmayan kör solüsyonu kabul edilip belirlenmiş kuyucuklara eklendi. Daha sonra aşağıdaki şekilde çalışmaya devam edildi.

- 1-Yapılan plate planına göre önceden belirlenmiş kuyucuklara; standart dilüentinden, 7 adet standarttan ve numunelerden 100'er µL konuldu.
- 2-Kör hariç tüm kuyucuklara 50 µL biyotinlenmiş anti- IL-6 antikoruna eklendi.
- 3-Plate, cover ile kapatılıp oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.
- 4-Kuyucuklar plate yıkayıcıda 4 kez yıkama tamponu ile yıkandı.
- 5-Kör hariç tüm kuyucuklara 100 µL Streptavidin-HRP solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
- 6- Kuyucuklar plate yıkayıcıda 4 kez yıkama tamponu ile yıkandı.
- 7-Tüm kuyucuklara 100 µL TMB solüsyonu eklendi ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi. Kuyucuklar IL-6 konsantrasyonuna bağlı mavi renk aldı.
- 8- Tüm kuyucuklara 100 µL stop solüsyonu eklendi ve kuyucuklar sarı renk aldı.
- 9- Kuyucukların absorbanları 450 nm dalga boyunda Biotek marka ELISA okuyucu kullanılarak okundu.



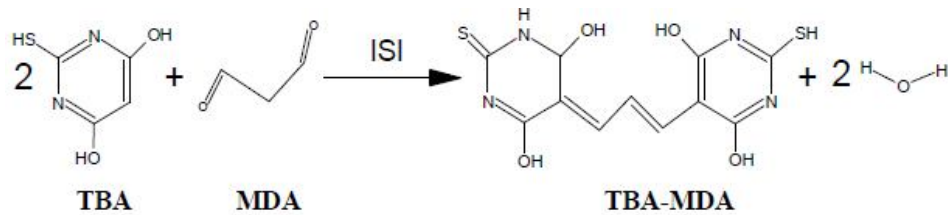
Şekil 3.7. IL-6 standart grafiği ($r^2:0.998$, formül: 4 parametrelili lojistik)

Hesaplama: Gen 5 programı sayesinde elde edilen standart grafiği yardımıyla (Şekil 3.7) numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları hesaplandı. Serum IL-6 düzeyleri pg/mL olarak verildi. Kite belirtilen çalışma içi CV = %7.7 (mean: 38.8 pg/mL), çalışmalar arası CV= %9.3 (mean:35.3 pg/mL).

3.3.2.6. MDA Ölçümü

Serum MDA düzeyleri, CAYMAN marka ticari kit kullanılarak (katalog no:10009055) Thiobarbituric Acid Reactive Substance (TBARS) yöntemi ile, kit prospektüsündeki talimatlar uygulanarak tayin edildi.

Prensip: Literatürde iyi tanımlanmış bu metoda göre MDA ve TBA, 100°C'lik yüksek ısı altında reaksiyona girerek 530 nm dalga boyunda absorbansı okunan pembe renkli bileşik oluşturur (Şekil 3.8) (87,88).



Şekil 3.8. MDA ölçüm reaksiyonu

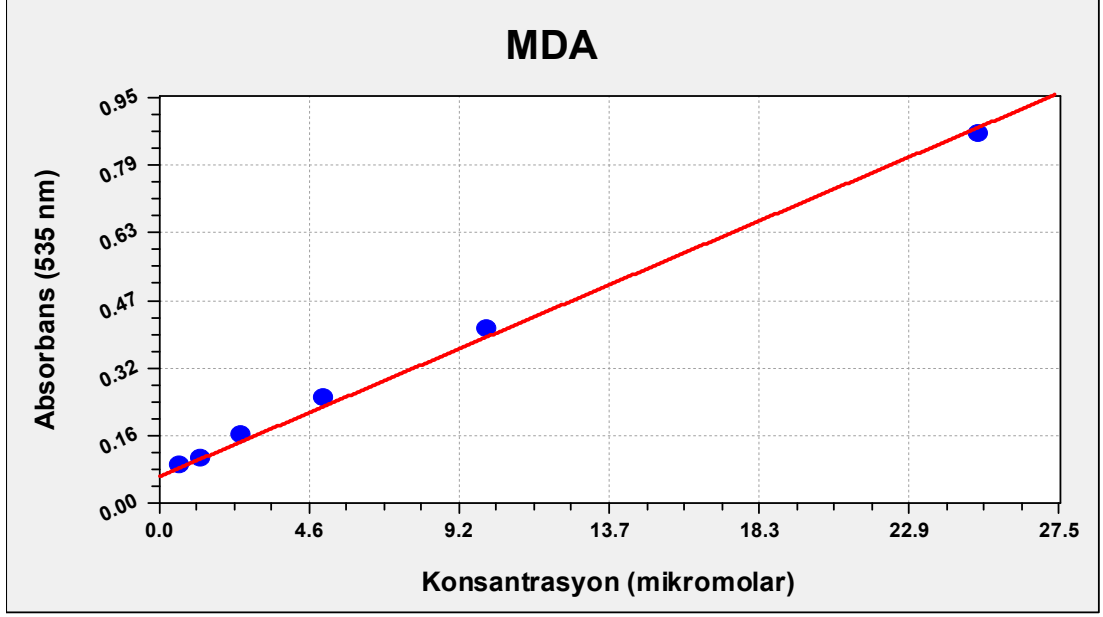
Reaktifler ve materyaller:

- 1-Tiobarbitürik asit (TBA)
- 2-Asetik asit
- 3-Sodyum hidroksit
- 4-MDA Standart
- 5-Sodyum dodesil sülfat (SDS) solüsyonu
- 6-96'lık düz tabanlı boş plate

Çalışma Prosedürü:

Tüm reaktifler ve serumlar oda ısısına getirildi. MDA standardı deiyonize su ile dilüe edilip 125µM'lık stok standart solüsyonu elde edildi. Tekrar deiyonize su ile farklı oranlarda dilüsyon yaparak 7 adet artan konsantrasyonlarda standart seri (0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 25, 50 µM) elde edildi. Prospektüste belirtilen oranlarda TBA, asetik asit ve sodyum hidroksit karıştırılıp renk reaktifi elde edildi. Deiyonize su içeriğinde MDA olmayan kör solüsyonu kabul edildi. Daha sonra aşağıdaki şekilde çalışmaya devam edildi.

- 1-5 mL'lik cam tüplere 7 adet standarttan ve numunelerden 100'er µL konuldu
- 2-Hepsinin üzerine 100 µL SDS solüsyonu eklendi.
- 3-Tüm tüplere 4 mL renk reaktifi eklendi
- 4-Tüplerin ağzı kapatılarak metal spor içinde dik şekilde kaynayan suyun içine konulup 1 saat inkübe edildi.
- 5-1 saat sonunda tüpler hızlıca soğuk su banyosuna konulup 10 dakika beklendi.
- 6-Tüm tüpler 1600 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi.
- 7-MDA konsantrasyonuna bağlı pembe renk alan tüplerin üst kısımdaki berrak sıvıdan 150'şer µL, planına göre önceden belirlenmiş plate kuyucuklarına konuldu.
- 8-Kuyucukların absorbanları 530 nm dalga boyunda Biotek marka ELISA okuyucu kullanılarak okundu.



Şekil 3.9. MDA standart grafiği ($r^2:0.995$, formül: lineer)

Hesaplama: Curve Expert 1.4 programı sayesinde elde edilen Standart grafiği yardımıyla (Şekil 3.9) numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları hesaplandı. Serum MDA düzeyleri μM olarak verildi. Kıtte belirtilen çalışma içi $\text{CV} = \%5.5-7.6$ ($n:10$), çalışmalar arası $\text{CV} = \%5.1-5.9$ ($n:8$).

3.3.2.7. PON1 lümü

Serum PON1 düzeyleri, AVISCERA BIOSCIENCE marka ticari kit kullanılarak (katalog no:SK00141-01) sandviç tip ELISA yöntemi ile, kit prospektüsündeki talimatlar uygulanarak tayin edildi. PON1'in enzim aktivitesi değil kütlesel miktarı ölçüldü.

Prensip: Kıtde bulunan 96 adet kuyucuğa kaplanmış olan PON1'e spesifik monoklonal antikorlar; serumdaki ve standartlardaki antijen olan PON1'e bağlanır. Daha sonra bu antijen-antikor kompleksinin üzerine poliklonal tespit antikoru bağlanarak sandviç kompleks meydana gelir. Plate yıkama işlemleri ile bağlanmayan materyaller ortamdan uzaklaştırılır. Son aşamada kromatik solüsyonun eklenmesi ile oluşan rengin şiddeti serumda bulunan PON1 konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Reaktifler ve materyaller:

- 1-96 adet anti- PON1 antikoruna ile kaplanmış kuyucuk
- 2-Recombinant Human PON1 standardı
- 3-Tespit antikoruna
- 4-Anti-Tavşan IgG-HRP
- 5-HRP dilüenti
- 6-Dilüsyon tamponu
- 7-Yıkama tamponu
- 8-TMB solüsyonu
- 9-Stop solüsyonu

Çalışma prosedürü:

Tüm reaktifler ve serumlar oda ısısına getirildi. Liyofilize olan standart, standart dilüenti ile çözülüp arka arkaya seri dilüsyonlar yaparak yarı yarıya azalan konsantrasyonlarda 8 standartlı seri (200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56 ng/mL) elde edildi. Dilüsyon tamponu, içeriğinde PON1 olmayan kör solüsyonu kabul edilip belirlenmiş kuyucuklara eklendi. Tüm numuneler dilüsyon tamponu ile bire bir sulandırıldı. Daha sonra aşağıdaki şekilde çalışmaya devam edildi.

1-Yapılan plate planına göre önceden belirlenmiş kuyucuklara; dilüsyon tamponundan, sekiz adet standarttan, pozitif kontrolden ve numunelerden 100'er µL konuldu.

2-Plate, 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

3-İnkübasyon sonunda yıkama tamponu ile tüm kuyucuklar 3 kez yıkandı.

4-Tüm kuyucuklara 100 µL tespit antikoruna konuldu ve oda sıcaklığında 2 saat daha inkübe edildi.

5-Tüm kuyucuklar yıkama tamponu ile tekrar 3 kez yıkandı.

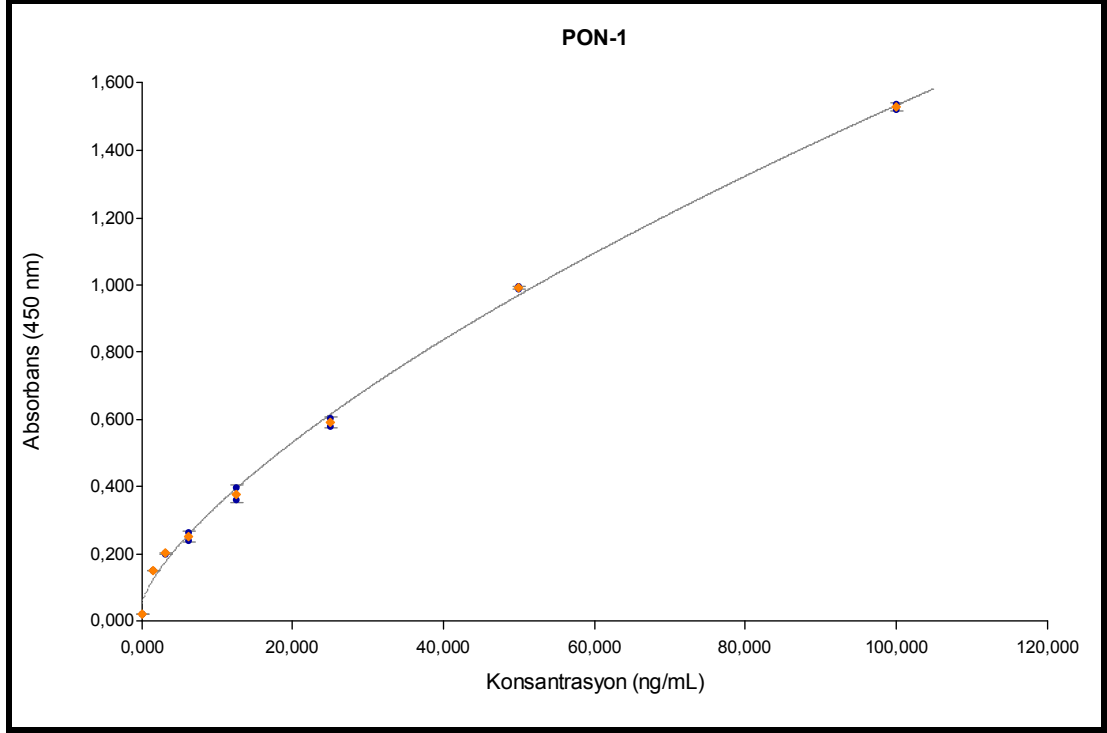
6-Anti-tavşan IgG HRP solüsyonundan tüm kuyucuklara 100 µL konulup 60 dakika oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi.

7-Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.

8-TMB solüsyonundan 100'er µL tüm kuyucuklara konulup oda sıcaklığında ve karanlıkta 5 dakika inkübe edildi.

9-Tüm kuyucuklara stop solüsyonundan 100 µL eklendi.

10-Kuyucukların absorbansları 450 nm dalga boyunda, Biotek marka ELISA okuyucu kullanılarak okundu.



Şekil 3.10. PON-1 standart grafiği ($r^2:0.998$, formül: 4 parametrelili jistik)

Hesaplama: Gen 5 programı sayesinde elde edilen Standart grafiği yardımıyla (Şekil 3.10) numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları hesaplandı. Serum PON-1 düzeyleri ng/mL olarak verildi. Kite belirtilen çalışma içi CV = %4-6 , çalışmalar arası CV= %8-12.

3.4.İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Veriler IBM SPSS Statistics 20.0 paket programında değerlendirildi. Her gruptaki katılımcı sayısı, tablolarda “n” olarak gösterildi. Verilerin normal dağılımına Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerin özet istatistikleri aritmetik ortalama \pm standart sapma ($X \pm SD$); normal dağılım göstermeyen değişkenlerin özet istatistikleri median (%25-%75) şeklinde verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda normal dağılım gösteren değişkenler için bağımsız örneklerde t testi, normal dağılım göstermeyen değişkenler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Sayısal değişkenler arasındaki ilişki normal dağılım gösteren değişkenler için Pearson Korelasyon Analizi ile normal dağılım göstermeyen değişkenler için Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi Yöntem karşılaştırılmasında regresyon analizi ve MedCalc 12.7.5.0 programındaki Bland-Altman grafiği kullanıldı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Ana Bilim Dalı'nda hiperkolesterolemi tanısı konulan 50 hasta ve sağlıklı 30 gönüllü çalışma kapsamına alındı. Çalışma gruplarına ait veriler; demografik bulgular, rutin analiz bulguları ve biyokimyasal çalışma bulguları şeklinde gösterildi.

4.1. DEMOGRAFİK BULGULAR

Çalışma kapsamına dahil edilen 50 hastanın yaş ortalaması 46.94 ± 9.11 yıl, 30 gönüllünün yaş ortalaması ise 46.26 ± 8.11 olarak bulundu. Cinsiyet dağılımı ve yaş ortalamaları bakımından, çalışma grupları arasında istatistiksel olarak fark görülmedi ($p > 0.05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Bulguları

Parametreler	Hasta Grubu (n:50)	Kontrol Grubu (n:30)	<i>p</i>
Yaş (yıl)	46.94 \pm 9.11	46.26 \pm 8.11	0.740
Cinsiyet (E-K)	18 (%36) - 32 (%64)	11 (%36.6) – 19 (%63.4)	0.952
Kilo (kg)	61.50 (56 - 72)	62.00 (58 - 73)	0.560
Boy (m)	1.61(1.54-1.71)	1.59 (1.58-1.76)	0.344
VKİ (kg/m ²)	23.95 (23.01-24.56)	23.85 (22.97-24.46)	0.376

Tablo 4.1’de görüldüğü gibi hasta ve kontrol grupları arasında kilo, boy ve vücut kütle indeksi (VKİ) değerlerinde istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p > 0.05$).

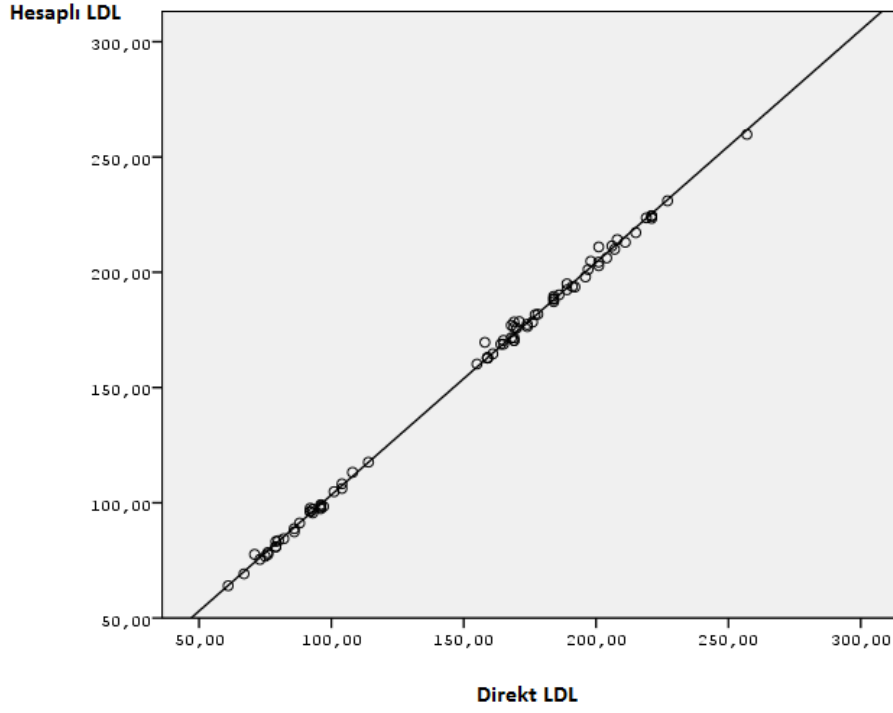
4.2. RUTİN ANALİZ BULGULARI

Çalışma gruplarında ölçülen Total Kolesterol, Trigliserid, Hesaplı LDL ve Direkt LDL değerleri; hiperkolesterolemili hastalarda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuşken HDL değeri hiperkolesterolemililerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (Tablo 4.2). Hasta grubunda LDL seviyeleri erkeklerde ortalama 187.16 ± 21.67 mg/dL, kadınlarda 186.59 ± 23.23 mg/dL bulunmuş, kontrol grubundaki LDL seviyeleri ise erkeklerde ortalama 86.27 ± 13.47 mg/dL, kadınlarda 88.57 ± 12.53 mg/dL bulunmuş ve her iki grupta da erkek-kadın arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır ($p=0.648$, $p=0.932$)

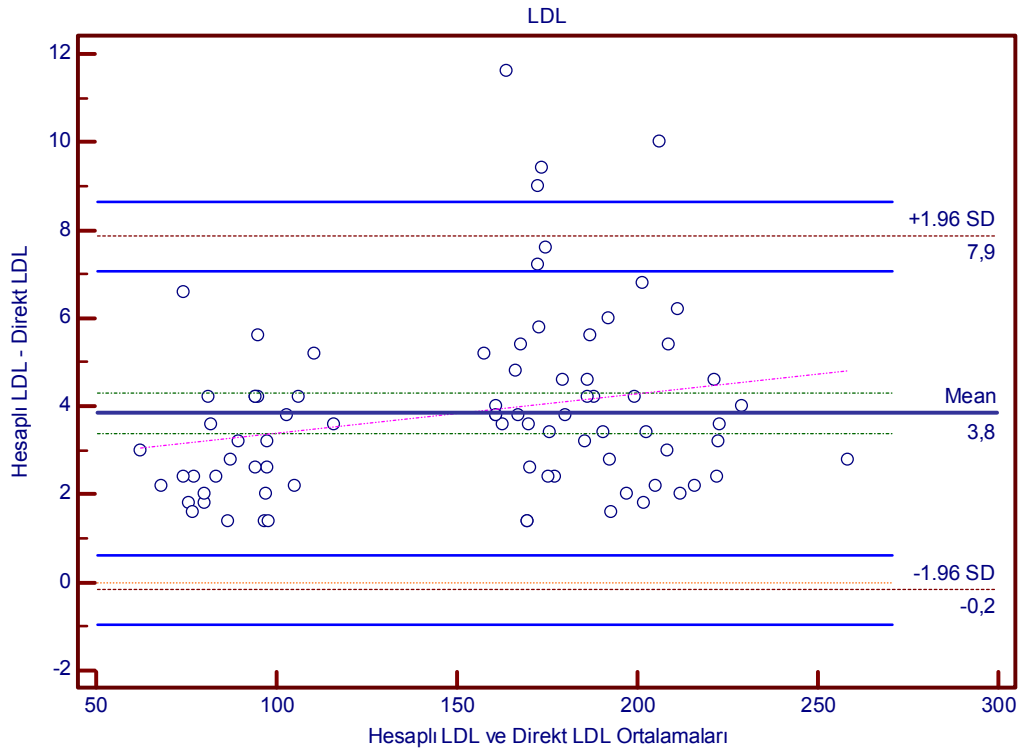
Tablo 4.2. Hasta ve Kontrol Grubunun Rutin Çalışma Bulguları

Parametreler	Hasta Grubu (n:50)	Kontrol Grubu (n:30)	<i>p</i>
T. Kolesterol (mg/dL)	264 (254-287)	158 (147-169)	<0.001
HDL (mg/dL)	41.84 ± 7.06	47.33 ± 8.24	<0.05
Trigliserid (mg/dL)	166 (147-205)	98 (78-117)	<0.001
Hesaplı LDL (mg/dL)	188.40 (171.60-206.20)	93.40 (80.80 - 98.40)	<0.001
Direkt LDL (mg/dL)	184 (169-201)	90 (79-96)	<0.001

Friedewald formülü ile hesaplanan LDL ile direkt LDL’nin karşılaştırılması için yapılan regresyon analizinde $r^2=0.999$ hesaplanmış, elde edilen formül ise: $y=1.008x + 2.602$ olarak bulunmuştur ($p<0.001$) (Şekil 4.1). Aynı parametrelerin yöntem karşılaştırması için yapılan diğer bir analiz olan Bland-Altman ortalamalar-farklar grafiğinde ± 1.96 SD aralığının dışında 4 nokta olduğu, hesaplanan LDL- direkt LDL farkının genelde sıfırın üstünde olduğu görülmektedir. Farkların -0.2 ile 7.9 arasında olduğu ve farklar ortalamasının etrafında sistematik bir dağılım göstermediği, rassal bir dağılım gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Hesaplı LDL ve Direkt LDL (mg/dL) karşılaştırılmasında regresyon analizi. ($r^2:0.999$, $y=1.008x + 2.602$, $p<0.001$)



Şekil 4.2. Hesaplı LDL ve Direkt LDL (mg/dL) karşılaştırılmasında Bland-Altman ortalamalar-farklar grafiği

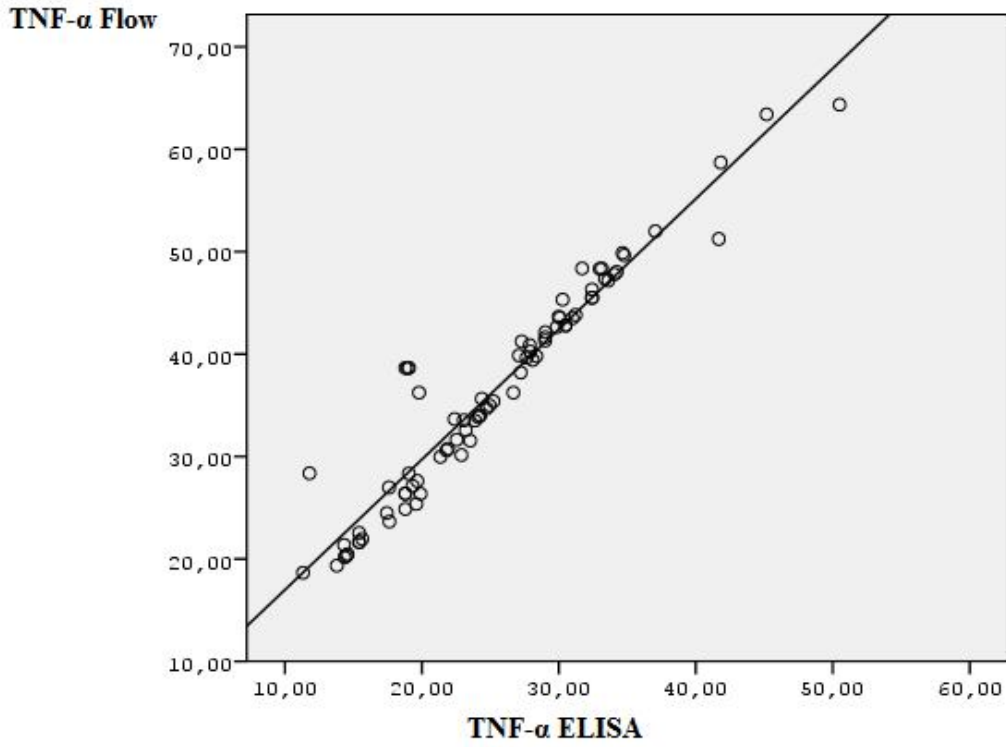
4.3. BİYOKİMYASAL ANALİZ BULGULARI

Hiperkolesterolemili hastalarda ölçülen TNF- α , IL-1 β , IL-6 (ELISA ve Flow), ve MDA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuşken hiperkolesterolemililerde PON1 değeri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0.001$) (Tablo 4.3).

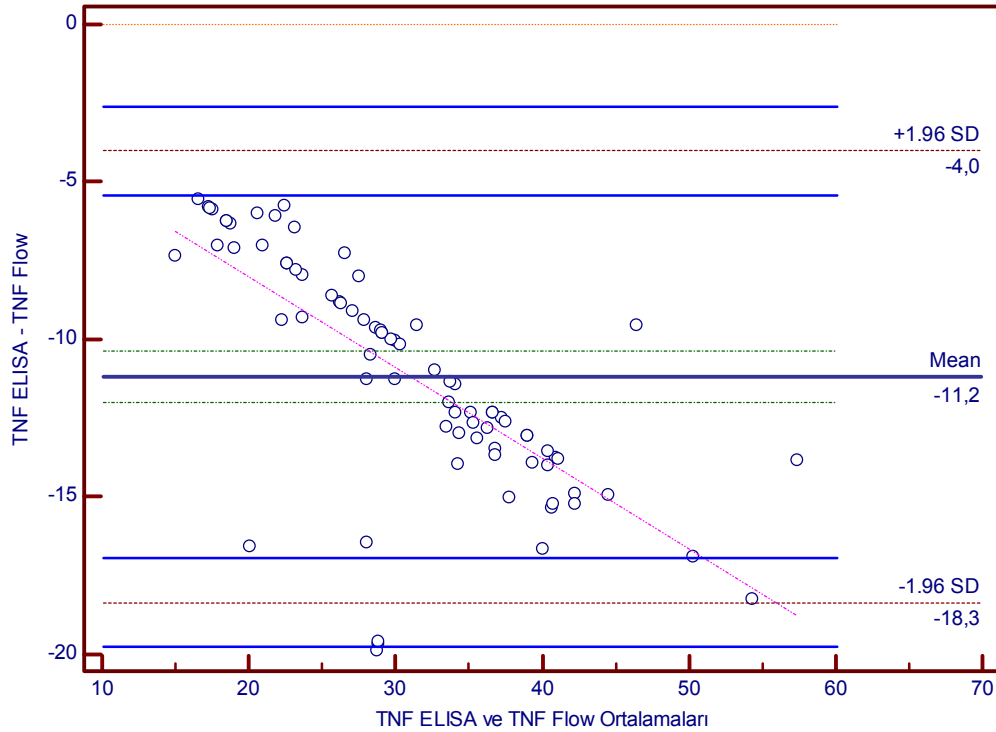
Tablo 4.3. Çalışma gruplarının biyokimyasal analiz bulguları

Parametreler		Hasta Grubu (n:50)	Kontrol Grubu (n:30)	<i>p</i>
TNF- α (pg/mL)	ELISA	28.76 \pm 6.66	19.18 \pm 6.40	<0.001
	FLOW	41.11 \pm 8.86	29.04 \pm 8.29	<0.001
IL-1 β (pg/mL)	ELISA	42.6 (39.64-45.74)	30.68 (27.63-35.02)	<0.001
	FLOW	45.22 (41.20-48.02)	32.06 (28.45-36.41)	<0.001
IL-6 (pg/mL)	ELISA	45.85 (38.41-52.38)	39.49 (30.72-40.93)	<0.001
	FLOW	46.51 (39.65-53.98)	40.35 (33.54-42.54)	<0.001
MDA (μ M)		6.04 (5.11-7.53)	1.60 (1.36-2.94)	<0.001
PON-1 (ng/mL)		9.30 (7.36-11.26)	16.20 (13.37-20.96)	<0.001

TNF- α ölçümünde kullanılan ELISA ve Flow sitometri yöntemlerinin karşılaştırılması için yapılan regresyon analizinde $r^2=0.919$ hesaplanmış, elde edilen formül ise: $y=1.273x + 4.260$ olarak bulunmuştur ($p<0.001$) (Şekil 4.3). Aynı parametre için yapılan Bland-Altman ortalamalar-farklar grafiğinde ± 1.96 SD aralığının dışında 3 nokta olduğu, ELISA - Flow farkının sıfırın altında olduğu, farkların -4 ile -18.3 arasında olduğu görülmektedir. Fakat çoğu örnekte ortalamalar arttıkça farkların düzenli şekilde azaldığı yani oransal bir hatanın mevcut olduğu görülmektedir (Şekil 4.4).

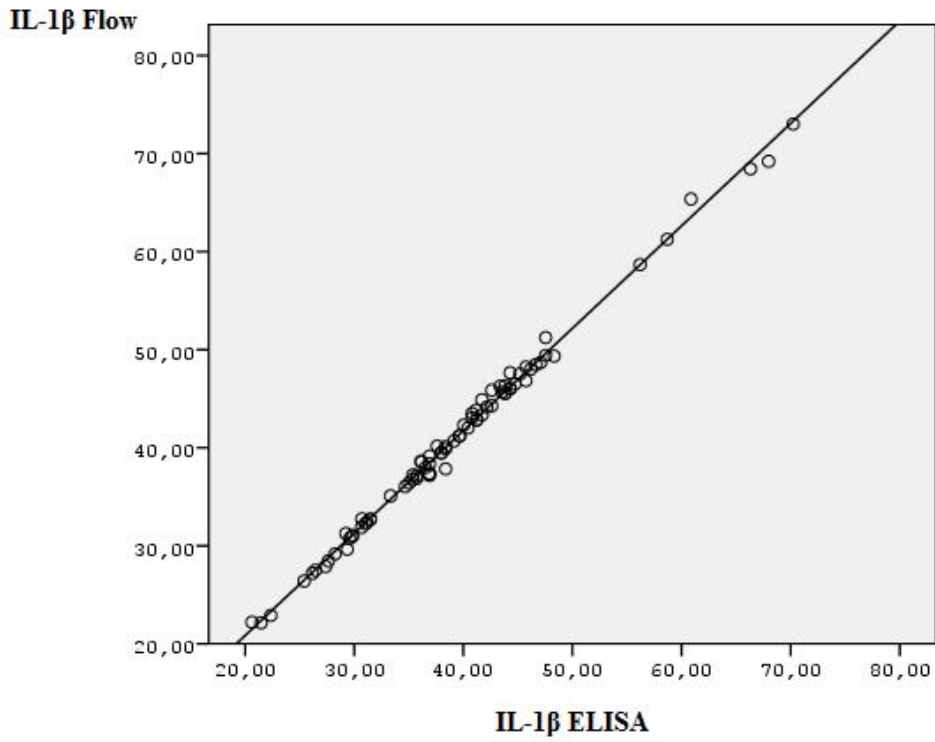


Şekil 4.3. TNF- α 'nın ELISA ve Flow (pg/mL) yöntemlerinin karşılaştırılmasında regresyon analizi. ($r^2:0.919$, $y=1.273x + 4.260$, $p<0.001$)

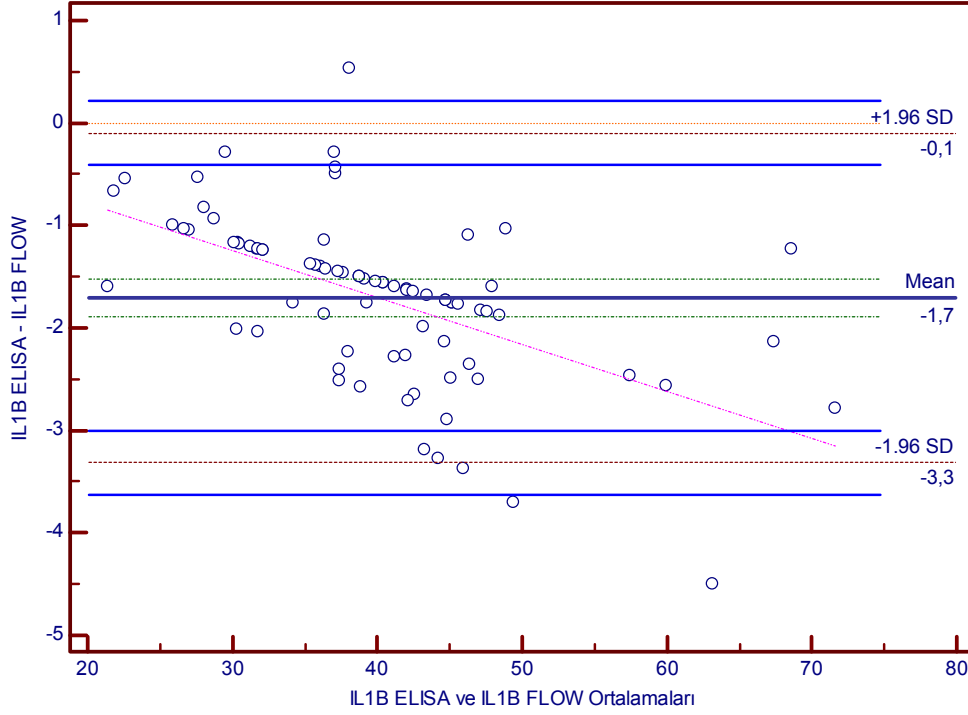


Şekil 4.4. TNF- α 'nın ELISA ve Flow (pg/mL) yöntemlerinin karşılaştırılmasında Bland-Altman ortalamalar-farklar grafiği

IL-1 β ölçümünde kullanılan ELISA ve Flow sitometri yöntemlerinin karşılaştırılması için yapılan regresyon analizinde $r^2=0.995$ hesaplanmış, elde edilen formül ise: $y=1.044x - 0.039$ olarak bulunmuştur ($p<0.001$) (Şekil 4.5). Aynı parametre için yapılan Bland-Altman ortalamalar-farklar grafiğinde ± 1.96 SD aralığının dışında 3 nokta olduğu, ELISA - Flow farkının genelde sıfırın altında olduğu görülmektedir. Farkların -0.1 ile -3.3 arasında olduğu ve farklar ortalamasının etrafında sistematik bir dağılım göstermediği, rassal bir dağılım gösterdiği, bazı örneklerde ortalamalar arttıkça farkların düzenli şekilde azaldığı görülmektedir (Şekil 4.6).

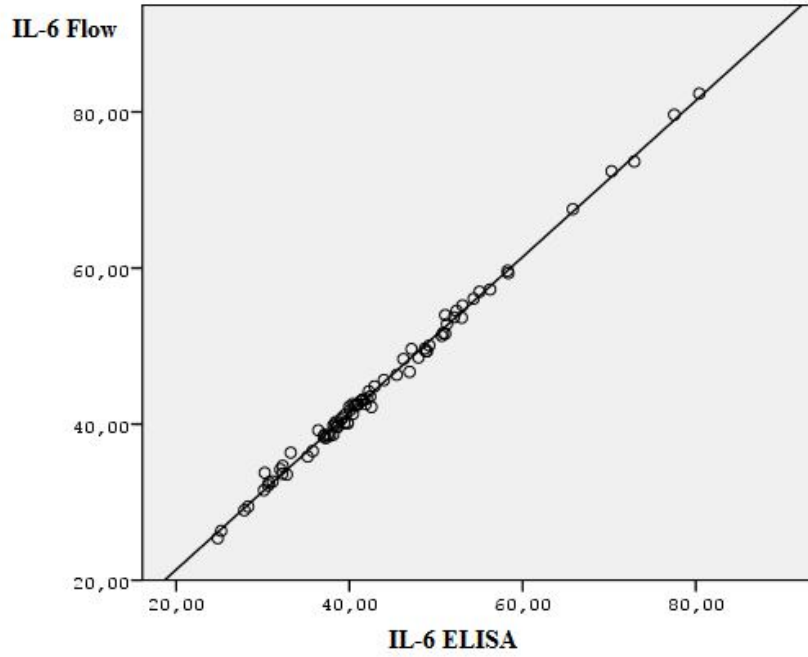


Şekil 4.5. IL-1 β 'nın ELISA ve Flow (pg/mL) yöntemlerinin karşılaştırılmasında regresyon analizi. ($r^2:0.995$, $y=1.044x - 0.039$, $p<0.001$)

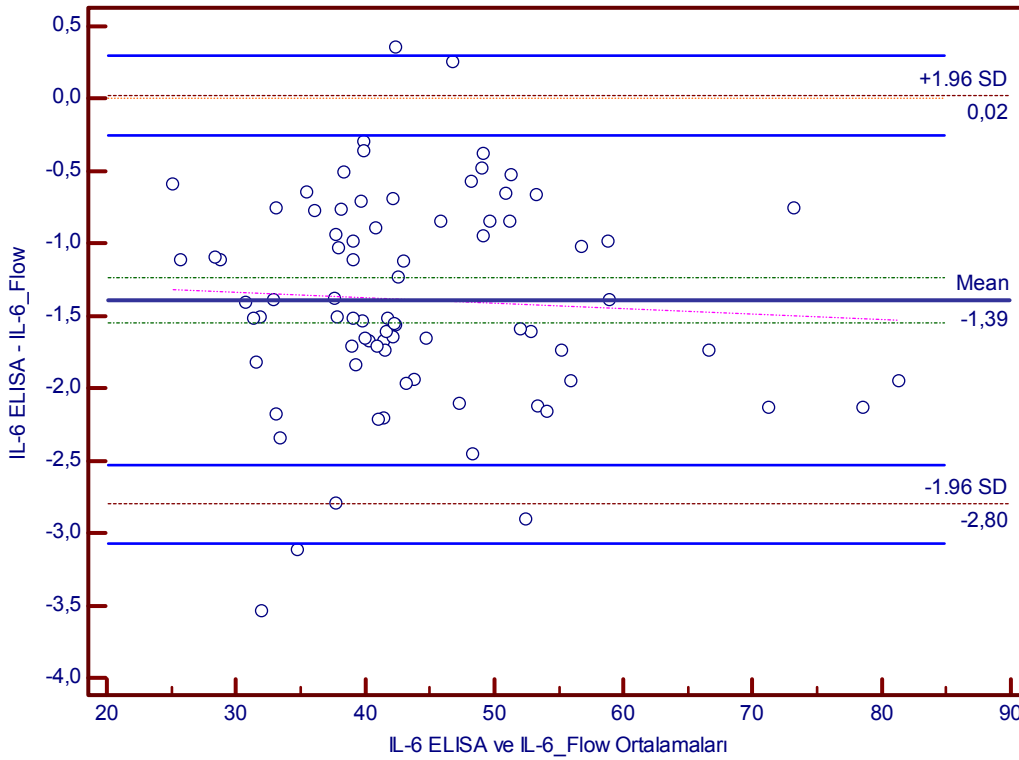


Şekil 4.6. IL-1β'nin ELISA ve Flow (pg/mL) yöntemlerinin karşılaştırılmasında Bland-Altman ortalamalar-farklar grafiği

IL-6 ölçümünde kullanılan ELISA ve Flow sitometri yöntemlerinin karşılaştırılması için yapılan regresyon analizinde $r^2=0.996$ hesaplanmış, elde edilen formül ise: $y=1.002x + 1.325$ olarak bulunmuştur ($p<0.001$) (Şekil 4.7). Aynı parametre için yapılan Bland-Altman ortalamalar-farklar grafiğinde ± 1.96 SD aralığının dışında 4 nokta olduğu ELISA - Flow farkının genelde sıfırın altında olduğu görülmektedir. Farkların -2.8 ile 0.02 arasında olduğu ve farklar ortalamasının etrafında sistematik bir dağılım göstermediği, rassal bir dağılım gösterdiği görülmektedir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7. IL-6'nın ELISA ve Flow (pg/mL) yöntemlerinin karşılaştırılmasında regresyon analizi. ($r^2:0.996$, $y=1.002x + 1.325$, $p<0.001$)



Şekil 4.8. IL-6'nın ELISA ve Flow (pg/mL) yöntemlerinin karşılaştırılmasında Bland-Altman ortalamalar-farklar grafiği

Tablo 4.4. Parametreler arasındaki korelasyonlar

		T.Kolesterol		HDL		Direkt LDL	
		<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
TNF- α	ELISA	0.491	<0.001	-0.376	<0.05	0.520	<0.001
	FLOW	0.453	<0.001	-0.346	<0.05	0.476	<0.001
IL-1 β	ELISA	0.622	<0.001	-0.397	<0.001	0.634	<0.001
	FLOW	0.637	<0.001	-0.397	<0.001	0.653	<0.001
IL-6	ELISA	0.391	<0.001	-0.052	0.645	0.366	<0.05
	FLOW	0.375	<0.001	-0.047	0.681	0.356	<0.05
MDA		0.701	<0.001	-0.223	<0.05	0.683	<0.001
PON-1		-0.633	<0.001	0.357	<0.05	-0.665	<0.001

Yapılan korelasyon analizleri sonucunda; T. Kolesterol ve Direkt LDL ile TNF- α , IL-1 β , IL-6 (ELISA ve Flow) ve MDA arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde pozitif korelasyon tespit edilmişken, PON-1 ile arasında negatif korelasyon bulunmuştur. HDL ile TNF- α , IL-1 β (ELISA ve Flow) ve MDA arasında istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon bulunmuşken, PON-1 ile arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. HDL ile IL-6 (ELISA ve Flow) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır (Tablo 4.4).

5.TARTIŞMA

Tüm dünyada ölüm nedenlerinin başında bulunan kalp hastalıklarının oluşmasında etkisi olan ateroskleroz, büyük oranda hiperkolesterolemi sonucunda meydana gelmektedir. Literatürde ateroskleroz oluşumunda; dolaşımda fazla miktarda bulunan lipoproteinlerin oksidasyona uğraması ve damar duvarında birikerek lezyonlara yol açması teorisi büyük kabul görmüştür (39). Aterogenezin ilk evresindeki yağlı çizgilenmelerin histopatogenezinde LDL fagosite etmiş makrofajlar bulunur. Daha sonra oluşan fibröz plağın büyümesinde diğer risk faktörleri etkilidir. Stabil olmayan plak döneminde de fibröz plaklar yırtılır ve pıhtı meydana gelir. Yükselmiş olan LDL seviyeleri olgun koroner plak gelişiminde ve plak stabilizasyonunun bozulmasında rol oynar (40,41). Bu şekilde anstabil anginadan ST yükselmeli miyokard infarktüsüne kadar değişen kalp hastalıklarına zemin hazırlanmış olur.

Aterosklerozda LDL seviyeleri ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. Brown ve ark (45), yaptıkları hayvan çalışmasında 80 mg/dL altındaki LDL seviyelerde aterosklerozun gelişmediğini saptamışlardır. McGill ve ark (48), yaptıkları çalışmada 100 mg/dL'nin üzerindeki LDL seviyelerinin aterojenik olduğunu göstermişlerdir. Yaşam boyu KAH riski için yapılan diğer çalışmalarda LDL seviyesi; 130-159 mg/dL sınırdan yüksek, 160-189 mg/dL yüksek, >190 mg/dL çok yüksek riskli grup olarak belirlenmiştir (25,43). Türkiyede yapılan çalışmalardan Türk Kalp Çalışması'nda normal popülasyonda LDL erkekte 136 mg/dL, kadında 111 mg/dL bulunmuş, METSAR'da LDL, erkekte 98.5 mg/dL, kadında 100.5 mg/dL bulunmuştur (36, 38).

Bizim çalışmamızda hasta grubunda Total Kolesterol 264 (254-287) mg/dL , Direkt LDL seviyesi 184 (169-201) mg/dL bulunmuş, kontrol grubunda ise Total Kolesterol 158 (147-169) mg/dL , Direkt LDL seviyesi 90 (79-96) mg/dL bulunmuştur. Literatüre göre hiperkolesterolemili hasta grubunun ortalaması yaşam boyu KAH riski yüksek gruba girmektedir. Kontrol grubundaki LDL ise Türkiye ortalamasının altında bir seviyede bulunmuştur. Ayrıca hem hiperkolesterolemi grubunda hem de kontrol grubunda erkek ve kadınlar arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Sağlıklı kontrol grubunda LDL seviyelerinin Türkiye ortalamasından farklı çıkmasının ve kadın erkek farkının olmamasının, kontrol sayısının 30 olması ve genel popülasyonu tam olarak yansıtmamasına bağlı olduğu kanaatindeyiz. Aterosklerozda koruyucu rol oynayan HDL seviyeleri de hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur.

Çalışmamızda hasta grubu seçilirken herhangi bir hastalığı olanlar, ilaç kullananlar, daha önce lipid düşürücü ilaç tedavisi alanlar çalışma dışında bırakılmış sadece hiperkolesterolemisi olanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Sağlıklı kişilerden oluşan kontrol grubu ile hasta grubu arasında; yaş, cinsiyet, kilo, boy, ve VKİ değerleri bakımından istatistiksel bir fark bulunmamış olması da etki edebilecek diğer tüm faktörlerin dışlanmış olmasına katkıda bulunmuştur.

LDL ölçümü yapılırken maliyet ve zamandan kazanmak için Friedewald formülü çok yaygın kullanılmaktadır. Formülde Total Kolesterol içindeki VLDL miktarı, Trigliseridin 5'e bölünmesi ile saptanmış ve LDL'nin yaklaşık hesabı yapılmıştır. Bu formül Trigliseridin 400 mg/dL üzerinde olması durumunda ve Tip III hiperlipoproteinemili hastalarda kullanılması uygun değildir. Bu durumlarda otoanalizörlerde mevcut olan Direkt LDL kiti ile ölçüm yapılmaktadır (89).

Martin ve ark (90), diyabetli hastalarda LDL ölçümünde Friedewald formülü ile direkt metodun karşılaştırmasında, uyumun LDL seviyesine göre değişebileceğini göstermişlerdir. Timón ve ark (91), iki yöntemin karşılaştırmasında çok düşük ve çok yüksek HDL seviyelerinin de etkili olabileceğini göstermişlerdir. Tanno ve ark (92), yaptıkları geniş kapsamlı çalışmalarında iki yöntem arasındaki uyumunun yüksek olduğunu ve bu uyum derecesinin açıklıkla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Genellikle farklı iki yöntem arasındaki uyumu bulmak için yapılan çalışmalarda korelasyon ve regresyon analizleri kullanılır. Uyumu araştırmada bu tekniklerin kullanılması aşağıdaki nedenlerden dolayı uygun değildir (93):

1. Korelasyonun derecesi örnekledeki sonuçların dağılım genişliğine bağlıdır. Korelasyon, dağılım genişliği büyük olan örneklemlerde, dar olan örneklemlere göre daha yüksek çıkar. Örneğin bu durum 3.0 ve 5.5 g/dL gibi dar dağılım genişliğine sahip albümin ölçümleri için dezavantajken, 0 ve 43 gibi büyük dağılım genişliğine sahip ALT ölçümleri için avantajdır. Atkinson ve Nevill (94), makalelerinde uyum düzeyleri tamamen eşit fakat dağılım genişlikleri farklı olan iki veri setinden elde edilen korelasyon katsayılarının çok farklı bulunduğunu örnek üzerinde göstermişlerdir.

2. Korelasyon katsayısının anlamlılığının testi, “iki yöntem arasında bağıntı yoktur” hipotezinin testidir. Aynı değeri ölçmek için dizayn edilen iki yöntemin ilişkili olup olmadığını test etmek gereksizdir.

3. İki yöntem zayıf uyuma sahip olduğu halde yüksek korelasyon gösterebilir. Örneğin A yöntemi, B yöntemi ile elde edilen değerlerin tam 2 katını veriyorsa, iki yöntemin sonuçları arasında tam bir korelasyon bulunurken zayıf bir uyumluluk elde edilecektir.

4. Doğrusal regresyon analizi yöntem karşılaştırma çalışmalarında kullanılan diğer bir tekniktir. Regresyon analizinin amacı, noktalara en yakın doğruyu çizebilmek için a ve b katsayılarını kestirmektir. a ve b katsayılarının anlamlılık testi 0'a karşı yapılır. Fakat uyumu göstermede regresyon analizi kullanılacaksa regresyon eğrisi $a=0$ ve $b=1$ 'e karşı test edilmelidir. Yani iki yönteme ait değerler saçılım grafiğinde eşitlik çizgisi (line of equality) üzerinde olmalıdır.

5. Regresyon analizi x bağımsız değişkeni ile y bağımlı değişkeni arasındaki ilişkiyi inceler. Uyumu göstermede regresyon analizi kullanılırken hangi yönteme ait verilerin x, hangilerinin y olarak kabul edilmesi gerektiğine dair bir bilgi yoktur.

6. Regresyon katsayısı da korelasyon katsayısı gibi dağılım genişliğinden etkilenir.

Bland ve Altman (95), yöntem karşılaştırması için regresyon analizini yukarıdaki nedenlerden dolayı yetersiz bulmuş ve yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yönteme göre ölçümlerin ortalamalarına karşı farklarının saçılım grafiği çizilir. Farklara karşı ortalamaların grafiği ölçüm hataları ile gerçek değerler (gerçek değerler elde

edilemediğinden onun en iyi kestiricisi olan ortalamalar) arasında olabilecek herhangi bir ilişkinin incelenmesine olanak sağlar. Ayrıca bu grafikten yan'ın (bias) (farkların sistematik olarak 0'dan farklı olup olmadığının) ve hatanın (farkların ne kadar yaygın olduğunun) incelenmesi de mümkündür (96).

Bizim çalışmamızda Trigliserid düzeyi 400 mg/dL üzerinde bir birey olmamasına rağmen LDL seviyeleri hem hesapla hem de direkt methodla ölçülmüş ve yöntem karşılaştırması yapılmıştır. Karşılaştırma yapılırken sık kullanılan yöntem olan regresyon analizi ile beraber Bland-Altman grafiği ile de değerlendirme yapılmıştır. Yapılan regresyon analizinde katsayının yüksek bulunması ($r^2=0.999$) nedeniyle çalışma grubumuzda iki yöntemin uyumunun tam olduğu söylenebilir. Bland – Altman grafiğinde de dağılımın farklar ortalamasının etrafında rassal bir saçılım göstermesi ve ± 1.96 SD aralığının dışında 4 noktanın olması sebebiyle yine iki yöntemin uyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Fakat grafikteki farkların ortalamasının sıfırın üzerinde değer olan 3.8 olması ve aralığın -0.2 ile 7.9 arasında olması birçok sonuçta Hesaplı LDL'nin Direkt LDL'den değer olarak daha yüksek olduğunu gösterdi. LDL'nin 100 mg/dL'nin altında olduğu değerlerde bu fark göz ardı edilebilecek iken özellikle 100, 130, 160, 190 mg/dL gibi sınır değerlere yakın ölçümlerde çıkabilecek farklar KAH riskinin tam belirlenebilmesi açısından problem oluşturacağı kanaatindeyiz. Sınır değerlere yakın Hesaplı LDL sonucu çıkan bireylerin ölçümünün Direkt ölçümle doğrulanması ve tanı, tedavi, takibin buna göre değerlendirilmesi gerektiğini düşünüyoruz.

Antiviral, antiparazitik, glikojenolitik, osteoklastik ve lipolitik etkileri olan TNF- α 'nın birçok hastalık için güçlü proinflamatuvar etkileri vardır (55). Kleemann ve ark (8), TNF- α düzeylerinin artmış rekürren MI, karotid intima-mediasında aterosklerotik kalınlaşma, trigliserit ve glukoz homeostazında bozukluklar ve yaşa bağlı aterosklerozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Branen ve ark (56) TNF- α 'nın ateroskleroz gelişiminde katkısı olduğunu ve korunma için muhtemel bir hedef olduğunu belirtmişlerdir. Pereira ve ark (97), statin verilen önceden kalp krizi geçirmiş hiperkolesterolemililerde yine statin verilip daha önce kalp krizi geçirmeyen hiperkolesterolemilere göre TNF- α seviyelerinin daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Balanescu ve ark (98), hiperkolesterolemili hastalarda erken aterom formasyonu ile TNF- α düzeylerinin ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Hong ve ark

(99) ise aortik plağı olup kliniğı olmayan hastalarda yaptıkları çalışmada TNF- α seviyesinin subklinik aterosklerozla önemli bir ilişkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda hiperkolesterolemili hastalarda TNF- α düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Herhangi bir şikayeti ve klinik durumu olmayan hiperkolesterolemili hastalarda yüksek bulunan TNF- α , literatürdeki bulguların çoğuna destek olarak aterosklerozun oluşmasında ve büyümesinde etkisi olması bakımından belirleyici bir parametre olabileceğı kanaatindeyiz. Bu çalışma ile elde edilen verilerden, hiperkolesterolemisi olan hastalarda bulunacak yüksek TNF- α seviyelerinin ateroskleroz plağı açısından risk oluşturabileceğini akıldan çıkarmamak gerektiğini düşünüyoruz. Fakat bir çok hastalıkta seviyeleri artabileceğı için spesifik parametre olma ihtimali düşük olacaktır.

Çalışmamızda TNF- α ile Total Kolesterol ve LDL arasında pozitif, HDL ile arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Literatürde bu bulguyu destekleyen ve aksini gösteren çalışmalar mevcuttur. Mizia-Stec ve ark (100), hiperlipidemili hastalarda yaptıkları çalışmada TNF- α ile Trigliserid arasında pozitif, HDL ile negatif korelasyon saptamışlardır. Jiang ve ark (101) da yaptıkları çalışmada TNF- α ve LDL arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Calza ve ark (102) ise statin kullanan hiperkolesterolemili kişilerde yaptıkları çalışmada tüm lipid düzeyleri ile TNF- α arasında bir korelasyon saptamamışlardır. Bizim çalışmamızla, Total kolesterol ve LDL arttıkça TNF- α seviyesinin de korele olarak artışının, ateroskleroza gidişini kolaylaştırdığı desteklenmiş oldu.

Sitokinlerin ölçümü için ülkemizde yeni yeni kullanılmaya başlanan, üniversitemizde ilk defa bu çalışma ile denenen Flow sitometri yöntemi, ELISA yöntemine göre daha spesifik olması ve analitik ölçüm aralığının daha geniş olması bakımından önem kazanmıştır. 30 farklı parametrenin 50 μ L örnekle aynı zamanda tek seferde çalışılabilmesi ve kendi bilgisayar programları sayesinde oluşan kirliliğın temizlenebilmesi de diğer yöntemlere göre Flow sitometri yönteminin avantajlarından. Bu sayede daha az örnek miktarıyla gerekli ölçümler daha kısa sürede yapılabilmektedir.

Bu çalışmada biz de TNF- α , IL-1 β ve IL-6 seviyelerini hem boncuklu Flow sitometri yöntemiyle hem de ELISA yöntemiyle çalışıp karşılıklı değerlendirdik.

Carson ve Vignali (103), onbeş sitokin için yaptıkları çalışmada ELISA ve Flow yöntemini karşılaştırmış, TNF- α için yapılan analizde iki yöntemin uyumlu olduğunu ve Flow yönteminin daha sensitif olduğunu göstermişlerdir. Chen ve ark (104), TNF- α için ELISA ve Flow yöntemlerinin korelasyon katsayısını 0.97 bulmuş ve Flow yönteminin CV'sinin daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Kellar ve ark (105) da TNF- α için iki yöntemin korelasyonunun yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Yöntem karşılaştırması için yaptığımız regresyon analizinde $r^2=0.919$ bulmuş olmamız ilk etapta iki yöntemin uyumlu ve birbiri yerine kullanılabileceği anlamı taşıyabilir. Fakat çizilen Bland-Altman grafiğinde çoğu noktanın farklar ortalamasıyla ilişkili olduğu, rassal dağılmadığı ve ortalamalar arttıkça farkların azaldığı görülmektedir. Ayrıca farkların sıfırın çok altında; -4 ile -18.3 arasında olduğu, ortalamasının da -11.2 olduğu görülmektedir. Yani ELISA yönteminde ölçülen değerler Flow yöntemine göre çok daha düşük çıkmıştır. Bu düşüklük tüm değerlerde belli oranda olduğu için regresyonda iki yöntem uyumlu gibi görülmektedir. Yöntem karşılaştırmasında daha uygun analiz olduğu belirtilen (93, 95) Bland-Altman grafiğinde TNF- α için literatürdeki bulguların aksine iki yöntemin uyumsuz olduğu ve birbirlerinin yerine kullanılamayacağı tespit edildi.

Endojen pirojen gibi davranarak ateşi indükleyen ve akut faz proteinlerinin sentezini uyaran IL-1, hem kendi üretimi hem de diğer proinflamatuvar sitokinlerin üretimine aracılık ederek, enfeksiyon ve enflamasyona patofizyolojik yanıtta önemli roller oynar. Yapılan çalışmalarda IL-1'in diyetle ilişkili olan aterosklerozda inflamatuvar katkı sağladığı ve ateroskleroz gelişimini artırdığı gösterilmiştir (9, 58).

Lee ve ark (106), LDL seviyesi 160 mg/dL'nin üzerindeki bireylerde, LDL seviyesi düşük olanlara göre IL-1 β konsantrasyonunun arttığını belirtmişlerdir. Ferroni ve ark (107), hiperkolesterolemilerde artan IL-1 β kaynağının trombositler olabileceğini söylemişlerdir. Lu ve Kakkar (108), yaptıkları çalışmalarında, ateroskleroz gelişiminde önemli olan inflamazom denilen protein kompleksin IL-1 β 'yı aktive ettiğini ve erken ateroskleroz formasyonuna katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir. Qamar ve Rader (109), farelerde IL-1 β inhibisyonu ile aterosklerotik plak riskinin azaldığını ve insanlarda gelişen aterosklerotik damarlarda IL-1 β konsantrasyonunun çok yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda da hiperkolesterolemili grupta kontrol grubuna göre IL-1 β seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu yükseklik şikayeti olmayan yüksek kolesterolü kişilerde erken ateroskleroz formasyonunun başlayabileceğini, oluşmuş plağın gelişimini artırabileceğini literatüre destek olacak şekilde açıklamaktadır. İlerde yapılabilecek IL-1 β inhibisyonunun plak gelişimini azaltacağı teorisi de bu çalışma ile daha da güçlenmiştir.

Ferroni ve ark (110), hiperkolesterolemili kişilerde yaptıkları çalışmada IL-1 β ile LDL arasında bir korelasyon saptamamıştır. Dalekos ve ark (111) da Total Kolesterol ve IL-1 β arasında bir korelasyon saptamamıştır. Bizim çalışmamızda ise literatürdeki bulguların aksine; IL-1 β ile Total kolesterol ve LDL arasında pozitif, HDL ile arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Proinflamatuvar etkisi olan IL-1 β 'nın lipid düzeyi arttıkça korele olarak artışı aterosklerozda ve dolaylı olarak koroner kalp hastalıklarının gelişiminde önemli etkisinin olduğu ortaya çıkmış oldu.

Carson ve ark (103), ELISA ve Flow ile ölçtükleri IL-1 β için yaptıkları karşılaştırmada iki yöntemi uyumlu bulmuşlardır. Bu çalışmadan başka IL-1 β için iki yöntemin karşılaştırma çalışması literatürde bulunmamaktadır.

Bizim yaptığımız yöntem karşılaştırmasında regresyon katsayısı yüksek ($r^2=0.995$) bulunmuştur. Bland-Altman grafiğinde ise ± 1.96 SD aralığı dışında 3 noktanın olduğu, bir grup dışında çoğu noktanın rassal dağıldığı ve farklar ortalamasının sıfır olmasa da sıfıra yakın -1.7 olduğu görülmektedir. Bu grafikte IL-1 β için iki yöntemin uyum gösterdiği fakat farklarla ortalamalar arasında bir grup noktanın sistematik ilişkili olmasından dolayı birbirinin yerine kullanılmasının çok uygun olmadığı ortaya konulmuştur. Carson ve ark (103) çalışmasının aksine elde ettiğimiz bu bilgi göz önüne alındığında ileride yapılacak çalışmalarda, yönteme ELISA ile başladı ise ELISA ile devam edilmesi, Flow ile başlanırsa Flow ile devam edilmesi gerektiği ortaya çıkartılmıştır.

Proaterojenik bir sitokin olan IL-6 yağlı çizgilenmelerin artmasına neden olduğu literatürde belirtilmiştir (6, 60). Seed ve ark (112), ailesel hiperkolesterolemilerde IL-6 seviyesini koroner arter hastalığı olanlarda olmayanlara göre daha yüksek bulmuşlardır. Yudkin ve ark (113), yaptıkları çalışmada koroner arter hastalığının gelişiminde IL-6'nın otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmayla etki ettiğini belirtmişlerdir. Schieffer ve ark (114), aterosklerotik plakta yüksek konsantrasyonda

IL-6 olduğunu göstermişlerdir. Dimitrow ve Jawień (115), hiperkolesterolemilere atorvastatin verilmesiyle yüksek olan IL-6 seviyesinin düştüğünü bulmuşlardır.

Bu çalışmada da kolesterolü yüksek olan bireylerde sağlıklılara göre IL-6 seviyesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Literatürle uyumlu olan elde ettiğimiz bilgi ile IL-6'nın hiperkolesterolemilerde aterosklerozla ilişkisi güçlü şekilde vurgulanmıştır. Diğer faktörler elimine edildiğinde sadece kolesterolü yüksek olan hastalarda IL-6 seviyesinin bakılması ile anjio yapmadan plak olup olmadığının araştırılmasına katkı sağlayacağını düşünürüz.

Elwakkad ve ark (116), asemptomatik hiperkolesterolemilerde yaptıkları çalışmada IL-6 ile Total Kolesterol ve LDL arasında pozitif korelasyon saptamışlardır. Ferroni ve ark (110) ise lipid parametreleri ve IL-6 arasında bir korelasyon saptamamıştır. Literatürde hiperkolesterolemili asemptomatik hastalarda HDL ile IL-6 arasında korelasyon analizinin yapıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bizim çalışmamızda ise IL-6 ile Total Kolesterol ve LDL arasında pozitif korelasyon saptanmış iken HDL ile istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon bulunmamıştır. Literatürde az bulunan bu korelasyon bulgusu ile IL-6'nın proaterojenik olduğu ve lipid düzeyleri ile ilişkili olduğu saptanmış oldu.

Kellar ve ark (105), IL-6 ölçümü için kullandıkları ELISA ve Flow yöntemlerinin uyumlu olduğunu belirtmişlerdir. Carson ve ark (103), IL-6 için iki yöntemin uyumlu olduğunu fakat Flow yönteminin daha sensitif olduğunu göstermişlerdir.

IL-6 için bizim yaptığımız yöntem karşılaştırmasında regresyon analizindeki $r^2=0.996$ bulunmuştur. Bland-Altman grafiğinde noktaların sistematik değil rassal dağıldığı, ± 1.96 SD aralığının dışında yalnızca 4 noktanın olduğu, farklar ortalamasının sıfıra yakın bulunduğu (-1.39) görülmektedir. Bu verilerle IL-6 için ELISA ve Flow yöntemlerinin uyumlu olduğu ve birbirlerinin yerine kullanılabileceği ortaya çıkmıştır. Benzer çalışmaların sayısının az olması nedeniyle bu veri literatüre önemli katkı sağlamıştır.

Serbest oksijen radikalleri (SOR); vücutta normal metabolizma sırasında oluşan zararlı moleküllerdir. Bu maddelerin aşırı şekilde arttığı durumlarda ya da vücudun antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif stres olarak bilinen durum ortaya çıkar. SOR; proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi temel hücre komponentleri ile etkileşime girmekte, toksik bileşikler meydana gelmekte ve

bu bileşiklerin ölçülmesiyle oksidatif stres ortaya konmaktadır. SOR'un günümüzde bir çok hastalığın patogenezinde rol alabildiği gösterilmiştir (117).

Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir ya da hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Bu aldehitlerden en önemlisi olan MDA, hücre membranının deformasyonuna, iyon geçişinin ve enzimatik fonksiyonların bozulmasına neden olur. Hücre zarlarından kolayca geçebileceği için hücre içindeki protein sentezini ve DNA yapısını da olumsuz yönde etkilemektedir (66). MDA düzeyi, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir (67).

Peters ve ark (118), yaptıkları çalışmada izole ateroskerozu olanlarda yükselmiş MDA seviyelerini göstermişlerdir. Ledwozyw ve ark (119), Total Kolesterol, Trigliserid ve LDL'si yüksek olanlarda MDA'yı da yüksek bulmuş ve lipid parametreleri ile MDA arasında pozitif korelasyon saptamıştır. Prasad ve Kalra (120), tavşanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada deneysel olarak oluşturulan hiperkolesterolemili grupta MDA düzeylerini yüksek bulmuş ve LDL ile pozitif korelasyonu olduğunu saptamışlardır. Sigala ve ark (121) da endarterektomi ile çıkartılan hiperkolesterolemik ateroskleroz plaklarında doku MDA'sının yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda da sağlıklı kontrol grubuna göre hiperkolesterolemili kişilerde MDA seviyesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur. Asemptomatik kolesterol yüksekliği olan ve başka oksidatif stres etkeni bulunmayan hasta grubunda kolesterol yüksekliğinin kendisinin de oksidatif strese yol açtığı ve lipid hasarını başlattığı literatüre destek olacak şekilde çalışmamızda gösterilmiştir. Ayrıca çalışmamızda literatüre uyumlu şekilde MDA ile Total kolesterol ve LDL arasında pozitif, HDL ile zayıf da olsa negatif korelasyon saptanmıştır. Bu bilgi ile LDL seviyesi arttıkça oksidatif hasarın da arttığı ve MDA seviyesinin yükseldiği gösterildi. Meydana gelen lipid oksidasyonu ile ateroskleroz gelişiminin artabileceği, oluşan plağın komplikasyonlarının ortaya çıkabileceği ve LDL düzeyinin bu durumlarla korele olduğu daha güçlü şekilde vurgulanmış oldu.

HDL ilişkili PON1, çeşitli mekanizmalarla LDL'yi oksidasyondan koruyabilme yeteneğine sahiptir. PON1, oksidatif hasardan HDL'nin korunmasında da etkindir. Oksidatif stresin arttığı aterosklerotik hastalarda, PON1 aktivitesinin düşük olduğu

bildirilmektedir; dolayısıyla PON1 aktivitesinin aterosklerotik olaylarla yakından ilişkili olabileceği söylenebilir (78,79).

Berrougui ve ark (122), kalsiyum bağımlı enzim olan PON1'in HDL ile ilişkili olduğunu ve hiperkolesterolemik, aterosklerotik, diyabetik hastalarda aktivitesinin azaldığını belirtmişlerdir. Kural ve ark (123), atorvastatin verilen hiperkolesterolemik hastalarda PON1 aktivitesinin arttığını ve LDL oksidasyonunun azaldığını göstermişlerdir. Himbergen ve ark (124), PON1'in hem aktivitesinin hem de miktarının artışının HDL'yi koruduğunu ve okside LDL ile negatif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Nagila ve ark (125), hiperkolesterolemik hastalarda PON1 aktivitesinin polimorfizme göre değişebileceğini göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda da PON1'in aktivitesi yerine miktarı ölçülmüş ve hiperkolesterolemi hastalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur. Ayrıca PON1 seviyesi Total Kolesterol ve LDL ile negatif, HDL ile arasında pozitif korelasyon saptanmıştır. Böylece hiperkolesterolemi durumlarında oksidatif hasardan koruyucu özelliği olan PON1'in sadece aktivitesi değil miktarının da azaldığı ve bunun kolesterol düzeyi ile korele olduğu gösterilmiştir. PON1 aktivitesi çalışması çok sayıda olmasına rağmen miktar ölçüm çalışmasının sayısı yetersiz olduğundan dolayı bu çalışmanın literatüre önemli katkısı olacağı kanaatindeyiz.

Sonuç olarak asemptomatik hiperkolesterolemilerde yükselmiş TNF- α , IL-1 β , IL-6 ve MDA ile azalmış PON1 seviyelerinin yansıttığı gibi, aterogenezin oluşmasında sitokinlerin ve oksidatif stresin önemli etkilerde bulunduğu görüşü desteklenmektedir. Örnek büyüklüğü daha geniş olan ve daha detaylı yeni çalışmalarla ateroskleroz patolojisinin daha açık ortaya konulabileceğini ve çalışılan bu parametrelerin aterosklerozda bir bio-marker olarak kullanılıp kullanılmayacağını ortaya çıkacağını düşünüyoruz. İleride planladığımız çalışma ile bu hastalara uygulanacak lipid düşürücü tedavinin aynı parametrelere olan etkisi araştırılacaktır. Ayrıca çalışmamızla sitokin ölçümü için yeni kullanılmaya başlanılan Flow sitometri yönteminin bazı sitokinlerde ELISA yöntemiyle uyumlu olduğu vurgulandı. Yapılacak kapsamlı çalışmalarla birçok soluble proteinlerin ölçümünde Flow yönteminin ELISA'nın yerini alabileceği kanaatindeyiz.

6. SONUÇLAR

Hiperkolesterolemilerde aterosklerozun oluşması ve ilerlemesinde etkileri olan sitokinlerin ve oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesi için yapılan bu çalışmada aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

1. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperkolesterolemilerde proinflamatuvar sitokinler olan TNF- α , IL-1 β ve IL-6 istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu. Ayrıca bu parametrelerin kolesterol seviyesi ile korele olduğu gösterildi.
2. Kolesterol düzeyi yüksek olanlarda sağlıklılara göre, lipid oksidasyonu ile ilgili parametre olan MDA istatistiksel olarak anlamlı yüksek; oksidatif hasardan koruyucu etkisi olan PON1 ise istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. Yine bu oksidatif stres parametrelerinin de kolesterol seviyeleri ile korele olduğu gösterildi.
3. Ülkemizde soluble proteinlerin ölçümü için yeni kullanılmaya başlanan Flow sitometri yöntemi, çalışmamızda değerlendirildi ve IL-6 için ELISA yöntemiyle tam uyumlu olduğu; IL-1 β için ELISA ile uyumunun az olduğu ve birbirinin yerine kullanılmaması gerektiği, TNF- α için ise iki yöntemin uyumsuz olduğu ve birbirinin yerine kullanılamayacağı gösterildi.
4. LDL hesabı için kullanılan Friedewald formülünün Direkt LDL ölçümünün yerine kullanılabileceği, Bland-Altman grafiği ile bu çalışmada da gösterildi.

7. KAYNAKLAR

1. Demchuk AM, Hess DC, Brass LM, Yatsu FM. Is cholesterol a risk factor for stroke?: Yes. *Arch Neurol.* 1999;56(12):1518–20.
2. Long Y, Gracely EJ, Newschaffer CJ, Liu L. Analysis of the Prevalence of Cardiovascular Disease and Associated Risk Factors for European-American and African-American Populations in the State of Pennsylvania 2005-2009. *Am J Cardiol.* 2013 Jan 1;111(1):68-72.
3. Witztum JL, The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet.* 1994; 344(8925):793–5.
4. Torzewski M, Lackner KJ. Initiation and progression of atherosclerosis-enzymatic or oxidative modification of low-density lipoprotein? *Clin Chem Lab Med,* 2006; 44(12):1389–94.
5. Chen X, Xun K, Chen L, Wang Y. TNF- α , a potent lipid metabolism regulator. *Cell Biochem Funct.* 2009 Oct;27(7):407-16.
6. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev,* 2006; 86: 515-81.
7. Madej A, Okopien B, Kowalski J, et al. Levels of TNF- α in serum of patients with hyperlipoproteinemia IIb before and after micronized fenofibrate therapy. *Pol Arch Med Wewn.* 1998 Apr;99(4):308-13.
8. Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res.* 2008 Aug 1;79(3):360-76.
9. Merhi-Soussi F, Kwak BR, Magne D, et al. Interleukin-1 plays a major role in vascular inflammation and atherosclerosis in male apolipoprotein E-knockout mice. *Cardiovasc Res.* 2005 Jun 1;66(3):583-93.
10. Woods A, Brull DJ, Humphries SE, Montgomery HE. Genetics of inflammation and risk of coronary artery disease: The central role of interleukin-6. *Eur Heart J.* 2000 Oct;21(19):1574-83.
11. Gutteridge JM. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 1993; 19(3): 141-58.

12. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraonase inhibits high density lipoprotein oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraonase. *J Clin Invest* 1998; 101(8): 1581-90.
13. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem.*1998 Mar; 35(Pt2): 181-200.
14. Vance, DE, Van den Bosch H. Cholesterol in the Year 2000. *Biochimica et Biophysia Acta* 2000 Dec 15;1529(1-3):1-8.
15. Smith C, Marks A D, Lieberman M eds. Cholesterol Absorption, Synthesis, Metabolism, and Fate. In: Marks' Essential Medical Biochemistry (2th ed). Lippincott Williams & Wilkins, 2007. Chapter 34.
16. Bloch, K. The biological synthesis of cholesterol. *Vitam Horm.* 1957;15:119-50.
17. Nelson DL, Cox M M, Lehninger Principles of Biochemistry (4th ed), W.H. Freeman and Company, New York 2005, pp. 816-25.
18. Wasowicz E. Cholesterol and Phytosterols, In:Zdzislaw E (eds), Sikorski and Anna K, Chemical and Functional Properties of Food Lipids. CRC Press LLC 2003, pp. 93-107.
19. Hui, DY, Howles PN. Molecular mechanisms of cholesterol absorption and transport in the intestine. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Apr;16(2):183-92.
20. Ikonen E.Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol Rev.* 2006 Oct;86(4):1237-61.
21. Altmann SW, Davis HR Jr, Zhu LJ, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004 Feb 20;303(5661):1201-4.
22. Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM, et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. *J Biol Chem.* 2004 Aug 6;279(32):33586-92.
23. Yamaguchi Y, Kunitomo M, Haginaka J. Assay methods of modified lipoproteins in plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2002 Dec 5;781(1-2):313-30.

24. Hevonoja T, Pentikäinen MO, Hyvönen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Nov 15;1488(3):189-210.
25. Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005;366:1267-78.
26. Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001 Jan;21(1):13-27.
27. Barter P, Kastelein J, Nunn A, Hobbs R. High density lipoproteins (HDLs) and atherosclerosis; the unanswered questions. *Atherosclerosis*. 2003 Jun;168(2):195-211.
28. Gordon T, Castelli WP, Hjortland MC, Kannel WB, Dawber TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease. The Framingham Study. *Am J Med* 1977;62 (5): 707-14.
29. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM. Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 2004; 95:764-772.
30. Ikonen E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 Feb;9(2):125-38.
31. Ohvo-Rekilä H, Ramstedt B, Leppimäki P, Slotte JP. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog Lipid Res*. 2002 Jan;41(1):66-97.
32. Simons K, Vaz WL. Model systems, lipid rafts and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2004;33:269-95.
33. Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci*. 1998 Feb 15;3:d176-93.
34. Kusters A, Jirsa M, Groen AK. Genetic background of cholesterol gallstone disease. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Jan 20;1637(1):1-19.
35. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Illustrated Biochemistry* (26th Ed). Lange, New York 2003, pp. 438-45.
36. Onat A, Şuurum AG, Şenocak M, ve ark. Türkiye'de erişkinlerde kalp hastalığı ve risk faktörleri sıklığı taraması: 4. Kanda kolesterol ve trigliserid düzeyleri. *Türk Kardiyol Dern Araş*. 1991;19:88-96.

37. Mahley RW, Palaoğlu KE, Atak Z, et al. Turkish Heart Study: lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1995;36:839-59.
38. Kozan O, Oguz A, Abaci A, et al. Prevalence of the metabolic syndrome among Turkish adults. *Eur J Clin Nutr.* 2007 Apr;61(4):548-53.
39. Félix-Redondo FJ, Grau M, Fernández-Bergés D. Cholesterol and cardiovascular disease in the elderly. Facts and gaps. *Aging Dis.* 2013 Mar 1;4(3):154-69.
40. Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:2844-50.
41. Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet* 1999;353 suppl 2:SII5-9.
42. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev* 2007;65(12 Pt 2):140-6.
43. Tzivoni D, Klein J. Improvement of myocardial ischemia by lipid lowering drugs. *Eur Heart J* 1998;19:230-4.
44. McEvoy JW, Blaha MJ, Defilippis AP, et al. Coronary artery calcium progression: an important clinical measurement? A review of published reports. *J Am Coll Cardiol.* 2010 Nov 9;56(20):1613-22.
45. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;232:34-47.
46. Glueck CJ, Gartside PF, Fallart RW, Sielski J, Steiner PM. Longevity syndromes: familial hypobeta and familial hyperalpha lipoproteinemia. *J Lab Clin Med* 1976;88:941-57.
47. Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II: The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* 1984;251:365-74.
48. McGill HC Jr, McMahan CA. Determinants of atherosclerosis in the young. Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group. *Am J Cardiol* 1998;82:30T-6T.
49. Keys A, Arvanis C, Blackburn H. Seven countries: a multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1980; 381.

50. Law MR. Lowering heart disease risk with cholesterol reduction: evidence from observational studies and clinical trials. *Eur Heart J Suppl* 1999;(suppl S):S3-S8.
51. Kılıçturgay K. İmmünoloji, 3. Baskı, Nobel & Güneş Kitabevi, Bursa 2003, s.134-44.
52. Güner İ, Özmen D, Bayındır O. Sitokinler, *Turk J Med Sci*, 1997;17, 65-74.
53. Rosa MS, Pinto AM. Cytokines. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds) *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics* (4th ed). Elsevier Saunders, Missouri 2006. pp. 645-744.
54. Luo D, Luo Y, He Y, et al. Differential functions of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 signaling in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol*, 2006; 169(5):1886-98.
55. Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol* 2010;134, 33-46.
56. Branen L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004; 24:2137-42.
57. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009 Dec 1;54(23):2129-38.
58. Denes A, Drake C, Stordy J, et al. Interleukin-1 mediates neuroinflammatory changes associated with diet-induced atherosclerosis. *J Am Heart Assoc*. 2012 Jun;1(3):e002006.
59. Danesh J, Kaptoge S, Mann AG, et al. Long-term interleukin-6 levels and subsequent risk of coronary heart disease: two new prospective studies and a systematic review. *PLoS Med*. 2008 Apr 8;5(4):e78.
60. Schieffer B, Selle T, Hilfiker A, et al. Impact of interleukin-6 on plaque development and morphology in experimental atherosclerosis. *Circulation*, 2004; 110: 3493-500.
61. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997 Mar;82(2):291-5.
62. Valdez LB, Arnaiz SL, Bustamante J, Alvarez S, Costa L E, Boveris A. Free radical chemistry in biological systems. *Biol Res* 2000; 33: 1-8.

63. Sevanian A, Ursini F. Lipid peroxidation in membranes and low-density lipoproteins: similarities and differences. *Free Radic Biol Med*. 2000 Aug;29(3-4):306-11.
64. Stocker R, Keaney JF Jr. New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;3(8):1825-34.
65. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-80.
66. Draper HH, Mcgirr LG, Hadley M. The metabolism of malondialdehyde. *Lipids*, 1986; 21: 305-7.
67. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998; 39: 1529-42.
68. Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p- nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J* 1953; 53: 110-7.
69. Bayrak T, Bayrak A, Demirpençe E, Kılınç K. Yeni bir kardiyovasküler belirteç adayı: Paraoksonaz. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005; 36: 147-51.
70. Li HL, Liu DP, Liang CC. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J Mol Med* 2003; 81: 766-79.
71. Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clin Sci* 2004; 107: 435-47.
72. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connely PW, Hegele RA. Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:69-76.
73. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7187-91.
74. La Du BN, Aviram M, Billecke S, et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 1999; 119-120: 379-88.
75. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol*. 2004 May;11(5):412-9.

76. Harel M, Aharoni A, Gaidukov L, et al. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat Struct Mol Biol* 2004; 11(5): 412-19.
77. Ekmekçi ÖB, Donma O, Ekmekçi H. Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; 35(2): 78-82.
78. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101(8): 1581-1590.
79. Draganov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004; 369(1): 78-88.
80. Reiner Ž, Catapano AL, De Backer G et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias. *Rev Esp Cardiol*. 2011 Dec;64(12):1168.e1-1168.e60.
81. Papadakis M A, McPhee S J, Rabow M W. *Current Medical Diagnosis & Treatment 2013* (50 th ed). The McGraw-Hill Companies Lange 2013. pp. 1246-55.
82. Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974 Apr;20(4):470-5.
83. Roeschlau P, Bernt E, Gruber W. Enzymatic determination of total cholesterol in serum. *Z Klin Chem Klin Biochem*. 1974 May;12(5):226.
84. Fossati P, Prencipe L. Serum triglycerides determined colorimetrically with an enzyme that produces hydrogen peroxide. *Clin Chem*. 1982 Oct;28(10):2077-80.
85. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem*. 1983 Mar;29(3):538-42.
86. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499-502.
87. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*. 1979 Jun;95(2):351-8.

88. Armstrong D, Browne R. The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol.* 1994;366:43-58.
89. Rifai N, Warnick GR, McNamara JR, Belcher JD, Grinstead GF, Frantz ID Jr. Measurement of low-density-lipoprotein cholesterol in serum: a status report. *Clin Chem.* 1992 Jan;38(1):150-60.
90. Martin SS, Blaha MJ, Elshazly MB, et al. Friedewald-estimated versus directly measured low-density lipoprotein cholesterol and treatment implications. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Aug 20;62(8):732-9.
91. Timón-Zapata J, Laserna-Mendieta EJ, Pineda-Tenor D, et al. Extreme concentrations of high density lipoprotein cholesterol affect the calculation of low density lipoprotein cholesterol in the Friedewald formula and other proposed formulas. *Clin Biochem.* 2011 Dec;44(17-18):1451-6.
92. Tanno K, Okamura T, Ohsawa M, et al. Comparison of low-density lipoprotein cholesterol concentrations measured by a direct homogeneous assay and by the Friedewald formula in a large community population. *Clin Chim Acta.* 2010 Nov 11;411(21-22):1774-80.
93. Genç Y, Sertkaya D, Demirtaş S. Klinik araştırmalarda iki ölçüm tekniğinin uyumunu incelemede kullanılan istatistiksel yöntemler. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 2003. Cilt 56, Sayı 1; 1-6.
94. Atkinson G, Nevill A. Comment on the use of concordance correlation to assess the agreement between two variables. *Biometrics* 1997; 775-7.
95. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet.* 1986 Feb 8;1(8476):307-10.
96. Hollis S. Analysis of method comparison studies. *JIFCC* 1997; 9-16.
97. Pereira MM, Sant'ana Santos TP, Aras R, Couto RD, Sousa Atta ML, Atta AM. Serum levels of cytokines and chemokines associated with cardiovascular disease in Brazilian patients treated with statins for dyslipidemia. *Int Immunopharmacol.* 2013 Nov 16;18(1):66-70.
98. Balanescu S, Calmac L, Constantinescu D, Marinescu M, Onut R, Dorobantu M. Systemic inflammation and early atheroma formation: are they related? *Maedica (Buchar).* 2010 Dec;5(4):292-301.

99. Hong SN, Gona P, Fontes JD, et al. Atherosclerotic biomarkers and aortic atherosclerosis by cardiovascular magnetic resonance imaging in the framingham heart study. *J Am Heart Assoc.* 2013 Nov 15;2(6):e000307.
100. Mizia-Stec K, Zahorska-Markiewicz B, Mandecki T, et al. Hyperlipidaemias and serum cytokines in patients with coronary artery disease. *Acta Cardiol.* 2003 Feb;58(1):9-15.
101. Jiang X, Li M, Yang Q, Du L, Du J, Zhou J. Oxidized Low Density Lipoprotein and Inflammation in Gout Patients. *Cell Biochem Biophys.* 2013 Sep 26.
102. Calza L, Trapani F, Bartoletti M, et al. Statin therapy decreases serum levels of high-sensitivity C-reactive protein and tumor necrosis factor- α in HIV-infected patients treated with ritonavir-boosted protease inhibitors. *HIV Clin Trials.* 2012 May-Jun;13(3):153-61.
103. Carson RT, Vignali DA. Simultaneous quantitation of 15 cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J Immunol Methods.* 1999 Jul 30;227(1-2):41-52.
104. Chen R, Lowe L, Wilson JD, et al. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clin Chem.* 1999 Sep;45(9):1693-1694.
105. Kellar KL, Kalwar RR, Dubois KA, Crouse D, Chafin WD, Kane BE. Multiplexed fluorescent bead-based immunoassays for quantitation of human cytokines in serum and culture supernatants. *Cytometry.* 2001 Sep 1;45(1):27-36.
106. Lee HS, Park HJ, Nam JH, Kim MH, Kim WY. Immune and nutrition status in elderly Koreans with hyperLDL-cholesterolemia. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2006 Dec;52(6):407-13.
107. Ferroni P, Martini F, Cardarello CM, Gazzaniga PP, Davi G, Basili S. Enhanced interleukin-1beta in hypercholesterolemia: effects of simvastatin and low-dose aspirin. *Circulation.* 2003 Oct 7;108(14):1673-5.
108. Lu X, Kakkar V. Inflammasome and Atherogenesis. *Curr Pharm Des.* 2013 Aug 7.
109. Qamar A, Rader DJ. Effect of interleukin 1 β inhibition in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 2012 Dec;23(6):548-53.

110. Ferroni P, Basili S, Vieri M, et al. Soluble P-selectin and proinflammatory cytokines in patients with polygenic type IIa hypercholesterolemia. *Haemostasis*. 1999;29(5):277-85.
111. Dalekos GN, Elisaf M, Bairaktari E, Tsolas O, Siamopoulos KC. Increased serum levels of interleukin-1beta in the systemic circulation of patients with essential hypertension: additional risk factor for atherogenesis in hypertensive patients? *J Lab Clin Med*. 1997 Mar;129(3):300-8.
112. Seed M, Betteridge DJ, Cooper J, et al. Normal levels of inflammatory markers in treated patients with familial hypercholesterolaemia: a cross-sectional study. *JRSM Cardiovasc Dis*. 2012 Jun 30;1(3).
113. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis*. 2000 Feb;148(2):209-14.
114. Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, et al. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*. 2000 Mar 28;101(12):1372-8.
115. Dimitrow PP, Jawień M. Anti-inflammatory effect of atorvastatin in patients with aortic sclerosis or mild aortic stenosis independent of hypercholesterolemia. *Pharmacol Rep*. 2010 Nov-Dec;62(6):1250-4.
116. Elwakkad AS, Mohamed SI, Fathalla M. Relation between hypercholesterolaemia and vascular endothelial microinflammation. *East Mediterr Health J*. 2007 May-Jun;13(3):515-21.
117. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-28.
118. Peters HJ, Voigt H, Köhler H, Vorberg B, Reuter W. Lipid peroxides and antioxidants in the blood of patients with arteriosclerotic circulatory disorders. *Z Gesamte Inn Med*. 1985 May 1;40(9):276-8.
119. Ledwozyw A, Michalak J, Stepień A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta*. 1986 Mar 28;155(3):275-83
120. Prasad K, Kalra J. Experimental atherosclerosis and oxygen free radicals. *Angiology*. 1989 Sep;40(9):835-43.

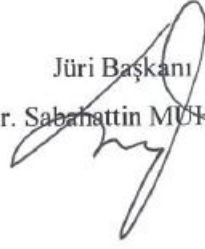
121. Sigala F, Kotsinas A, Savari P, et al. Oxidized LDL in human carotid plaques is related to symptomatic carotid disease and lesion instability. *J Vasc Surg.* 2010 Sep;52(3):704-13.
122. Berrougui H, Momo CN, Khalil A. Health benefits of high-density lipoproteins in preventing cardiovascular diseases. *J Clin Lipidol.* 2012 Nov-Dec;6(6):524-33.
123. Kural BV, Orem C, Uydu HA, Alver A, Orem A. The effects of lipid-lowering therapy on paraoxonase activities and their relationships with the oxidant-antioxidant system in patients with dyslipidemia. *Coron Artery Dis.* 2004 Aug;15(5):277-83.
124. van Himbergen TM, Roest M, de Graaf J, Jansen EH, Hattori H, Kastelein JJ. Indications that paraoxonase-1 contributes to plasma high density lipoprotein levels in familialhypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2005 Mar;46(3):445-51.
125. Nagila A, Permpongpaiboon T, Tantrarongroj S, et al. Effect of atorvastatin on paraoxonase1 (PON1) and oxidative status. *Pharmacol Rep.* 2009 Sep-Oct;61(5):892-8.

8. TEZ ONAY SAYFASI

Dr. Ahmet ŞEN'in "Hiperkolesterolemili hastalarda bazı sitokin ve oksidatif stres parametrelerinin değerlendirilmesi" konulu tezi 13.01.2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU



Doç.Dr. Aysun ÇETİN (Danışman)



Prof.Dr. Figen NARİN



Doç.Dr. Leylagül Kaynar



Öğr.Gör.Dr. Recep SARAYMEN

