

**T.C
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**MYOKARD İNFARKTÜSLÜ HASTALARDA PON1 VE CETP
POLİMORFİZMLERİ VE PARAOKSONAZ ENZİM
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Vefa YANMAZ

**Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Nuri BAKAN**

**Uzamanlık Tezi
ERZURUM 2010**

İÇİNDEKİLER

ONAY.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Lipid ve Lipoprotein Metabolizması.....	5
2.1.1. Lipoprotein Metabolizmasını Düzenleyen Başlıca Apolipoproteinler	6
2.1.1.1. Apolipoprotein A	7
2.1.1.2. Apolipoprotein C.....	8
2.1.1.3. Apolipoprotein D	9
2.1.1.4. Apolipoprotein J (Klusterin)	9
2.1.1.5. Apolipoprotein B.....	10
2.1.1.6. Apolipoprotein E.....	10
2.1.2. Lipoprotein Sınıfları	11
2.1.2.1. Şilomikronlar	13
2.1.2.2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL).....	14
2.1.2.3. Orta Yoğunluklu Lipoproteinler (IDL)	14
2.1.2.4. Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL)	15
2.1.2.5. Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler (HDL)	20
2.1.2.6. Diğer Lipoprotein Fraksiyonları	25
2.1.2.6.1. Lipoprotein (a)	25
2.1.2.6.2. Lipoprotein (x)	25
2.1.3. Lipoprotein Metabolizma Bozuklukları	25

2.1.3.1. Hipolipoproteinemiler	26
2.1.3.1.1. Abetalipoproteinemi	26
2.1.3.1.2. Ailesel hipobetalipoproteinemi	26
2.1.3.1.3. Hipoalfalipoproteinemi	26
2.1.3.2. Hiperlipoproteinemiler	26
2.1.3.2.1. Tip I Hiperlipoproteinemi	27
2.1.3.2.2. Tip II Hiperlipoproteinemi	28
2.1.3.2.3. Tip III Hiperlipoproteinemi	28
2.1.3.2.4. Tip IV Hiperlipoproteinemi	29
2.1.3.2.5. Tip V Hiperlipoproteinemi	29
2.2. Paraoksonaz (PON) Enzimi	29
2.2.1. Enzimin Keşfi	29
2.2.2. PON1 Enzimi	30
2.2.3. PON1'in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri	30
2.2.4. PON1 Gen Polimorfizmleri	33
2.2.5. PON'un Çeşitli Hastalıkların Patogenezindeki Rolü	35
2.3. Kolesterol- Ester Transfer Proteini (CETP)	36
2.3.1 CETP Gen Polimorfizmleri	37
2.4. Myokard İnfarktüsü ve Ateroskleroz	38
2.4.1. Ateroskleroz.....	38
2.4.1.1. Ateroskleroz Histopatolojisi	39
2.4.1.2. Ateroskleroz Etiyopatogenezi	40
2.5. PON ve Ateroskleroz Arasındaki İlişki	44
2.6. CETP ve Ateroskleroz Arasındaki ilişki	45
3. GEREÇ ve YÖNTEM	46
3.1 Gereç	46

3.1.1. Çalışmanın Tanımlanması ve Etik Kurallara Uygunluğu.....	46
3.1.2. Hasta Seçimi	46
3.1.3. Örneklerin Ayrılması ve Saklanması.....	46
3.1.4. Kullanılan Kimyasal, Cihaz ve Ekipmanlar	47
3.2. Yöntemler.....	49
3.2.1 DNA İzolasyonu	49
3.2.2. DNA Saflık Tayini ve Konsantrasyonunun Hesaplanması	50
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	50
3.2.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) analizi	54
3.2.4.1. Kesim Ürünlerinin Analizi	55
3.2.5. PON-1 Enzim Aktivitelerinin Tayini	57
3.2.5.1 Paraoksonaz Aktivitesinin Ölçümü.....	57
3.2.5.2. Arilesteraz Aktivitesinin Ölçümü.....	58
3.2.6. Malondialdehit (MDA) Ölçümü	59
3.2.7. Çalışma Gurubuna Uygulanan Rutin Biyokimyasal Testler	60
3.2.7.1. Total Kolesterol Ölçümü	60
3.2.7.2. HDL-Kolesterol Ölçümü.....	61
3.2.7.3. LDL-Kolesterol Ölçümü	61
3.2.7.4. Trigliserid Ölçümü	61
3.2.7.5. VLDL Ölçümü:	62
3.2.7.6. Apo A1 Ölçümü:	62
3.2.7.7. Apo B Ölçümü	62
3.2.8. İstatistiksel Değerlendirme:	62
4. BULGULAR.....	63
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	93
7. KAYNAKLAR	95

ONAY

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nın 20.05.2009 tarih ve 2 no'lu kürsü karar ile “ Myokard İnfarktüsü Hastalarda PON1 ve CETP Polimorfizmleri, Paraoksonaz Enzim aktivitesinin Araştırılması” adlı tez konusunun Arş. Gör. Dr. Vefa YANMAZ'a uzmanlık tezi olarak verilmesine ve tez yönetimin Prof. Dr. Nuri BAKAN tarafından yürütülmesine karar verildi. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunun 15.05.2009 tarih ve 138 sayılı kararı ile ilgili tezin etik kurul onayı alındı ve Temel Tıp bilimleri Bölümün 21.05.2009 tarih ve 1 no'lu oturumunda 4.1 karar numarası ile tez konusu olarak kabul edilmesine karar verildi

TEŞEKKÜR

İhtisas tezi olarak sunduğum bu çalışmada ve ihtisas hayatım süresince değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, benden her türlü desteğini, hoşgörüsünü ve karşılaştığım her türlü sorunda yardımını esirgemeyen tez hocam Prof. Dr. Nuri BAKAN'a, ihtisas eğitimim boyunca her zaman yakın ilgi ve bilimsel desteklerini gördüğüm Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Ebubekir BAKAN'a, Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN'e, , Prof. Dr. Fatih AKÇAY'a, Prof. Dr. Leyla YILDIZ'a, Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, Prof. Dr. Zuhale UMUDUM'a, , Prof. Dr. Hülya AKSOY'a Prof. Dr. M. Sait Keleş ve Doç. Dr. Abdulkadir YILDIRIM'a,

Tez çalışmamda büyük yardımları olan Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Enbiya AKSAKAL'a

Bu tez çalışmasında büyük destekleri olan, Arş. Gör. Hamit Hakan ALP'e ve moleküler laboratuvarı teknisyenimiz Ercan DEMİR'e,

İhtisas eğitimim boyunca ilgilerini ve arkadaşlıklarını esirgemedikleri için, Uzm.Dr. Çağlar BULUT'a, Uzm.Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK'e, Uzm. Dr. İbrahim KAPLAN'a, Arş. Gör. Dr.Canan YİĞİT'e, Arş. Gör. Dr. Fatih KARA'ya, Arş. Gör. Akar KARAKOÇ'a, Arş. Gör. Dr. Muhammed ÇELİK'e, Arş. Gör. Dr. Zafer BAYRAKTUTAN'a, Arş. Gör. Nezahat KURT'a, Arş. Gör. Dr. H. İbrahim YILMAZ'a, Arş. Gör. Betül KOÇAK'a, Arş. Gör. Dr. Esra LALOĞLU'na ve diğer asistan, doktora ve yüksek lisans arkadaşlarıma,

Bölümümüz sekreteri Keriman ERDEN'e ve tüm Anabilim Dalı çalışanlarımıza,

İhtisas eğitimim ve tüm hayatım boyunca her türlü anlayışı ve desteği gösteren aileme ve eşim Yeşim YANMAZ'a,

SONSUZ TEŞEKKÜRLER...

Çocuklarım Zeynep ve Mehmet Efe'ye...

ÖZET

Yanmaz V. Myokard İnfarktüsli Hastalarda PON1 ve CETP Polimorfizmleri ve Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Araştırılması. Biyokimya Uzmanlık Tezi. Erzurum 2010.

Myokard infarktüsü (MI), koroner damarların aterosklerozuna bağlı lokal iskemi ile meydana gelen ve sınırlı bir alanda gelişen myokard nekrozudur. Tüm dünyada, özellikle endüstrileşmiş toplumlarda en önemli morbidite ve mortalite sebebidir.

MI gelişimine neden olan, ateroskleroza karşı HDL'nin koruyucu bir rol oynadığı bilinmektedir. Ancak HDL'nin bu koruyucu etkiyi nasıl yaptığı hala araştırma konusudur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, aterosklerozun başlangıcı ve ilerlemesinde LDL'nin oksidatif modifikasyonun merkezi rol oynadığı ve bu modifikasyona karşı HDL'nin koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir. HDL'nin bu antioksidan aktivitesinin, yapısında bulunan paraoksonaz (PON) enzimine bağlı olduğu düşünülmektedir. Serum PON1 aktivitesi, çeşitli popülasyon gruplarının arasında ve kendi içinde geniş varyasyonlar gösterir. PON1 aktivitesi kısmen genetik olarak tayin edilir. HDL'nin serumdaki düzeyini belirleyen faktörlerden birisi de Kolesterol-ester transfer proteinidir (CETP). CETP aktivitesinin çevresel ve genetik faktörlerden etkilendiği ve HDL-K konsantrasyonu ile ters orantılı olduğu birçok çalışmada tesbit edilmiştir.

Bu çalışmada MI tanısı almış 100 hasta ve 100 kontrol ile HDL'nin aterosklerozdan koruyucu etkisi ile ilgili olarak, PON1 192 R/Q gen polimorfizmi, CETP Taq1B gen polimorfizmi ve PON1 enzim aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Sonuç olarak CETP Taq1B polimorfizmi ile MI arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tesbit ($p>0.05$) edilmemiştir. PON1 192 R/Q gen polimorfizmi ile MI arasındaki ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır. BB(RR) genotip frekansı hasta grubunda (0.13) kontrol grubuna (0.08) göre anlamlı olarak yüksek tesbit edilmiştir. Ayrıca PON1 aktivite düzeylerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Buna ilaveten lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin de hasta grubunda anlamlı olarak ($p<0.05$) yüksek olması, ateroskleroz patogenezinde LDL oksidasyonun önemli olduğu görüşünü doğrulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: MI, PON-1, CETP, PON1 aktivitesi, HDL-K

ABSTRACT

Yanmaz V. Investigation of PON1 and CETP Polymorphisms and Paraoxonase Enzyme Activity in Patients with Myocardial Infarction. Thesis for Specialist Degree in Biochemistry. Erzurum 2010.

Myocardial infarction (MI) is myocardial necrosis that occurs due to local ischemia related to atherosclerosis of coronary vessels and that develops in a definite area. It is the most important cause of morbidity and mortality worldwide, particularly in industrialized societies.

It is known that HDL plays a protective role against atherosclerosis, which causes the development of MI. However, it is still research subject how HDL performs this protective effect. In studies performed in recent years, it has been reported that the oxidative modification of LDL plays central role in the beginning and progression of atherosclerosis and that HDL shows protective effect against this modification. It is considered that this antioxidant activity of HDL depends on paraoxonase (PON) enzyme that exists in its structure. Serum PON1 activity reveals wide variations among various population groups and within itself. PON1 activity is determined partly by genetics. Cholesteryl-ester transfer protein (CETP) is one of factors determining the serum level of HDL. In many studies, it has been confirmed that CETP activity is affected by environmental and genetic factors and is inversely proportional to HDL-C concentration.

In this study, with 100 control subjects and 100 patients who are diagnosed with MI, it has been planned to investigate PON1 192 R/Q gene polymorphism, CETP Taq1B gene polymorphism, and PON1 enzyme activity in connection with the protective effect of HDL against atherosclerosis.

In conclusion, a statistically significant difference has not been detected between CETP Taq1B polymorphism and MI ($p>0.05$). It has been found that the association between PON1 192 R/Q gene polymorphism and MI is statistically significant ($p<0.05$). It has been determined that BB (RR) genotype frequency is significantly higher in the patient group (0.13) as compared to control group (0.08). Moreover, it was statistically significant that PON1 activity levels were lower in the patient group as compared to control group. Furthermore, the fact that MDA levels which are an indicator of lipid peroxidation are significantly high in patient group ($p<0.05$) confirms that idea that LDL oxidation is important in the pathogenesis of atherosclerosis.

Key words: MI, PON1, CETP, PON1 activity, HDL-C

KISALTMALAR

MI	: Myokard İnfarktüsü
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
PON	: Paraoksonaz
ARE	: Arilesteraz
MDA	: Malondialdehit
HDL	: High Density Lipoprotein (Yüksek Dansiteli Lipoprotein)
HDL-K	: HDL Kolesterol
TK	: Total Kolesterol
LDL	: Low Density Lipoprotein
LDL-K	: LDL Kolesterol
VLDL	: Very Low Density Lipoprotein (Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein)
IDL	: Intermediate Density Lipoprotein (Orta Dansiteli Lipoprotein)
TG	: Trigliserid
ApoA	: Apolipoprotein A (A-I, A-II, A-IV)
ApoB	: Apolipoprotein B (B-48, B-100)
ApoC	: Apolipoprotein C (C-I, C-II, C-III)
ApoD	: Apolipoprotein D
ApoE	: Apolipoprotein E (E ₂ , E ₃ , E ₄)
ApoJ	: Apolipoprotein J
Lp(a)	: Lipoprotein a
TAG	: Triasilgliserol
KE	: Kolesterol Esteri
LCAT	: Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
LPL	: Lipoprotein Lipaz
HL	: Hepatik Lipaz
oxLDL	: Okside LDL
sdLDL	: Small Density LDL (Küçük Yoğun LDL)
NO	: Nitrik Oksit
PAF-AH	: Platelet Aktive Edici Faktör-Asetil Hidrolaz
ABCA1	: ATP Binding Casette Protein A1(ATP Bağlayan Kaset Protein A1)
SR-B1	: Scavenger Reseptör B1 (Çöpçü Reseptör B1)

ICAM-1	: İntercellular Adhesion Molecule -1
IL	: İnterlökin (1,4,6,8)
MM-LDL	: Minimal Modified-LDL
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
VCAM-1	: Vascular Cell Adhesion Molecule-1
PDGF	: Platelet-Derived Growth Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
CRP	: C Reaktif Protein
M-CSF	: Macrophage Colony-Stimulating Factor
MCP-1	: Monocyte Chemotactic Protein-1
TNF-α	: Tümör Nekrotizan Faktör α
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	:Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner Arter Hastalığı (KAH) günümüzde her 3 ölümden birinin nedenidir. Her yıl yaklaşık 1,5 milyon kişi myokard infarktüsü (MI), 500 bin kişi ise inme (stroke) geçirmektedir (1). Dünya Sağlık Örgütü'nün hazırladığı rapora göre 2020 yılında ateroskleroz nedeni KKH'nın mortalitede birinci sırada olacağı tahmin edilmektedir (2).

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar aterosklerotik damar hastalığının etiyopatogenezini büyük ölçüde aydınlatmaktadır. Bugünkü görüşler, belirli bir genetik altyapıya sahip kişilerde çevresel risk faktörlerinin etkisi ile aterosklerozun başladığı, ilerlediği ve klinik olaylara yol açtığı şeklindedir. Aterosklerotik damar hastalığına yol açan bağımsız risk faktörleri birçok çalışmada tanımlanmıştır. Bu risk faktörlerinin birbirleri ile sinerjik etki göstererek koroner arter hastalığı gelişimini hızlandırdıkları anlaşılmıştır (3).

Bu faktörlerin başında hiperlipidemi gelmektedir. Çünkü deneysel çalışmalarla hiperlipidemi oluşturulmasından sonra damar duvarında aterosklerotik lezyonların geliştiği tesbit edilmiştir. Bununla birlikte hiperlipidemi düzeyi ile ateroskleroz gelişimi arasında birlikteliğin olması ve tedavi ile aterosklerotik sürecin geri döndürülebilir olması bu risk faktörünün önemini daha da arttırmaktadır (4,5).

Aterosklerozun ortaya çıkmasında en önemli basamak düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'nin oksidasyonla değişime uğramasıdır. Damar duvarına girip okside olan LDL, sitokinlerin salınımının stimülasyonu ve nitrik oksit inhibisyonu yoluyla endotelial hasar oluşturup aterosklerozu hızlandırır (6,7). Öte yandan yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyi ile kardiyovasküler hastalık (KVH) arasında ters orantı vardır. HDL kolesterolünün 1 mg/dL'lik artışının koroner kalp hastalığı riskini % 2-3 azalttığı ortaya konulmuştur (8).

HDL'nin koroner kalp hastalığı riskini azaltıcı etkisinde yapısal proteinler rol oynar. Bunlar, paraoksonaz (PON) ve kolesterol-ester transfer proteini (CETP)'dir.

PON; organofosfatlar, aromatik karboksilik asitler, karbamatlar ve sarin gibi nörotoksinlerin hidrolizini katalizleyen bir arilesteraz enzimidir. PON'un primer fizyolojik rolü hala tam olarak bilinmemesine rağmen, son çalışmalarda PON'un HDL

kolesterol ile ilişkili olduğu ve LDL'nin oksidatif modifikasyonuna karşı koruyucu bir rol oynayarak lipid peroksidasyonunu engellediği, antioksidan ve antiinflamatuvar özellik gösterdiği belirtilmektedir (9-11). PON geni (PON geni), PON1, PON2 ve PON3 genlerini içeren 7. kromozom üzerinde lokalize bir multigen ailesidir. PON geninin promotor ve kodlayıcı bölgelerinde bazı polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu polimorfizmlerin gen ekspresyon düzeylerini etkilediği ve PON enzim aktivitesini değiştirdiği tesbit edilmiştir. Ayrıca azalmış enzim aktivitesinin ateroskleroz, KKH ve diyabetik hastalarda makro ve mikrovasküler komplikasyonların (nefropati, retinopati gibi) gelişimi başta olmak üzere birçok hastalığın etyopatogenezinde rol oynayabileceği birçok çalışmada tesbit edilmiştir (9-13). Ayrıca PON1 düzeyinin, hiperkolesterolemi, ileri yaş, obezite, menopo, böbrek yetmezliği ve sigara alışkanlığı gibi durumlarda da azaldığı ortaya konulmuştur (14-18).

PON1 kodlayıcı bölgeleri iki sık polimorfizm içerir. Bunlar, 55. kodonda lösin (L) ile methionin (M) değişimini içeren polimorfizm ve 192. kodonda glutamin (Q) ile arginin (R) değişimini içeren polimorfizmdir. Bu polimorfizmler enzimin aktivitesini etkiler. Bu çalışmaya konu olan araştırma, 192. kodonda glutamin varyasyonu A alleli, arginin varyasyonu B alleli olarak adlandırılır. Homozigot PON1 192 (BB) alleli (arginin) taşıyanlarda ateroskleroz ve MI riskinin önemli oranda arttığı tesbit edilmiştir. Bu risk HDL kolesterol seviyesine bağlı olarak ortaya çıkar ve HDL kolesterol seviyesi 35 mg/dL'den daha az olan bireyleri etkiler. İlave olarak, PON1 192 BB genotipi genç yetişkinlerde ölümcül olmayan iskemik travma için bağımsız bir risk faktörü olarak bulunmuştur. Homozigot PON1 192 (AA) genotipi ile karşılaştırıldığında 4 kat daha fazladır. Homozigot PON1 BB genotip bireylerde KKH riskinin artması sebebiyle modifiye edilebilir risk faktörlerinin (tansiyon, lipit profili, sigara içimi, fiziksel aktivite vb.) düzeltilmesi için daha özenli davranılmasının gerekliliği bildirilmiştir (13-18) .

HDL'nin ateroskleroz'dan koruyucu etkisine aracılık eden diğer bir faktör ise CETP'dir. CETP, HDL ile çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ve LDL arasında kolesterol ve TAG'lerin karşılıklı değişimini sağlayan proteindir. Bu nedenle yüksek CETP aktivitesi HDL kolesterolü düşürür. Düşük HDL kolesterol seviyesi MI riskini artırır. 35 mg/dL'den düşük HDL-K seviyesi olan bireyler, HDL-K seviyesi yüksek olan bireylere oranla 2-3 kat daha fazla MI riski taşır. HDL-K seviyesindeki her 5

mg/dL'lik azalmanın MI riskini %20 arttırdığı tesbit edilmiştir. İlk defa 1987 yılında CETP geninin ilk intronunun 279. pozisyonunda yaygın olarak adeninin guanine (G>A) değişimi keşfedilmiştir. Guanin alleli (G), B1 genotipi ve adenin alleli (A), B2 genotipi olarak adlandırılır. Avrupa popülasyonunun yaklaşık %35 i B1 alleli için homozigottur. Bu homozigotluk HDL kolesterol düzeyinde ciddi bir azalma ve artan MI riski ile ilişkilidir (18-25)

Ateroskleroza karşı koruyucu etkisi ispatlanmış olan HDL'nin bu etkisine aracılık eden PON1 ve CETP'nin gen düzeyindeki polimorfizmlerinin tesbiti sonrası değiştirilebilir risk faktörlerinin düzeltilmesiyle, MI oluşumunu engellenebilir. Bu tez çalışmasında, MI geçirip koroner anjiyografi ile koroner damar patolojisi tesbit edilen hastalarda PON1 ve CETP gen polimorfizmi ve paraoksonaz enzim aktivitesi belirlenerek, elde edilen verilere göre MI gelişimine karşı HDL'nin koruyucu etkisinin genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişiminin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Ateroskleroz tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de erişkinlerde başta gelen mortalite ve morbidite nedenidir. Ateroskleroz; hiperlipidemi, hipertansiyon, diyabet ve obezite gibi bazı risk faktörleri ile tetiklenen, çocukluk yaşlarda başlayan kompleks inflamatuvar bir süreçtir (7). Deneyisel ve klinik çalışmalar, aterosklerozun önde gelen nedenlerinden birinin, dislipidemi olduğunu göstermektedir. İnsanlarda hiperkolesterolemi varlığında endotel kaynaklı vasküler dilatasyonun bozulduğu bilinmektedir. Endotel disfonksiyonu sonucu azalmış nitrik oksit (NO) üretiminin aterosklerotik sürecin başlaması ve ilerlemesinde merkezi bir rol oynadığı ifade edilmektedir (26). Ateroskleroz genel anlamda orta veya büyük müsküler ve elastik arterlerin kalınlaşma ve sertleşmesi şeklindeki lezyonları tanımlayan bir terimdir. Lezyon yeterince büyür ise arteri daraltır ve doku veya organlarda kan perfüzyonundaki azalma sonucu iskemi veya nekroz oluşur. Bunun sonucunda MI, serebral infarktüs, ekstremitelerde gangren veya ani kardiyak ölüm gibi olaylar gerçekleşebilir (27).

Aterosklerotik hastalıkların major risk faktörlerinden birisi olan dislipidemi, anormal plazma lipid düzeyi olarak tanımlanır ve total kolesterol (TK), LDL-K, lipoprotein(a), TAG ve küçük-yoğunluklu LDL (sdLDL) partiküllerinin yüksek, HDL-K'un ise düşük olduğu durumlar ile karakterizedir (28). Ateroskleroz gelişimine yol açan risk faktörleri aşağıda sıralanmıştır (27) .

Majör Risk Faktörleri

I. Değiştirilebilir risk faktörleri

1. Dislipidemi
 - Hiperkolesterolemi
 - HDL-K düşüklüğü
2. Hipertansiyon
3. Sigara
4. Diabetes Mellitus

II. Değiştirilemeyen risk faktörleri

1. Yaş
2. Cinsiyet

3. Kalıtım

Minör Risk Faktörleri

1. Hipertrigliseridemi
2. Fiziksel aktivite azlığı
3. Obezite
4. Stresli kişilik yapısı

Yeni Risk Faktörleri

1. Koagulasyon eğilimini arttıran faktörler
 - Fibrinojen
 - Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1)
 - Hiperhomosisteinemi
 - Lipoprotein (a) yüksekliği
 - F-VII, F-VIII, V-WF yüksekliği
2. İnflamasyon göstergeleri (fibrinojen, CRP, Cu, Fe, IL-6, TNF- α gibi)

2.1. Lipid ve Lipoprotein Metabolizması

Başlıca karbon hidrojen ve oksijen atomlarından oluşan lipidler; büyük bir çoğunluğu suda çözünmeyen, buna karşılık eter, kloroform, aseton gibi organik çözücülerde kolaylıkla çözünebilen biyo moleküllerdir. Az miktarlarda bulunan fosfor (P), azot (N) ve kükürt (S) ise bazı lipid türlerinde bulunmaktadır.

Lipidler polar ve nonpolar olarak iki gruba ayrılır. Polar lipidler sınırlı da olsa suda çözünebilme özelliği gösterirler. Bu grup içerisinde serbest kolesterol, yağ asitleri, fosfolipidler yer alır. Non polar lipidler ise TAG ve kolesterol esterleridir (29,30). Hidrofobik özellikleri nedeni ile nonpolar lipidlerin plazmada taşınmaları mümkün değildir. Ancak, taşıma işlemi, lipoproteinler olarak adlandırılan özel kompleks yapılar sayesinde mümkün olur. Tüm lipoproteinlerin temel yapısı benzer olup, kolesterol esterleri ve trigliseritlerin yer aldığı, nötral lipidlerden oluşan bir çekirdeğe ve daha polar lipidlerden (esterleşmemiş kolesterol ve fosfolipidler) ve protein kısmını oluşturan apoproteinlerden oluşan bir dış tabakaya sahiptirler. Böylece, bu polar yüzey, plazmadaki apolar nitelikte olan kolesterol esterleri ve trigliseritlerin bir yerden başka bir yere taşınmasını sağlar.

2.1.1. Lipoprotein Metabolizmasını Düzenleyen Başlıca Apolipoproteinler

Lipoprotein yapısında yer alan proteinler, apoprotein (apo) olarak adlandırılır. Yaklaşık on değişik protein partikülü çeşitli lipoproteinlerle ilişkilidir ve adlandırılmasında esas teşkil etmektedir (apoA, apoB, apoC) (30).

Apolipoproteinlerin başlıca iki fonksiyonu vardır.

1. Lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT), lipoprotein lipaz (LPL) ve hepatik lipaz (HL) gibi enzimlerin aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynamak.

2. Lipoproteinlerin hücrelerdeki reseptörler tarafından tanınmasını sağlayarak, lipoproteinlerin reseptör bağımlı endositoz ile hücre içine alınmasını kolaylaştırmak (31-33). Plazma apolipoproteinlerinin genel özellikleri tablo 2.1’de özetlenmiştir.

Tablo 2.1. : Plazma Apolipoproteinleri’nin Genel Özellikleri

Apolipoprotein	Bulunduğu Lipoprotein	Sentezlendiği Yer	Molekül Ağırlığı (Da)
A-I	Şilomikron HDL	Bağırsak Karaciğer	28.000
A-II	Şilomikron HDL	Bağırsak Karaciğer	17.000
A-IV	Şilomikron HDL	Bağırsak	46.000
B-100	VLDL, IDL, LDL	Karaciğer	550.000
B-48	Şilomikron	Bağırsak	264.000
C-I	Şilomikron VLDL, IDL, HDL	Karaciğer	5800
C-II	Şilomikron VLDL, IDL, HDL	Karaciğer	9100
C-III	Şilomikron VLDL, IDL, HDL	Karaciğer	8750
E2	Şilomikron VLDL, IDL, HDL	Karaciğer ve çevresel dokular	35.000
E3	Şilomikron VLDL, IDL, HDL	Karaciğer ve çevresel dokular	35.000

2.1.1.1. Apolipoprotein A

HDL yapısında bulunan major proteindir. Aynı zamanda şilomikronların yapısında da bulunur. Apo A-I ve Apo A-II olmak üzere iki ana şekli vardır.

ApoA-I: ApoA-I, karaciğer ve bağırsakda sentez edilen 243 aminoasit içeren bir proteindir (34). Plazma Apo A-I seviyesi HDL-K seviyesiyle büyük oranda korelasyon gösterir. Apo A-I'in ekspresyonu, plazma HDL seviyesini etkiler. Apo A-I aynı zamanda LCAT'ın kofaktörü olarak fonksiyon görür. LCAT ise HDL'deki kolesterolün esterleştirilmesinden sorumludur. Ayrıca Apo A-I, ATP-bağlayıcı casette protein (ABC)'nin ligandıdır. Periferik dokularda Apo A-I'in bu proteinle etkileşimi sonucu hücrenin kullanmadığı fazla kolesterol HDL içine aktarılır. Daha sonra LCAT ile esterleştirildikten sonra bu kolesterol karaciğere taşınır. Periferik dokulardan kolesterolün HDL vasıtasıyla karaciğere taşınmasına Reverse Kolesterol Transportu (RTC) adı verilmektedir (35). Bu transportta önemli rolü olan Apo A-I'in ateroskleroza karşı koruyucu bir faktör olduğu pek çok çalışmada ifade edilmiştir (36).

ApoA-II: HDL'nin ikinci önemli apolipoproteinidir ApoA-II öncelikle karaciğerde (37) 100 aminoasitlik prekürsör olarak preproapo A-II şeklinde sentez edilir. Daha sonra 18 aminoasitlik bölümü ko-translasyonel modifikasyonla koparılarak proapo A-II oluşturulur. Son olarak post-translasyonel modifikasyonla 5 aa'lık kısım koparılarak olgun Apo A-II oluşturulur.

Apo A-II, plazmada birbirine disülfür köprüleriyle bağlanmış iki zincirden oluşan (72 aa'lık) dimerik yapıda bulunur (38,39). İnsan Apo-II geni, 1. kromozom üzerinde lokalizedir (40,41). Bu genin ekspresyonu, nükleer reseptörler (PPAR α , Retinoid x Reseptör, ROR α SREBP) (42-46) tarafından kontrol edilir. ApoA-II'nin HL, LCAT ve CETP (47-50) aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynadığı tesbit edilmiştir.

Çok sayıda çalışmada, Apo A-II'nin HDL LCAT aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (51-54). Mowri ve ark. apoA-I ve apoA-II içeren HDL'nin yalnızca apo-I içeren HDL'ye göre HL aktivitesini daha fazla arttırdığını göstermiştir (55). Yine deneysel çalışmalarla, apo A-II'nin LPL aktivitesini inhibe ettiği belirlenmiştir (56). ApoA-II yönünden zengin olan HDL₃'ün CETP aracılı kolesterol ester transferini önemli oranda azalttığı gösterilmiştir (57). Bu sebeple HDL'deki apo A-I/apo A-II oranı kolesterol ester transfer hızının önemli bir düzenleyicisi olabilir

Apo A-I / A-II oranı yaklaşık 3/1' dir. Kadınlarda apoA-I'in konsantrasyonu erkeklere göre daha yüksek olduğu halde, apoA-II düzeyleri her iki cinste de aynıdır (36,58).

HDL₂' nin yapısında apoA-I bulunurken, HDL₃' ün yapısında apo A-I ve apo A-II bulunur. Serum apo A-I konsantrasyonu ile ateroskleroz gelişimi arasında negatif bir ilişki vardır. A grubu apoproteinler, karaciğer ve böbrekde yıkılırlar. Apo A-I ve apo A-II' nin katabolizma hızı hemen hemen aynıdır.

HDL ve şilomikronların yapısında bulunduğu bilinen bir diğer apoprotein ise apo A-IV dür. Apo A-IV bağırsakta sentez edilen 376 aa'lık bir proteindir. İnsan apo A-IV kodlayıcı geni 11. Kromozom üzerindedir. LCAT'ın aktivatörüdür. Muhtemel fonksiyonu TAG metabolizması üzerindedir (10) .

2.1.1.2. Apolipoprotein C

Başlıca karaciğerde sentez edilen apolipoprotein C (apoC), lipoproteinler arasında kolaylıkla aktarılabilen düşük molekül ağırlıklı bir proteindir. Apo C-I, apo C-II ve apo C-III olarak adlandırılan farklı üç alt grubu vardır ve LDL dışındaki tüm lipoproteinlerin yapısında bulunur (38). Apo C-II yağ dokusunda şilomikron ve VLDL' yi hidroliz eden LPL'in kofaktörüdür. Apo C-I, apo E'nin lipoprotein reseptörlerine bağlanmasını engelleyerek TAG'den zengin lipoproteinlerin periferik dokular ve karaciğere alımını düzenler (59,60).

Apolipoprotein CIII, glikoprotein yapısındadır. TAG'den zengin lipoproteinlerin (TZL) majör, HDL'nin ise minör bir bileşenidir. Bu yüzden TZL metabolizmasının iyi bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (61). TZL'in LPL bağlanmasını baskılayan apo CIII, aynı zamanda TZL'in ve kalıntılarının apo E aracılığıyla LDL reseptörüne bağlanarak karaciğere alınmasını da baskılamaktadır. (62) TZL'in plazmadan gecikmeli olarak temizlenmesi, lipoprotein kolesterolünün damar duvarında depo edilmesi ihtimalini yükseltmektedir. Sonuç olarak bu gecikme, çeşitli çalışmalarda artmış koroner risk (63) ve myokard iskemisi (64) ile ilişkili bulunmuş ve apo CIII'ün kardiyovasküler riski arttırdığı tesbit edilmiştir (65,66).

2.1.1.3. Apolipoprotein D

Apolipoprotein D (Apo D), lipocalin süperaillesine ait olan 169 aminoasitli atipik bir apolipoproteindir (67). Apo D, amino asit dizilimi açısından diğer apolipoproteinlere benzemediğinden atipik olarak nitelendirilir. Lipocalin süperaillesine, yağ asidi bağlayıcı protein (FABPs), plazma retinol bağlayıcı protein (RBP) ve apolipoprotein M gibi çeşitli lipid bağlayıcı proteinler girmektedir (67-71). Diğer apolipoproteinler çoğunlukla karaciğer ve bağırsakta üretilirken, apo D pek çok dokudan (beyin, periferik sinir, karaciğer, kalp ve iskelet kası, adipoz doku, plesenta, over, testis, dalak, akciğer ve pankreas) kaynaklanır (68,72-74). Apo D, HDL yapısında çok, VLDL yapısında daha az bulunur (75). Farelerde yapılan çalışmalarda apo D düzeylerindeki artışın plazma TAG düzeylerinde azalma ile sonuçlandığı tesbit edilmiştir. Bu etki plazma lipoprotein lipaz aktivitesinin artırılması sonucu TAG'den zengin partiküllerin katabolizmalarının hızlanması neticesinde ortaya çıkmaktadır.

2.1.1.4 Apolipoprotein J (Klusterin)

HDL yapısındaki diğer bir apoprotein olan apoJ (klusterin), 449 amino asit içeren bir glikoproteindir. Olgunlaşmadan önceki molekül ağırlığı 60 kDa'dur. Glikozilasyon sonrası molekül ağırlığı 70-80 kDa olur ve olgun apoJ olarak sekrete edilir (76 , 77). Her biri yaklaşık 40 kDa olan ve birbirine beş disülfür köprüsüyle bağlı bir α ve bir β zincirinden oluşan heterodimer yapıdadır (78). Birçok dokuda eksprese edilen apoJ, lipidler, apo A-I, PON ve LDL reseptör aracılı protein (gp 330) gibi biyolojik moleküllere bağlanır. Plazmada HDL'nin lipid içeriği az olan alt grubunun (HDL₃) bir bileşenidir (77). ApoJ'nin normal arteriyel dokularda bulunmazken insan ve fare ateroklerotik lezyonlarında antiaterogenik bir faktör olabileceği tesbit edilmiştir. ApoJ, lipidler, immünoglobulinler, kompleman faktörleri ve amiloid proteinleri gibi birçok molekülün yapısında bulunur. Bu nedenle hücrel koruma, sentez, adezyon veya lipid transportu gibi çeşitli biyolojik süreçleri etkiler. Ayrıca doku hasarı, ateroskleroz veya nörodejeneratif hastalıklar gibi durumlarla da ilişkilidir (80). Isı şok proteinleri (şaperonlar), proteinlerin katlanma basamağında rol oynarlar. Polipeptid zincir bağlayıcı proteinler olan şaperonlar, katlanma işlemi sırasında son basamağın hızını arttırarak katalizör gibi davranırlar. Isı şok proteinlerine yapısal benzerliği olan apoJ' nin protein agregasyonunu önlediği ve strese cevap olarak sekresyonunun arttığı gösterilmiştir

(80,81). Bazı çalışmalarda da apoJ' nin sitotoksik ajanlara karşı koruyucu olduğu, epitel hücrelerini H_2O_2 'nin oksidatif hasarından koruduğu ileri sürülmüştür (80).

2.1.1.5.Apolipoprotein B

HDL'den başka diğer tüm lipoproteinlerin majör kısmını oluşturur. ApoB'nin insanda B-100 ve B-48 olmak üzere iki izoformu bulunur.

Apo B-48 2152 aminoasit içerir ve bağırsakta sentez edilir (29,33). Diyetle alınan TAG ve serbest kolesterol ile kompleks oluşturarak şilomikron şeklinde sindirim kanalı lümeninden absorbe edilir. Daha sonra bu yapı dolaşımda ve karaciğerde metabolize olur.

ApoB-100 4536 aminoasit içerir ve karaciğerde sentez edilir (29,33). VLDL, IDL ve LDL'nin başlıca apoproteinidir. Yapısal rolüne ek olarak apoB-100 LDL reseptörü için ligand görevi yapar (35). ApoB-100'ün karboksil ucu reseptöre bağlanmayı sağlar. ApoB-100'ün LDL reseptörü ile ilişkisinde pozitif yüklü amino asitler olan arginin ve lizin'in önemli olduğu ortaya konmuştur.

ApoB-48 yapısal olarak ismini aldığı apoB-100'ün amino terminalinin yalnızca %48'ne eşittir. ApoB-48, apoB-100'ün karboksil terminalini içermediğinden LDL reseptörüne bağlanamaz (29,32). Serum apoB düzeyi yüksek bulunan bireylerde ateroskleroz gelişme potansiyeli artmış olduğundan, bu kişilerde fatal MI geçirme riski yüksek olarak tesbit edilmiştir (83,84). Bu sebeple plazma apoB düzeyi ve/veya apo B/apoA-I oranı LDL-K düzeylerine göre kardiyovasküler hastalık riskinin tesbitinde daha önemli bir göstergedir (84,85).

2.1.1.6.Apolipoprotein E

Argininden zengin apolipoprotein olarak da bilinen apolipoprotein E (apoE), 299 amino asit içeren bir proteindir. En az dört polimorfik formu bulunan apoE' nin bu major izoformlarının her biri, posttranslasyonel glikozilasyonun bir sonucu olarak meydana gelir. ApoE' nin %75 den fazlası karaciğerde hepatositler tarafından üretilir.

Apo E, LDL reseptörleri için ligand olarak görev yapan ve bu reseptörlerle etkileşimi sonucu çeşitli vücut hücrelerindeki kolesterol ve diğer lipidlerin taşınmasına katılan bir plazma proteindir (86). ApoE geni 19. kromozom üzerinde apoC-I genine bağlı olarak bulunmaktadır. Ayrıca LDL reseptör geni ve apoC-II geni de bu

kromozomda yer almaktadır. Apo E 'nin üç esas izoformunun, tek bir gen lokusundaki üç allelin (ϵ_2 , ϵ_3 , ϵ_4) ürettiği apo E₂, E₃ ve E₄ olduğu kabul edilmiştir (86-88).

Çeşitli toplumlarda yapılan çalışmalarda, apoE₄'ün yüksek plazma TK , düşük HDL-K ve KKH ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (89). Apo ϵ_2 allelinin ise serum TAG düzeylerinde artışa neden olduğu öne sürülmüştür (86). Koroner arter hastası erkeklerde izoelektrik odaklama ve Western Blotlama ile yapılan apoE fenotipleme çalışmalarında, plazma total ve LDL-kolesterol düzeyinin apoE fenotipini izleyen şu sıraya göre arttığı gösterilmiştir: $E_{3/2} < E_{3/3} < E_{3/4} < E_{4/4}$. MI'lı hastaların rölatif sıklığının da aynı sıraya göre arttığı bildirilmiştir (90,91). ApoE₄ alleleline sahip bireylerde koroner arter hastalığının daha ciddi seyrettiği ayrıca bu hastaların daha sık infarktüs geçirdikleri gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar ApoE alleli ϵ_4 'ün ateroskleroz için bir risk faktörü olduğu, ayrıca koroner arter hastalığının şiddetini belirlediğini göstermektedir (91,92).

2.1.2. Lipoprotein Sınıfları

Lipoproteinleri, dansitelerine, elektroforetik ortamdaki hareket özelliklerine ve ultrasantifügasyondaki davranışlarına başlıca beş sınıfa ayırmak mümkündür (30).

1. Şilomikronlar
2. Çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL)
3. Düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL)
4. Orta yoğunluklu lipoproteinler (IDL)
5. Yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL)

Bu lipoproteinlerin her biri farklı oranlarda TAG, kolesterol ve apolipoprotein içerir. Lipid miktarı azalıp protein miktarı arttığında yoğunlukta artar.

Lipoproteinler yapılarında bulunan proteinlerden dolayı elektroforetik olarak birbirinden ayrılabilir. Sellüloz asetat veya agaroz jel elektroforezinde normal bir şahısta 12 saatlik açlık sonrası serumda α , pre- β ve β olmak üzere üç ana band görülmektedir. Lipoproteinler oluşan bandlara göre şu şekilde sınıflanmaktadır:

a) β -Lipoproteinler (β -LP): Örneklerin uygulandığı bölgenin en yakınında yer alan bandır. Protein elektroforezinde β -globulin bölgesine karşılık geldiği için, lipoprotein elektroforezinde β -LP bölgesi adı verilir. Bu bandı LDL oluşturmaktadır.

b) Pre- β -lipoproteinler: Protein elektroforezindeki α_2 bölgesinde bulunmaktadır. VLDL'nin oluşturduğu bandır.

c) α -lipoproteinler: Protein elektroforezindeki α_1 -globulin bölgesinde bulunmaktadır. HDL'nin oluşturduğu banddır.

Bunların dışında bazı durumlarda elektroforezde görülebilen bandlar vardır. Bu bandlar:

Şilomikronlar: Serumun uygulandığı bölgede (orjin) şilomikronların ortaya çıkması, tokluk kanı veya şilomikron katabolizmasındaki bir bozukluk sonucu ortaya çıkmaktadır.

IDL: Geniş- β olarak adlandırılan bu band β ile pre- β bölgesi arasında görülmektedir. Bu bandın görülmesi, IDL parçalanmasında metabolik bir bozukluk olduğunu göstermektedir.

Lp(a) : Rutin elektroforez şartlarında Lp(a), pre- β bölgesinde yer almaktadır.

Plazma lipoproteinlerinin ayrılmasında kullanılan diğer bir yöntem de ultrasantrifugasyondur. Ultrasantrifüjle lipoproteinler yoğunluklarına göre; şilomikronlar, VLDL, IDL, LDL, Lp(a) ve HDL olarak düşükten yükseğe doğru sıralanmaktadır.

Tablo 2.2: Major Plazma Lipoproteinlerinin Genel Özellikleri (30)

Özellik	Şilomikron	VLDL	IDL	LDL	HDL
Dansite (g/mL)	<0.95	0.95-1.006	1.006-1.019	1.019-1.063	1.063-1.21
Elektroforetik Mobilité	orjin	Pre- β	β ve pre- β arası	B	A
Moleküler Ağırlık (Da)	0,4-30*10 ⁶	5-10*10 ⁶	3,9-4,8*10 ⁶	2,75*10 ⁶	1,8-3,6*10 ⁶
Çap (nm)	>70	25-70	22-44	19-23	4-10
Lipid/Protein	99/1	90/10	85/15	80/20	50/50
Major lipidler	Eksojen TAG	Endojen TAG	Endojen TAG, kolesterol esteri	Kolesterol esteri	Fosfolipid
Major proteinler	AI, B48, CI CII, CIII	B100, CI CII, CIII,	B100, E	B100, E	AI, AII

		E			
--	--	---	--	--	--

2.1.2.1.Şilomikronlar

Şilomikronlar, lipoproteinler içerisinde çapı en büyük olanıdır. Başlıca apolipoproteinleri A-I, A-II, A-IV ve B-48' dir. ApoB-48, ince bağırsağın (duodenum ve proksimal jejunum) epitel hücreleri tarafından yapılan tek apolipoproteindir. ApoA-I ve A-II, HDL'de bulunan C ve E apoproteinleriyle yer değiştirir. ApoC-II tarafından aktiveleştirilen ekstrasellüler LPL enziminin şilomikron ve VLDL'deki TAG'lerin hidrolizi sonucu serbest yağ asitleri açığa çıkar. Serbest yağ asitleri TAG olarak depolanmak, enerji kaynağı olarak okside olmak veya yeniden TAG yapımında kullanılmak üzere çeşitli dokular tarafından alınırlar.

LPL kapiller duvarında bulunur ve heparan sulfat'ın negatif yüklü proteoglikan zinciriyle endotele sıkıca bağlanmıştır. Normalde kanda bulunmayan LPL heparin enjeksiyonundan sonra bağlandığı yerden ayrılarak dolaşıma geçer. LPL kalp, adipoz doku, dalak, akciğer, renal medulla, aorta, diyafragma, laktasyon yapan meme bezinde bulunur. LPL aktivitesi için fosfolipidler ve apo C-II gerekli kofaktörlerdir. Apo A-II ve apo C-III ise LPL'nin inhibitörüdür. Kalp LPL'ı yağ dokusundakine göre on kat daha küçük Km'ye sahiptir. Bu durum açlıkta plazma TAG düzeyi azaldığında adipoz dokudan kalbe gönderilen TAG'lerin yıkılarak yağ asitlerinin oluşmasını sağlar. Benzer bir durum laktasyon yapan meme bezinde de mevcuttur (93).

Dolaşımdaki şilomikronlar LPL etkisi ile küçülür. Apo A, C-II C-III ve bir kısım apoE'yi HDL'ye transfer ettikten sonra, TAG'den fakir kolesterolden zengin şilomikron artığı olarak dolaşımda yer alır (29,33). Şilomikron artıkları, karaciğer parankim hücreleri tarafından LDL reseptör ve LDL reseptör ilişkili protein (LRP) aracılığıyla reseptör aracılı endositozla alınır. Daha sonra şilomikron içindeki kolesterol esterleri ve kolesterol, hepatik lipaz tarafından hidrolize edilir (93).

Diyetle yüksek düzeyde yağ alımı, şilomikron yapımını artırır. Absorbsiyon sonrası (12-15 saat açlıkta) şilomikron dolaşımda bulunmaz. Ayrıca yüksek karbonhidrat, düşük yağ alımı şilomikron yapımını azaltır. Bu gibi durumda ince bağırsaktan portal vene VLDL sekrete edilir ve TAG transportu bu yolla yapılır. Bu partiküller dolaşımdaki VLDL'nin % 10-20 kadarını oluşturur ve şilomikronlar gibi metabolize edilirler (94).

2.1.2.2. Çok Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (VLDL)

Hepatositlere fazla miktarda yağ asidi geldiğinde karaciğerde VLDL üretimi uyarılır. Karaciğere yağ asidi girişinin artması yüksek yağlı diyet, çeşitli metabolik bozukluklar (diyabet gibi), ya da açlık nedeniyle yağ dokusundan yağ asidi salınımının artması sonucu ortaya çıkar. VLDL yapımında kullanılacak TAG üç şekilde sentez edilir:

1. Adipoz dokuda depolanmış yağların yağ asidi şeklinde salıverilmesi
2. Karbonhidratların karaciğerde yağ asidine dönüştürülmesi
3. Lipoprotein TAG'ün kapiller endotelde ve karaciğerde hidrolizi sonucu (29)

Fazla miktarda karbonhidrat içeren diyet sonrası, plazma VLDL konsantrasyonu artar. Yüksek kolesterol içeren diyetle ise VLDL'nin kompozisyonu değişir. Bu durumda lipoproteinin çekirdek kısmında kolesterol esteri TAG'den daha fazla bulunmaktadır. Apo E sentezi belirgin olarak artmaktadır (29).

VLDL partikülleri şilomikronlardan daha küçük olup %52 TAG, %18 fosfolipid, %22 kolesterol ve %8 protein içerir. Kolesterol-kolesterol ester oranı yaklaşık 1/1'dir. Sfingomiyelin ve fosfatidilkolin başlıca fosfolipidleridir. VLDL TAG'ü, endojen olup karaciğerden kaynaklanır. Başlıca apolipoproteinleri yaygın olarak Apo B-100, C-I, C-II, C-III, E-II, E-III, E-IV dür. Ayrıca az miktarda Apo A-I, A-II'de bulunur. Ana apolipoproteini, Apo B-100 dür. Dolaşıma sekrete olduktan sonra HDL'den Apo C-I, C-II, C-III ve E proteinlerini transfer eder. Şilomikronlara benzer şekilde LPL, VLDL deki TAG'leri hidroliz ederek serbest yağ asitlerini açığa çıkartır. Açığa çıkan serbest yağ asitleri, enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere kas ve depo edilmek üzere yağ doku tarafından alınır. VLDL, TAG'lerin kaybı ve apo C'nin HDL'ye transferi sonucu giderek küçülen partiküllere dönüşür ve kolesterolden zengin IDL'yi oluşturur (29,33).

2.1.2.3. Orta Yoğunluklu Lipoproteinler (IDL)

Normal olarak plazmada çok düşük konsantrasyonlarda bulunur. Büyüklük ve içerik açısından VLDL ve LDL arasında yer alır. Başlıca proteinleri apoB-100 ve E' dir.

VLDL' nin katabolizma ürünü olup HL aracılığıyla metabolize olarak LDL'yi oluşturur. LDL reseptörü ile dolaşımdan uzaklaştırılır (29,33).

2.1.2.4.Düşük Yoğunluklu Lipoproteinler (LDL)

LDL yaklaşık % 75 lipid (% 35 kolesterol esteri, % 10 serbest kolesterol, % 10 TAG, % 20 fosfolipid) ve % 25 proteinden oluşan bir lipoproteindir. Eser miktardaki apoE ve C dışında, çok miktarda apoB-100 içerir. Plazmadaki apoB-100'ün %90-95'i LDL'nin yapısındadır (31,33). Total plazma kolesterolünün yaklaşık % 70'ini LDL taşımaktadır (29,31).

VLDL'nin önce IDL'ye sonra LDL'ye dönüşmesiyle plazmada kalma süresi birkaç saatten 2,5 güne çıkar. LDL' nin uzun ömürlü olması dokular için kolesterol kaynağı olarak işlev görmesini sağlar (29).

LDL'nin plazmadan temizlenmesi apoB-100'e spesifik LDL reseptörleri aracılığıyla olur. Hücre membranındaki LDL reseptör sayısı intrasellüler kolesterol miktarına bağlı olarak gen düzeyinde düzenlenir. LDL reseptörü hücre zarındaki çukurlara toplanmış (-) yüklü glikoprotein molekülleridir. Çukurun hücre içi tarafı çukurun şeklini koruyan clatrin (MA: 180.000) adlı protein ile kaplanmıştır. LDL reseptörü sisteinden zengin birinci bölgesi ile apo B-100 veya apo E molekülündeki pozitif yüklü lizin ve arjinin aminoasitleri etkileşerek lipoproteinleri bağlar

LDL reseptörü sitozolik parçası ile endositotik vezikülü oluşturur. Endositotik vezikül oluşturulduktan sonra bu yapıyı saran clatrin hücre yüzeyine geri döner. Daha sonra ATP bağımlı proton pompası ile vezikül içi pH 5.5'e düşürülerek ligandın reseptörden ayrılması sağlanır. Ayrılan reseptörler hücre zarına geri döner. Vezikül içeriği lizozomal enzimlerle (katapsin, asit lipaz gibi) hidrolize uğrar, amino asitler ve kolesterol sitoplazmaya salıverilir.

Bu şekilde açığa çıkan serbest kolesterol başlıca üç temel fonksiyonda rol oynar

1. Yeni kolesterol sentezinin hız sınırlayıcı enzimi HMG-CoA redüktazın baskılanması
2. Açıl-kolesterol açıl transferaz (ACAT) enziminin uyarılması
3. Hücre içi aşırı kolesterol birikiminin önlenmesi için plazma membranında LDL reseptör sayısının düzenlenmesi (29,31,33).

LDL birçok hücrede kolesterol kaynağı olarak kullanılır. Karaciğer yüksek affiniteli reseptörler aracılığıyla LDL'nin hemen hemen yarısını dolaşımdan alır ve aldığı kolesterolü membran biyosentezinde, VLDL biyosentezinde, safra asidi yapımında kullanabilir. Adrenal, ovaryum ve testisler LDL kolesterolünü hormon sentezinde, diğer dokular ise hücre onarımı ve proliferasyonunda kullanırlar (33).

LDL glikozillenme, oksidasyon ve deasialasyon gibi çeşitli modifikasyonlara uğrayabilir. Modifiye olan bu lipoproteinler ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynayabilir. Ateroskleroz patogenezinde üzerinde en çok çalışılan modifiye lipoprotein okside LDL (oxLDL)' dir.

LDL, lipooksijenaz, miyeloperoksidaz, reaktif oksijen türleri (süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali) veya metal iyonlarıyla okside olabilir. LDL' nin metal iyonlarıyla oksidasyonu üç basamaktan oluşur (95,96).

1. Başlangıç basamağı: Endojen antioksidanların tüketimi
2. İlerleme basamağı: Doymamış yağ asitlerinin lipid hidroperoksitlerine oksidasyonu
3. Sonlanma basamağı: Hidroperoksitlerin reaktif aldehitlere dönüşümü

Aldehitler, apoB-100'deki lizin kalıntılarıyla reaksiyona girerek LDL'nin oksidasyonuna yol açabilir. NO bakırla oluşan oksidasyonu inhibe eder. Bu modifikasyonla LDL'nin hücreler tarafından reseptör aracılı endositozu bozulur. Hücreler tarafından alınamayan oxLDL, çööpçü (scavenger) reseptörler aracılığıyla makrofajlar tarafından fagosit edilir.

Endotel hücreleri ve monosit/makrofajlarda üretilen lipooksijenaz enzimi LDL'nin doymamış yağ asitlerinin lipid hidroperoksitlerine ve sonrasında oxLDL' ye dönüşümüne neden olabilir. LDL'nin diğer bir oksidasyon şekli de aktive makrofajlardan sekrete edilen miyeloperoksidaz aracılığı ile olmaktadır. Burada miyeloperoksidaz hipokloröz asit (HOCl), nitrojen dioksit (NO₂) gibi reaktif ürünler oluşturarak LDL lipid ve proteinlerini okside edebilir (97). NO aerobik şartlarda nitrite dönüşür. Nitrit, LDL' nin miyeloperoksidazla okside olmasını inhibe eder.

Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve

oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri ($L^\bullet$) ve lipid peroksit radikallerinin ($LOO^\bullet$) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROT) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna "nonenzimatik lipid peroksidasyonu" denir. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipid radikali ($L^\bullet$) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin ($L^\bullet$) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri ($LOO^\bullet$) oluşur. Lipid peroksit radikalleri ($LOO^\bullet$), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidhidroperoksitlerine ($LOOH$) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder. ROT'in başlattığı lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu sonucunda lipid hidroperoksitleri ($LOOH$) ve konjuge dienler oluşur. $LOOH$ ve konjuge dienler de daha sonra Fe^{+3} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Mo^{+5} gibi geçiş metalleri ile parçalanarak alkan aldehitler, alken aldehitler, hidroksialken aldehitler, MDA ve uçucu hidrokarbonları oluştururlar. Oluşan bu ürünler $LOOH$ ve konjuge dienlere göre çok daha fazla LDL'yi okside etmektedirler (99-101).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir. MDA kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır.

Yukarıdaki oksidatif mekanizmalarla meydana getirilen oxLDL, LDL'nin bağlanamadığı çöpçü reseptörleri (Scavenger reseptör A) ve CD36 reseptörlerine bağlanır (83,102,103). Bu reseptörler hücre içindeki kolesterol düzeyi tarafından regüle edilemez ve subendotelial yerleşimli makrofajlar oxLDL'yi kontrolsüz bir biçimde hücre içine alarak köpük hücrelerini meydana getirirler (31,102,103). Scavenger reseptör A (SRA) ve CD36 reseptörü bulunmayan farelerde aterosklerozun gelişiminin yavaşladığı bildirilmiştir (102). Bu köpük hücrelerde birikerek aterosklerotik

lezyonların patogeneğinde önemli rol oynarlar. Modifiye LDL'nin aterogeneindeki değişik etkileri vardır

- Çöpçü (scavenger) reseptörler aracılığıyla tanınarak makrofajlar ve düz kas hücreleri tarafından fagosite edilir.
- Endotel hücreleri ve düz kas hücrelerine sitotoksik etki gösterir.
- oxLDL, MCP-1 sekresyonunu arttırarak daha fazla monositin endotel yüzeyine infiltrasyonuna, M-CSF (Macrophage Colony-Stimulating Factor) sekresyonu ile de daha fazla makrofaj üretilmesine böylece köpük hücre oluşumunun artmasına neden olur (104).
- Endotel adezyon moleküllerinin (ICAM-1, VCAM-1) üretimini uyarak monosit ve T lenfositlerin damar duvarına yapışmasını kolaylaştırır.
- Plak içindeki makrofajların motilitesini inhibe ederek, lezyondaki makrofaj sayısının artmasına yardımcı olur.
- Bazı büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılanmasını uyarır.
- İmmunojeniktir, antikor oluşumunu tetikler (105).
- oxLDL vazokonstriktör endotelin-1 (ET-1) üretimini stimüle ederken (106), vazodilatör NO üretimini azaltır (107).
- oxLDL platelet adezyon ve agregasyonunu, endotelde NO üretimini azaltarak, PGI₂ (prostasiklin) üretimini arttırarak stimüle eder (108). Prokoagulan aktiviteyi endotel ve düz kas hücrelerinden doku faktörü (TF) sekresyonunu arttırarak sağlar (109). Ayrıca trombomodulin transkripsiyonunu azaltarak (110) ve protein C aktivasyonunu baskılayarak (111) prokoagulan aktiviteyi arttırır.
- oxLDL, doku plazminojen aktivatör (tPA) sekresyonunu azaltarak ve PAI-1 sekresyonunu arttırarak fibrinolitik aktiviteyi azaltır (112).

HDL, LDL'yi oksidasyondan koruyabilme yeteneğine sahiptir. LDL'nin oksidasyondan korunmasında, PON1'in HDL üzerine katalizör etkisinin olabileceği düşünülmektedir. PON1, lipid peroksidlerinin aterojenik etkilerini nötralize ederek hücre membranlarını koruyucu etki gösterir (113). PON1, LDL'yi bakır iyonunun ve serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan korumaktadır (113,114). LDL oksidasyonu esnasında oluşan okside kolesterol esterleri ve lizofosfatidilkolinler PON1 enzimidaki serbest sülfidril grubu ile etkileşime girer ve enzimin inaktive olmasına yol açar.

Oksidatif sistemlerdeki $\text{Cu}^{+1}/\text{Cu}^{+2}$ iyonlarının oksidasyon esnasında, PON1'in paraoksonaz/arilesteraz aktivitesi için gerekli olan Ca^{+2} iyonunun yerine geçmesinin PON1'in kısmen inaktivasyonundan sorumlu olabileceği de düşünülmektedir. PON1 inhibitörlerinin, LDL oksidasyonunu artırması, hem PON1 inaktivasyonuna hem HDL lipidlerinin total lipid peroksit oluşumuna katılmasına bağlıdır (115). Kısmen okside olmuş fosfolipidlerin, PON1'in ekspresyonunu azalttığı, enflamatuvar sitokinlerin (IL-6) apoJ'yi arttırdığı ve IL-6'nın PON1 regülasyonu için kısa dönemde etkili olduğu bulunmuştur. MCP-1'in okside olmuş fosfolipidlerin regülasyonu için gerekli olmadığı belirtilmiştir (116).

Özellikle son yıllarda üzerinde önemle durulan diğer bir modifikasyon ise LDL'de sialik asit düzeyinin azalması ile köpük hücre oluşumunun artarak ateroskleroza yol açmasıdır. Sialik asit LDL'nin protein ve lipid fonksiyonel gruplarının bir bileşenidir. LDL'nin reseptör aracılı hücre alımı, arteriyel proteoglikanlara bağlanma ilgisi ve oksidasyona olan yatkınlığı içerdiği sialik asit miktarına bağlı olarak düzenlenebileceği belirtilmiştir (117). Anjiyografi ile KAH tanısı konan hastaların plazmalarından izole edilen LDL'lerdeki total sialik asit düzeyi sağlıklı kişilere göre %40–75 oranında daha düşük bulunmuştur. Bu bulgu sialik asit kalıntısını kaybetmiş LDL olarak adlandırılan LDL'nin bu modifikasyonunun KAH ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür. Bu sebeple bazı yazarlar LDL sialik asit içeriğinin kardiyovasküler risk için yeni bir markır olabileceğini öne sürmüşlerdir (118-123).

LDL'nin diğer bir modifikasyon şekli de glikozillenmedir. Glikozile LDL, LDL reseptörlerine zayıf olarak bağlanır ve böylece plazmada kalış süresi artar ve muhtemelen arter duvarının extraselüler alanında oksidatif modifikasyona uğrarlar. Glikozile LDL, uyarılmış kolesterol dışı akımının bozulmasına ve kolesterol esterlerinin apo-B içeren lipoproteinlere transferini kolaylaştırmaktadır (124).

LDL büyüklük ve yoğunluk bakımından farklı iki fenotipik özellik gösterir. LDL çapının 25.5 nm'nin altında olduğu şekil B patterni olup küçük-yoğun LDL (sdLDL) olarak adlandırılır. Diğer LDL tipi A patterni olup çapı 25.5 nm'den büyüktür. Çapı 25.5 nm ve altında olan sdLDL' nin dansitesi 1.044-1.063 gr/mL' dir (94). sdLDL'nin, KKH riskini yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, serum TAG, LDL ve HDL kolesterol konsantrasyonlarından bağımsız olarak arttırdığı tesbit edilmiştir (125).

KKH olan hastaların yarısından fazlasında, LDL kolesterolünün normal düzeyde olması sdLDL içeriğinin fazla olması ile açıklanabilir (126).

sdLDL'nin subintimal boşluk içine kolayca girip, intimal proteoglikanlara fazla miktarda bağlanarak aterojen özellik gösterdiği tesbit edilmiştir. Ayrıca sdLDL'nin LDL reseptörüne afinitesi az, oksidasyona olan yatkınlığı ise yüksektir. Yarı ömrü daha uzun olup, dolaşımdan güçlükle uzaklaştırılır. Plazmada daha uzun süre kalması nedeniyle oksidasyona uğrama ihtimali fazladır (127). sdLDL'nin serbest kolesterol içeriğinin düşük, çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) içeriğinin ise daha yüksek olması, oksidasyona olan yatkınlığına katkıda bulunabilir (128).

sdLDL oluşumundaki kilit nokta kanda TAG düzeyinin yüksekliğidir. HL ve CETP aktivitesi de sdLDL oluşumunda rol oynar. Hafif veya orta derecede TAG yüksekliğinde, VLDL oranı artar. VLDL yıkımı ile oluşan LDL'nin apoB-100 konformasyonu değiştiğinden LDL reseptörüne bağlanma özelliği azalmış, dolaşımda kalma süresi uzamıştır (127,129).

B patternindeki kişilerin plazma TAG'leri A patternindeki kişilere göre iki kat daha yüksektir. Ayrıca B patterninde apoB ve IDL düzeyi daha yüksek, HDL ve apoA-I düzeyi ise daha düşüktür (130). sdLDL'nin kandaki düzeyi, insülin direnci, Tip 2 diabetes mellitus, metabolik sendrom, renal hastalık ve preeklampside artmaktadır. Ayrıca yağdan fakir ve karbonhidrattan zengin beslenme, bu fenotipe yatkınlığı olan kişilerde sdLDL'nin artmasına zemin hazırlar. Yine, ailesel kombine hiperlipidemide B fenotipinin sıklığı artar (127).

2.1.2.5.Yüksek Yoğunluklu Lipoproteinler (HDL)

En küçük lipoprotein partikülüdür. Karaciğer ve bağırsakta sentez edilir. HDL'nin %50'si lipid (% 25 fosfolipid, % 15 kolesterol esteri, % 5 serbest kolesterol, % 5 TAG) ve % 50'si proteinden oluşur. Başlıca apoproteinleri apoA-I (% 65), apoA-II (% 25) dir (26). ApoJ çoğunlukla HDL₃ subfraksiyonunda bulunur. Apo C ve apo E karaciğerde sentez edilir ve bağırsakta sentez edilen HDL'ye dolaşıma salındıktan sonra transfer edilir (32). Plazmadaki apoE' nin yaklaşık % 50'si HDL₁'de bulunur. HDL' nin diğer sınıfları (HDL₂ ve HDL₃) ise apoE içermez. HDL₁, plazmada diğer lipoproteinlere apoE ve apoC transfer eder. HDL alt grupları apoA-I veya apoA-I/II kompleksi içerebilir. Dolaşımda HDL partikülleriyle birlikte gezen "lesitin kolesterol acil

transferaz" 'ın etkinleşmesinde apo A-I çok önemlidir. HDL molekülünün olgunlaşma sürecinde apoA-I ile LCAT birleşir. LCAT, HDL yapısında bir fosfolipid olan lesitinin ikinci karbonu ile linoleik asit arasındaki ester bağını kırarak buradaki linoleik aside kolesterolün bağlanmasını ve böylece serbest kolesterolün ester kolesterole dönüşmesini sağlar (29,33). Oluşturulan kolesterol esterleri HDL'nin hidrofobik çekirdeğinde biriktirilir. Lesitinden bir yağ asidinin çıkarılması ile oluşan yapı lizolesitin olup plazma albuminine transfer edilir (32). LCAT beyinde de üretilbilmekle birlikte, özellikle karaciğerde sentezlenir. İnsanlarda kolesterol esterlerinin büyük çoğunluğu LCAT aracılığıyla oluşur (131) .

Yeni sentezlenmiş HDL (olgunlaşmamış HDL, pre- β -HDL veya HDL₁) plazmada apoA-I, A-II ve fosfolipid içeren disk halinde bulunur. Olgunlaşmamış HDL'ler, diğer lipoproteinlerden veya aşırı kolesterol içeren hücre zarlarından serbest kolesterolü alırlar. Serbest kolesterol HDL'de LCAT enzimi ile kolesterol esterine dönüştürülür ve biriktirmeye başlanır. Böylece disk şeklinde ki olgunlaşmamış HDL küre biçimini almaya başlar ve en küçük formu HDL₃ oluşur (29,33). Gittikçe HDL₃'ün hacmi artar ve HDL_{2a} oluşur. HDL_{2a} kolesterol esterlerini apo D ve CETP aracılığıyla VLDL'deki TAG'lerle değiştirerek HDL_{2b}'ye dönüşür. HDL_{2b}'nin içerdiği lipidler karaciğer hücrelerinin yüzeyinde bulunan HL enziminin etkisi ile parçalanır ve yeniden HDL₃ oluşur. Böylece HDL döngüsü tamamlanır (29). HL aktivitesi, androjenler tarafından arttırılırken östrojenler tarafından azaltılır. Bu durum kadınlardaki plazma HDL₂ seviyesinin erkeklere göre daha yüksek olmasını açıklayabilir. HDL, reseptör aracılı endositoz ile hepatosit tarafından alınır. Kolesterol esterlerinin hidrolizi ile açığa çıkan serbest kolesterol lipoproteinlerin sentezinde kullanılır, safra asitlerinin yapısına katılır veya safraya sekrete edilerek vücuttan uzaklaştırılır (29-31).

Son yıllarda, HDL metabolizmasında rol oynayan iki anahtar protein tesbit edilmiştir. Bu proteinler çöpçü reseptör sınıf B tip I [Scavenger Receptor class B, type I(SR-BI)] (132,133) ve ATP-binding cassette transporter class A1 (ABCA1) (134-136) olarak adlandırılmıştır.

Yapılan çalışmalarda ABCA1'in etkili kolesterol transferi (efflux) ve HDL'nin olgunlaşması için anahtar bir faktör olduğu tesbit edilmiştir. Daha önceleri ateroskleroz gelişimini önlemek için plazma TK ve LDL-K düzeyinin kontrolüne

yönelik olan tedbirler bu iki proteinin keşfi ile HDL düzeyinin yükseltilmesinin daha önemli olduğu fikrini doğurmuştur.

HDL, karaciğer ve steroid üreten (steridojenik) dokular için önemli bir kolesterol kaynağıdır. İlk kez Acton ve arkadaşları (137) tarafından farelerde keşfedilen SR-BI bir CD-36 homoloğu olup daha önceleri, değişikliğe uğramış LDL için bir çöpcü reseptör olarak görülmekteydi. Ancak safra asidi sentezi ve steroid üretimi için kolesterolü kaynak olarak kullanan karaciğer, böbreküstü bezleri, overler ve testislerde çok sayıda SR-BI proteininin tesbiti, bunun fizyolojik olarak bir HDL reseptörü olma ihtimalini desteklemiştir. Daha sonraları farelerde yapılan çalışmalar SR-BI'in kolesterolün HDL'den alınması (uptake) için bir mediyatör olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, buradaki olay LDL-K uptake'inden farklı olup "selektif lipid uptake"i adını alır. SR-BI hücre membranında kaveola adı verilen çukurlarda bulunur. Kaveolalar transmembran sinyalizasyon yollarını ayırma ve bütünleştirme işlevi görürler. Ayrıca hücresel kolesterol homeostazında da önemli bir fonksiyonu vardır (138,139). Hücre membranında bulunan SR-BI, HDL'ye bağlanır, değişikliğe uğramamış partiküller endozomlara alınır. HDL taşıdığı kolesterol esterini hidrolize edilmek üzere endozom içine bırakırken, kendisi ve reseptör, parçalanmadan hücre yüzeyine geri dönerler. Özetle, SR-BI olgun HDL partiküllerinden kolesterolü HDL'yi parçalamadan hücrenin kullanımına sunulmasına aracılık eder. SR-BI'in aracılık ettiği bu işlem "selektif lipid alımı" olarak adlandırılır.

Sellüler kolesterol transferi (efflux), kompleks bir işlem olup düzenlenmesinde birçok mekanizma rol oynayabilir. Ancak bu mekanizmalardan en önemlisi, kolesterolün lipidsiz veya lipidden fakir apolipoproteinlere, özellikle de apoA-I'e aktarılmasıdır. Dolaşımdaki apoA-I partiküllerine lipid transferi HDL olgunlaşma sürecinin ilk basamağıdır. Daha sonra LCAT aracılığıyla serbest kolesterolün esterleştirilmesiyle olgun, küre biçiminde HDL_{2a} ve HDL_{2b} partikülleri oluşur ki onlar da SR-BI aracılığıyla hepatositlere ve steridojenik dokulara kolesterol esterleri (KE) transfer eder.

Periferik hücre membranlarından lipidden fakir apoA-I'e kolesterolün transferinde ABCA1 adlı proteinin rol oynadığı 1999 yılında keşfedilmiştir (140). Makrofajlarda yüksek miktarda eksprese edilen ABCA1'in rolü, nadir bir otozomal resesif hastalık olan ve sellüler kolesterol ve fosfolipidlerin lipidden fakir apoA-I

tarafından alınmasındaki bozuklukla karakterize Tangier hastalarında, ABCA1 gen mutasyonu varlığının keşfinden sonra belirlenmiştir (141). ApoA-I, disk biçimindeki pre β -HDL'yi oluşturmak üzere kolesterol ve fosfolipid alamadığı için böbrek tarafından hızla katabolize edilir. Bu hastaların apoA-I ve HDL düzeyleri çok düşüktür, makrofajdan zengin dokularda, özellikle portakal rengindeki tonsillerde kolesterol esteri birikir (142).

Hücre membranının bir tarafından diğer tarafına uzanan bir transmembran proteini olan ABCA1, etkin kolesterol transferi için gereklidir. Kolesterol depolarından salgılanan veya de novo olarak sentezlenen kolesterol plazma membranında birikir. Başlangıçta, kolesterol düzeyleri yükseldikçe ABCA1'e bağlanan ATP'nin, aşırı kolesterolü, mebranın iç tarafından dış tarafına taşımak için gerekli enerjiyi temin etmek için hidrolize olduğu öne sürülmüştür. Bu kolesterol, dolaşımdaki lipidden fakir apoA-I tarafından alınır. Bununla birlikte, yeni bulgular, 2 basamaklı bir mekanizmanın varlığını düşündürmektedir. Günümüzde gerçek ABCA1 substratları fosfolipid molekülleri şeklinde tanımlanmıştır. Bunlar apoA-I'e bağlanmak ve disk biçiminde fosfolipid-apoA-I kompleksleri oluşturmak üzere membranın bir yanından öbür yanına taşınır. Bu kompleksler, fosfolipidlerden farklı olarak, membranı difüzyonla hızla katedebilen aşırı kolesterolü büyük bir istekle alırlar. Tangier hastalığında defektli ABCA1, lipidden fakir apo A-I'e yeterli kolesterol yüklemeye başarısız kalınca apoA-I, HDL olgunlaşma döngüsüne gireceği yerde yukarıda da belirtildiği gibi böbrek tarafından hızla temizlenir (143).

ABCA1 geninin transkripsiyonu ve ABCA1 proteininin hücre yüzeyindeki ekspresyonu sıkı şekilde kontrol edilmektedir (144). Bu kontrole nükleer hormon reseptörü (Liver X receptor - LXR) aracılık etmektedir (145). ABCA1 proteinin HDL'nin olgunlaşmasında olduğu kadar, makrofajlardan kolesterol transferinde de önemli bir rol oynar. Bundan dolayı bu proteinin kardiyovasküler hastalık için yeni bir terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir. Bu düşünce, farelerde yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır. Farelerde, ABCA1'in karaciğer ve makrofajlarda aşırı ekspresyonunun HDL seviyesini yükselttiği tesbit edilmiştir (146,147). Dahası, makrofajlardaki ABCA1'in selektif inaktivasyonu, plazma lipidleri ve HDL düzeylerinden bağımsız olarak belirgin ateroskleroza yol açtığı bulunmuştur (148,149). Bütün bu çalışmalar ABCA1 proteinin ateroskleroza karşı koruyucu bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Ters kolesterol transportuyla (150,151), kolesterol homeostazının düzenlenmesinde önemli rol oynayan HDL, antioksidan ve anti-inflamatuar özellik sergileyen bir lipoproteindir. HDL aynı zamanda antiaterojenik (152-155) ve kardioprotektiftir (155). Yüksek plazma HDL konsantrasyonları ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların insidansı ile ters korelasyon göstermektedir (155,156). HDL, LDL'nin oksidasyonunu inhibe etmekte ve köpük hücre oluşumunu engellemektedir (157). Okside LDL'nin zararlı etkilerinden korumanın yanı sıra, HDL trombogenik faktörlerin seviyelerini de azaltmaktadır. HDL'nin koruyucu etkileri HDL ile ilişkili olan çeşitli proteinlere bağlanmaktadır (157,158). Bu proteinlerden bazıları PON1, CETP, LCAT, PAF-AH'dır (159). HDL'nin aterosklerozdan koruyucu etki göstermesine aracılık eden proteinlerden olan PON ve CETP'den ilgili bölümde ayrıntılı olarak bahsedilmiştir.

Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada (Türk kalp çalışması) elde edilen verilere göre Türk erkeklerinin yaklaşık % 53'ü, kadınlarının ise % 26'sında HDL-K düzeyi normalin altındadır (159). Oysa bu oranlar Avrupa ve ABD'de, sırasıyla, % 15 ve % 5'tir. Yapılan başka çalışmalarda da (TEKHARF) bu verileri doğrulayan sonuçlar elde edilmiştir (160). Türklerdeki bu HDL-K düşüklüğünün genetik kökenli olabileceği üzerinde durulmaktadır. Çünkü Türkiye'nin değişik beslenme alışkanlığı olan tüm coğrafi bölgelerinde hatta Avrupa ve ABD'de yaşayan Türklerde dahi HDL-K düzeyi düşük bulunmuştur. Türklerde ayrıca apoA-I düzeyleri de düşük bulunmuştur (159,160). Yapılan küçük çaplı çalışmalarda elde edilen sonuçlar, Türklerin ABD'lilere göre HDL_{2b}'yi HDL_{3c}e dönüştüren HL enzimine daha yüksek oranda sahip olduğunu göstermiştir. Türklerdeki düşük HDL düzeylerinden, bu enzimin yüksek düzeyde bulunmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir (159).

Günümüzde kolesterolle ilgili planlamalar, plazmadaki LDL düzeylerinin azaltılmasından daha çok, aynı derecede önemli bir risk faktörü olan "düşük HDL düzeyleri'nin düzeltilmesine kaymaktadır. Gerçekten, yeni epidemiyolojik çalışmalar, düşük HDL'nin, aterosklerotik hastalığın bir göstergesi olduğu ve HDL ile ateroskleroz arasında belirgin bir korelasyonun bulunduğunu göstermiştir. Artık birçok farmasötik firma selektif olarak ABCA1 ekspresyonunu veya etkinliğini güçlendiren ilaçlar geliştirme çabasıdadır (161). Bu konuda 2 beklentileri vardır, birincisi; lipidle yüklü makrofajlardan kolesterol transferini hızlandırıp aterosklerotik lezyonları geriletme,

ikincisi; plazma HDL düzeyini arttırıp, onun antiinflamatuvar ve antioksidan özellikleri aracılığıyla ek bir ateroproteksiyon sağlamaktır. Yani, basit olarak, yalnızca aterosklerozun gelişmesinin yavaşlatılması değil, aynı zamanda, lezyonları geriletterek, önceden var olan hastalığın tedavi edilmesi amaçlanmaktadır.

2.1.2.6.Diğer Lipoprotein Fraksiyonları

2.1.2.6.1.Lipoprotein (a)

Lp(a), ilk olarak 1963’de Berg tarafından insan plazmasında β -lipoproteinin genetik bir varyantı olarak tanımlanmıştır (162). Karaciğerde sentez ve sekrete edilir. Lp(a) , % 27 protein, % 65 lipid ve % 8 karbonhidrat içeren yapısıyla LDL’ye benzer. Ancak plazmada LDL’den daha düşük konsantrasyonda bulunur. Oldukça farklı bir protein bileşeni olan apo (a) taşır (163). Apo (a), apoB’ ye disülfür bağıyla bağlanmıştır. Lp(a)’nın dansitesi, yapısındaki apo(a) ile ilgili olup 1.040-1.090 g/mL ‘dir (163). Apo (a)’nın moleküler kütlesi 187-662 kDa’ dur (30). Apo (a), yüksek düzeyde plazminojen ile benzerlik gösterir ve bu nedenle trombogenezde rol oynar. Lp (a), aynı zamanda düz kas hücre proliferasyonunu uyarması, köpük hücre oluşumunu arttırması, subendoteliyal yüzeyde monosit kemotaktik aktiviteyi indüklemesi ile aterojenezde rol oynar (31). Yapılan araştırmalar bir kişinin normal LDL kolesterole sahipken Lp(a) düzeyinin yüksek olabileceği ve koroner kalp hastalığı için artmış bir risk taşıyabileceğini göstermiştir. Menopoz sonrası kadınlarda, düzeyinin yüksek olabileceği bildirilmiştir. Lp(a) düzeyleri besinsel olarak etkilenmez ve hipolipidemik ilaçların birçoğuna cevapsızdır. Östrojen hormon replasman tedavisi, tiroksin, büyüme hormonu, nikotinik asid, ACE inhibitörleri, neomisin sülfat, balık yağı, egzersiz, Lp(a) düzeyini düşürmede etkili olabilmektedir.

2.1.2.6.2.Lipoprotein (x)

Anormal bir lipoprotein olup genellikle %90 lipid, %10 protein içerir. Lipid içeriğinin büyük kısmını fosfolipidler ve serbest kolesterol oluştururken az miktarda kolesterol esteri bulunmaktadır. Protein olarak apoB, apoC ve albumin taşır. Karakteristik olarak, safra kanalı obstrüksiyonu olan hastaların plazmasında görülür.

Sağlıklı kişilerde saptanamayan lipoprotein (x), kolestazda ve ailesel LCAT eksikliği olan hastalarda bulunur (31).

2.1.3. Lipoprotein Metabolizma Bozuklukları

Lipoprotein metabolizma bozuklukları hipolipoproteinemi ve hiperlipoproteinemi olmak üzere ikiye ayrılır

2.1.3.1.Hipolipoproteinemiler

Plazma lipid seviyesinin azalmasıyla karakterize abetalipoproteinemi, ailevi hipobetalipoproteinemi ve hipoalfalipoproteinemi olmak üzere üç grup hipolipoproteinemi tablosu tanımlanmıştır.

2.1.3.1.1.Abetalipoproteinemi

Otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Homozigot hastalarda plazmada şilomikron, VLDL ve LDL bulunmaz. Hastalarda total kolesterol 50 mg/dL kadardır ve bunun tamamı HDL kolesteroldür. Bu hastalarda apo B içeren lipoproteinlerin sentez ve sekresyonunda bozukluk vardır. Plazma TAG'ü düşüktür. Şilomikron ve VLDL oluşturulamadığı için TAG karaciğer ve bağırsakta birikebilir.

2.1.3.1.2.Ailesel hipobetalipoproteinemi

Otozomal dominant geçişli bir hastalıktır. LDL normalin %10-60'ı kadardır. Total kolesterol düzeyleri azalır. Hastalarda VLDL ve HDL düzeyleri azalmış, normal veya artmış olarak izlenebilir.

2.1.3.1.3.Hipoalfalipoproteinemi

Bu hastaların tümünde HDL düşük veya hiç yoktur. Şilomikron veya VLDL oluşumu normaldir. Apo C-II eksikliği sonucu LPL aktive olamaz ve TAG plazma düzeyi artar. Elektroforezde geniş β bandı izlenir. Hastalarda ateroskleroza eğilim artmıştır. Apo A-I eksikliği (A-I milano), balık gözü hastalığı, tangier hastalığı hipoalfalipoproteinemi ile seyreden hastalıklardır. (29)

2.1.3.2.Hiperlipoproteinemiler

Hiperlipoproteinemiler, primer ve sekonder hiperlipoproteinemi olmak üzere ikiye ayrılırlar. Primer hiperlipoproteinemiler kalıtsaldır. Primer hiperlipoproteinemi teşhisi konulabilmesi için öncelikle sekonder nedenlerin varlığı araştırılmalıdır. Lipoprotein metabolizma bozuklukları (hiperlipoproteinemiler) ilk kez Fredrickson ve arkadaşları tarafından major plazma lipoproteinleri esas alınarak sınıflandırılmıştır (tablo 2.3).

Tablo 2.3: Lipoprotein Metabolizma Bozuklukları(Primer hiperlipoproteinemiler) Fredrickson (WHO) Sınıflandırması(ILIB)

Tip	Etkilenen tip	Lipid değişikliği	Birincil neden	İkincil neden
Tip I	Şilomikron	Çok Yüksek TAG Yüksek Kolesterol	LPL ve ApoC-II eksikliği	Diabet, lupus, disglobulinemi
Tip IIa	LDL	Yüksek Kolesterol	Ailesel hiperkolesterolemi	Hipotiroidi, Nefrotik sendrom, obezite
Tip IIb	LDL - VLDL	Yüksek Kolesterol	Ailesel kombine hiperlipidemi	Tip IIa ile aynı
Tip III	VLDL, IDL ve Şilomikron kalıntısı	Yüksek Kolesterol, Yüksek TAG	Ailesel disbetalipoproteinemi	Hipotiroidi, diabet, lupus, disglobulinemi, obezite
Tip IV	VLDL	Yüksek TAG	Ailesel kombine hiperlipidemi Ailesel hipertrigliseridemi	Alkol, diabet, porfiri, renal yetmezlik, Cushing sendromu, beta blokerler, diüretikler, oral kontraseptifler
Tip V	Şilomikron - VLDL	Çok Yüksek TAG, Yüksek Kolesterol	Ailesel hipertrigliseridemi ApoC-II eksikliği	Tip IV ile aynı

2.1.3.2.1. Tip I Hiperlipoproteinemi

LPL veya apoC-II eksikliğine bağlı olarak LPL'in fonksiyon görememesi sonucu hipertrigliserideminin görüldüğü tablodur. Şilomikron ve VLDL klirensinin yavaş, HDL ve LDL kolesterol düzeyinin düşük olduğu, koroner hastalık riskinde artışın olmadığı hiperlipoproteinemi tipidir. Lipid miktarı düşük, karbonhidrat düzeyi yüksek diyetle tedavi edilebilir. Normalde endotel yüzeyinden LPL salınımına neden olan heparin enjeksiyonu sonrası plazma LPL seviyelerinin artmadığı gösterilerek tanı doğrulanır. Düşük LPL seviyeleri apoC-II eksikliğinden kaynaklanıyorsa jel elektroforeziyle apoC-II'nin yokluğu tespit edilebilir. Fazla miktarda apoC-II içeren plazma transfüzyonundan sonra plazmada TAG'lerin dramatik düşüşü ile tanı doğrulanır. LPL seviyeleri, orta derecede hipertrigliseridemili (250–500 mg/dl) birçok hastada normal seviyelerdedir. Şiddetli hipertrigliseridemi (trigliserid >750 mg/dL) olan hastaların %5-10'unda LPL geninde heterozigot mutasyon vardır. Bu hastalarda LPL aktivitesi % 20–50' ye kadar düşebilir.

2.1.3.2.2. Tip II Hiperlipoproteinemi

LDL klirens hızında azalmadan dolayı serum LDL kolesterol düzeylerinde artış ve hiperkolesterolemi gözlenir. Ateroskleroz ve koroner hastalık riskinin bulunduğu tip II hiperlipoproteineminin iki şekli bulunur: *Tip IIa* ve *Tip IIb*.

Tip IIa'da LDL reseptörleri veya apoB–100 ligand bölgesinde mutasyon vardır. Heterozigotlarda, total kolesterol 275–500 mg/dL, LDL kolesterol >250 mg/dL düzeyindedir. Erken yaşta (kadınlarda 55, erkeklerde 45 yaş öncesi) koroner kalp hastalığı görülür. Homozigotlarda, total kolesterol >500 mg/dL, LDL kolesterol >450 mg/dL düzeyindedir. Hiperlipidemi doğumla başlar ve 20'li yaşlarda koroner kalp hastalığı görülür.

Tip IIb'de ise ek olarak VLDL düzeyinde de artma görülür. Total kolesterol 250–500 mg/dL, TAG 250–750 mg/dL düzeyindedir.

2.1.3.2.3. Tip III Hiperlipoproteinemi

ApoE'nin üç izoformundan (E₂, E₃, E₄) biri olan apoE₂'nin reseptöre bağlanma kusuruyla ortaya çıkan ve nadir görülen (1/10000) bir hastalıktır. Şilomikron ve dansitesi 1.019'dan düşük olan VLDL artıklarında artış ile birlikte elektroforezde geniş

β -bandı görülür. TAG 250–500 mg/dL, total kolesterol 250–500 mg/dL düzeyindedir. Hiperkolesterolemi, ksantoma, periferik ve koroner arterlerde ateroskleroza neden olur. Aterosklerotik apoE eksikliği oluşturulan fareler üzerinde yapılan çalışmada, serum PON1 aktivitesi ve serum lipidlerinin oksidatif düzeyi arasında negatif korelasyon saptanmıştır. ApoE eksik olan farelerde hızlı ateroskleroz oluşumu ve oksidatif stres artışı belirgin olarak gözlenmiştir (35).

2.1.3.2.4. Tip IV Hiperlipoproteinemi

Otozomal dominant geçişli olduğu düşünülmektedir. Hem VLDL'nin aşırı üretimi hem de katabolizmasının azalmasına bağlı açlık plazma TAG seviyeleri 250–750 mg/dL dir. Kolesterol düzeyi VLDL miktarına paralel olarak artar. Genellikle HDL ve LDL düzeyi normalden azdır. Ailesel hipertrigliseridemiye KKH, tip II diyabet, şişmanlık, alkolizm eşlik edebilir. Elektroforezde geniş prebeta bandı izlenir.

2.1.3.2.5. Tip V Hiperlipoproteinemi

Şilomikron ve VLDL düzeyi artmış, HDL ve LDL kolesterolü ise azalmıştır. LPL veya apoC-II'nin eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmekte ancak nedeni tam olarak bilinmemektedir.

2.2. Paraoksonaz (PON) Enzimi

2.2.1 Enzimin Keşfi

PON ilk kez toksikoloji alanında yapılan hayvan çalışmalarında, 1953'te Alridge (164) tarafından, toksik olan organofosfatları hidroliz eden bir esteraz (165) olarak tesbit edilerek A-esteraz olarak isimlendirilmiştir (164,166,167). Bu enzim, insan serumunda ilk kez 1961'de saptanmıştır. Aynı enzim 1973'te insan serumunda genetik olarak tespit edilmiştir. Koyun ve sığır üzerinde 1985'te yapılan çalışmalarla lipoprotein yapısında arilestaraz aktivitesine rastlanmış olup enzimin HDL'nin apoA-1 fraksiyonuyla sıkı ilişkili olabileceği belirtilmiştir (166,167). Bir insektisit olan parathionun metaboliti olan “paraokson”u hidroliz etme özelliği, ilk olarak karakterize edildiğinden, bu enzime 1985'te “paraoksonaz” ismi verilmiştir (167). Paraoksone ilave olarak, PON1'in çok sayıda insektisiti hidrolize ettiği ve keza çeşitli sinir gazlarını detoksifiye ettiği gösterilmiştir. Daha sonraları PON1'in HDL ile ilişkili olduğu ve LDL

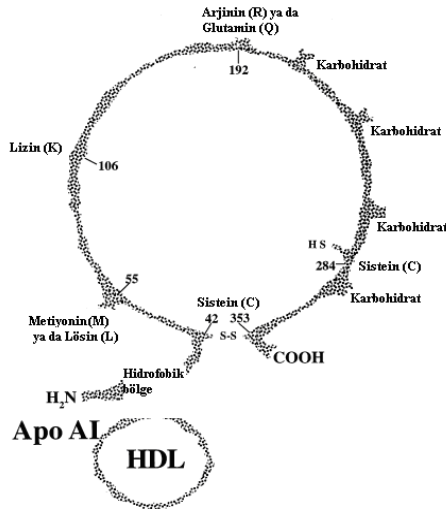
oksidasyonunu geciktirdiği tesbit edilmiştir. 1993-1994’de, İmmünoaffinite kromatografisiyle, PON1’in HDL’nin apoA-1 ve klusterin (apo J) komponentleriyle ilişkili olduğu saptanmıştır (167).

2.2.2. PON1 Enzimi

PON gen ailesi, PON1, PON2 ve PON3 olarak ifade edilen üç üyeden oluşmaktadır. İnsanda 7. kromozomun uzun kolunda birbirine komşu q21.3-22.1 bölgesinde lokalizedir. PON geni, farelerde 6. Kromozom üzerinde bulunmaktadır (168-171). İnsanlarda bu üç PON geni, nükleotid düzeyinde yaklaşık % 70, amino asit düzeyinde ise yaklaşık % 65 benzerlik göstermektedir. PON1 de 106. kodon da lizin bulunurken, PON2 ve PON3’de lizin bulunmamaktadır. Bu nedenle, PON2 ve PON3’ün paraoksonu hidrolize edemedikleri ileri sürülmüştür. Aynı şekilde, insan serum arilesteraz (ARE) enzimi (EC.3.1.8.1) ‘de aromatik esteraz olarak ifade edilmektedir. PON1 ve ARE enzimleri iki ayrı enzimmiş gibi ifade edilse de, aslında bunlar aynı enzim proteininin substrat duyarlılığındaki farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Bir başka ifade ile aynı gen ürünü olan enzim, hem paraoksonaz hem de arilesteraz aktivitesine sahiptir. Yani, substrat olarak paraokson kullanıldığında, paraoksonaz aktivitesi; fenilasetat substrat olarak kullanıldığında ise arilesteraz aktivitesi ölçülmektedir (172,173).

2.2.3. PON1’in Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

PON1, 43-45 kDa molekül ağırlıklı olup 354 amino asitten oluşur. Ağırlıkça %15.8’ini oluşturacak şekilde molekülün dört farklı kısmında karbonhidrat birimleri içeren bir glikoproteindir. PON1’in izoelektrik noktasının 5.1 olduğu bildirilmektedir. Enzim 42. 284. ve 353. konumlarında olmak üzere üç sistein kalıntısı bulundurur. 42. ve 353. sistein kalıntıları disülfür köprüsüyle birbirine bağlı olup proteinin halka yapıda olmasını sağlamaktadır (şekil 2.8). 284. sistein kalıntısının –SH grubu serbest haldedir (174-176).



Şekil 2.1.: PON1 Enziminin Kimyasal Yapısı(174)

PON'un LDL'yi oksidasyondan koruyucu etkisi için sistein 284'ün serbest SH grubunun gerekli olduğu tesbit edilmiştir. PON1 aktivitesi sülfhidril bileşikleriyle inhibe olur. Sisteinle bu inhibisyon tersine çevrilir. Bu yüzden önceleri sistein kalıntısının aktif bölgenin bir komponenti olabileceği düşünülmüştür. Ancak sonraları serbest sistein içeren Cys-284'ün paraoksonun hidrolizi için esas olmadığı gösterilmiştir. Bu yüzden –SH grubunun, aktif bölgenin bileşeni olmasa da, aktif bölgenin optimal uzaysal düzende olmasını sağlayacak üç boyutlu yapı için gerekli olduğu düşünülmektedir (177,178).

PON1'in, paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri için kalsiyum gerektirmesi, Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} kullanan diğer esteraz tipi enzimlerden ayrılır (179-181). Üç boyutlu yapıda β tabakaların merkezinde $7.4 \text{ \AA}$ aralıklı iki adet kalsiyum iyonu bulunmaktadır (182). Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyumdur. Bunun yapıdan uzaklaştırılması, geri dönüşümsüz denatürasyona neden olmaktadır. Diğeri ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur. PON1'in organofosfat substratlarına karşı hidrolitik aktivitesi, iki kalsiyuma da bağımlı iken, lipid peroksitlerin birikimini önlemede sadece yapısal kalsiyumun gerekli olduğu belirlenmiştir (182).

Ca^{+2} iyonları, katalitik mekanizmada iki görev üstlenir: 1) Reaksiyona direkt olarak katılır ve aktif bölgenin uygun konformasyonunu sürdürmesini sağlar. 2) Dietilfosfatın çıkmasını kolaylaştırır. Muhtemelen bu, paraoksonun $P=O$ bağının polarize olmasıyla fosforun nükleofilik saldırıya yatkın hale gelmesi şeklinde olur. Kısaca ifade edilecek olursa kalsiyum hem aktivite hem de stabilite için gereklidir.

Paraoksonaz ve arilesterazın kalsiyum gerekliliğinden dolayı enzim aktivitesi tayin edilirken EDTA'lı plazma kullanımı tercih edilmemektedir (183).

İnsanlarda PON1 mRNA ekspresyonu, karaciğerle sınırlıdır. PON3 mRNA'sı, primer olarak karaciğer ve böbrekte eksprese edilmektedir (184). İnsan PON2 enzimi; kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, plasenta, ince barsak, dalak, mide ve testis gibi çeşitli dokularda sentezlenebilmektedir. Ayrıca, insan PON1 ve PON3'ün aksine; endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofajlar gibi arter duvarı hücrelerinde PON2 ekspresyonu, tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılmış bazı çalışmalarda PON2 ve PON3 gen ailesinin PON1'in homosistein tiolaktoneaz aktivitesine katkıda bulunduğu ve PON2 ve PON3'ün koroner arter hastalığında en az PON1 kadar önemli olduğu bildirilmiştir (185).

Birçok bileşiği hidroliz etse de PON1'in doğal substratı hala belli değildir (186-188). Ancak yapılan son çalışmalar, plaket-aktif edici faktörün (PAF) doğal substrat olabileceğini belirtmektedir. Paraoksondan 750 kat daha fazla katalitik verimliliği olan bu fosfolipidin PON1 için iyi bir substrat olabileceği ifade edilmektedir (189).

PON1, hidrofobik N-terminal bölgesi aracılığıyla HDL lipidlerine kolayca bağlanabilmektedir. ApoA-1 ve apoJ'nin PON1'in HDL'ye bağlanmasında rol oynayabileceği ileri sürülmektedir (190).

PON1'in sekresyon sonrası, oksidatif hasara bağlı ateroskleroz gelişen damar bölgesine geçişi birkaç basamakta olmaktadır.

- 1) Karaciğerde sentez edilen PON1, N-terminali ile HDL fosfolipidlerine bağlanır. ApoA-I ve apoJ PON1'in HDL'ye bağlanmasını kolaylaştırır. HDL hepatositlerden uzaklaştırılması
- 2) PON1, intravasküler alana HDL ile beraber girişi
- 3) Plazmadaki PON1, HDL' nin apoA1 aracılığıyla kolesterol toplanması esnasında N terminali aracılığıyla endotel, interstisyum ve düz kas fosfolipidlerine diffüze olması
- 4) PON1, LDL birikim ve oksidan hasar bölgelerine ulaşması

PON1'in enzimatik aktivitesi bireysel farklılıklar göstermektedir. HDL-kolesterol konsantrasyonunun çok düşük olduğu durumlarda, serum PON1 düzeyi de düşük gözlenir (191). Serum PON1 aktivitesinin, MI, ailesel hiperkolesterolemi, balıkgözü hastalığı, Tangier hastalığı ve diabetes mellitus (DM) gibi ateroskleroz riskinin yüksek

olduğu, lipid metabolizması ile ilgili hastalıklara yakalanan bireylerde düşük olduğu görülmüştür (192).

PON1, beslenme şeklinden etkilenir (193,194). Proaterojenik diyetin PON1 aktivitesini azalttığı, antioksidan vitamin (vitamin E ve C) alımının ise PON1 aktivitesini artırarak LDL'yi oksidasyondan koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca sigara içimi PON1 aktivitesini ve konsantrasyonunu azaltır.

Son yıllarda, sigara kullanımının enzimin serbest tiyol gruplarını modifiye ederek, PON1 aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir(195).

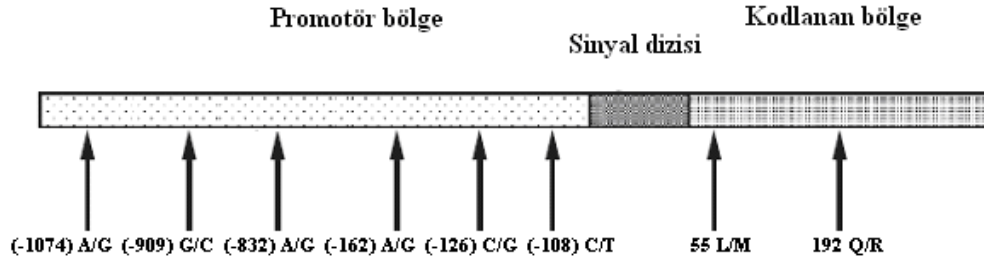
Yapılan çalışmalarda, PON1 enzim aktivitesinin yaş artışıyla azaldığı görülmüştür. PON1 aktivitesi, yeni doğanlarda ve prematüre bebeklerde yetişkin düzeyinin yarısı kadardır. Doğumdan yaklaşık bir yıl sonra yetişkin düzeyine ulaşır. Yaşla birlikte azalır (158).

Akut faz reaksiyonu sırasında PON1 aktivitesinin önemli derecede azaldığı görülmüştür. Tavşan ve insanlarda yapılan çalışmalarda, akut faz reaksiyonunda HDL'nin yapısında amiloid A ve seruloplazmin'de artış olduğu tesbit edilmiştir. Ayrıca apoA-1, PON1, PAF-AH (Platelet Aktive Edici Faktör-Asetil Hidrolaz)'da belirgin azalmanın görülmesi HDL'nin antienflamatuvar bir molekülden proenflamatuvar bir moleküle dönüştüğünü gösterilmiştir (196).

Mackness ve ark. serum PON1 aktivitesi ve konsantrasyonunun myokard infarktüsü belirtilerinin başlamasından sonraki 2 saat içinde azaldığını, PON1 düzeyinin myokard infarktüsü sonrasındaki 42 gün boyunca (akut faz reaksiyonunun düzelmiş olmasına rağmen) değişmediğini göstermiştir. Ayrıca PON1 aktivitesindeki bu azalmanın akut olgunun öncesinde de mevcut olabileceğini bildirmişlerdir (197).

2.2.4. PON1 Gen Polimorfizmleri

PON1 geni, hem promotor hem de kodlayıcı gen bölgelerinde bazı polimorfizmlere sahiptir. PON1 geni ile ilgili polimorfizmlerin, enzim aktivitesindeki kişisel farklılıktan, serum enzim konsantrasyonlarından ve bazı hastalıklara karşı olan yatkınlıktan kısmen sorumlu olabileceği söylenmektedir (186,198-201). Promotor bölgedeki polimorfizmlerin, PON proteininin gen ekspresyon seviyelerini etkileyerek serumdaki enzim konsantrasyonunu değiştirebileceği tesbit edilmiştir. Kodlayıcı gen bölgesindeki polimorfizmlerin ise serumdaki enzim aktivitesini etkileyebileceği belirtilmektedir. Şekil 2.9'da PON1 geni ve polimorfizmleri gösterilmiştir.



Şekil 2.2. : PON1 Geni ve Polimorfizmleri (13)

Tablo 2.4.: Bazı PON1 Polimorfizmlerinin, PON1'in konsantrasyon ve aktivitesine etkisi

	(-909)G/C	(-832)A/G	(-162) A/G	(-108) C/T	55 L/M	192Q/R
Konsantrasyon	-	-	-	+++	+	-
Aktivite	-	-	-	-	-	+++

PON1, kodlayıcı gen bölgesinde iki önemli polimorfizme sahiptir. Bunlardan biri kodon 55'de (M/L55) metionin ile lösin (M/L) aminoasitlerinin yer değiştirmesine, diğeri ise 192. pozisyondaki arginin ile glutamin aminoasitlerinin yer değiştirmesine (Q/R192) neden olmaktadır. Her iki polimorfizm de çok sayıda patofizyolojik durum ile ilişkilendirilmiştir (202-205).

PON1 M/L55 polimorfizmi, inme, koroner arter hastalığı, Parkinson, plazma total ve LDL kolesterol düzeylerindeki değişiklikler ile ilişkilendirilmiştir (206-211) . PON1 192 R/Q polimorfizminin, paraokson, diazokson, soman ve sarin gibi çeşitli substratları hidroliz etme hızını etkilediği rapor edilmiştir (212-214). İlave olarak 192 R/Q polimorfizminin, koroner arter hastalığı, inme, ailesel hiperkolesterolemi, tip 2 diyabet ve Parkinson hastalığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (215-219). Yaklaşık 11 000 vaka ve 13 000 kontrolle yapılan bir genetik meta analiz çalışmasında; PON1 M ile koroner kalp hastalığı arasında bir ilişki bulunamazken, PON1 192 R ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (220). PON1 55 M/L polimorfizminde; 55. pozisyondaki lösin aminoasiti (L genotipi) yerine metiyoninin (M genotipi) gelmesi, enzimin katalitik aktivitesini etkilemediği tesbit edilmiştir. Ancak PON1 M 55 genotipinin, düşük serum PON1 protein düzeyi ile ilişkili olduğu ifade edilmektedir (221-223). Sonuç olarak, daha yüksek serum PON1 protein düzeyi, toksik organofosfatlara veya hastalıklara karşı daha iyi koruma sağlayacaktır. Bu yüzden serum PON1 düzeyi ve aktivitesinin bilinmesi

önemlidir. Bunlara ilave olarak, 192. pozisyondaki arjinin yerine glutaminin gelmesi, PON1 aktivitesini en az 8 kat azalttığı ifade edilmektedir (224).

PON1 polimorfizmi, enzimin substrat duyarlılığını da etkilemektedir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; 192. pozisyonda oluşan amino asit değişimi (Arg/Gln), Q (Gln) ve R (Arg) şeklinde iki izoenzim tipinin oluşmasına yol açmaktadır. Bu polimorfizm, enzimin organofosfat substratlara karşı hidrolitik aktivitesini değiştirmektedir (225). İnsan serumunda *in vitro* şartlarda, R izoformu (PON1 192 R), paraokson substratı, Q izoformundan (PON1 192 Q) daha hızlı hidroliz ederken, PON1 192 Q fenotipi diazokson, somon ve sarin'i daha hızlı hidroliz etmektedir (213). Bununla birlikte, R ve Q izoformları, “nonpolimorfik” substrat olarak ifade edilen arilesteraz aktivitesi ölçümünde substrat olarak kullanılan fenilasetatı yaklaşık aynı hızda hidroliz etmektedir (226).

2.2.5. PON1'in Çeşitli Hastalıkların Patogenezindeki Rolü

PON1 genotipinden bağımsız olarak, düşük serum PON1 aktivite düzeyleri, hiperlipidemi, tip 1 diyabet, koroner arter hastalığı, kronik renal yetmezlik, metabolik sendrom, romatoid artrit, tiroid disfonksiyonu ve üremi ile ilişkili bulunmuştur (227-230) . Yapılan çok sayıda araştırma, PON1 fenotipinin (enzim aktivitesinin) PON1 genotipinden daha önemli olabileceğini ifade etmektedir (231,232). 1353 erkek katılımcı üzerinde yapılan bir prospektif çalışma; paraokson kullanılarak ölçülen PON1 aktivitesinin, diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak kardiyovasküler hastalık için prediktif bir risk faktörü olarak kullanılabileceğini göstermektedir (233). Ayrıca başka bir çalışmada PON1 gen polimorfizmi, Parkinson hastalığı için risk faktörü olarak ilişkilendirilmiştir. Asya ve Kafkas ırkında, PON1 55 M alleli, L alleleline nispeten Parkinson hastalığı gelişimi açısından bir risk oluşturduğu rapor edilmiştir (234).

Antikardiolipin antikorları pozitif bulunan bir grup hastada modifiye LDL'ye karşı otoantikorların arttığı, PON1 aktivitesinin belirgin olarak düştüğü ve arteriyel tromboz geliştirme riski yüksek olan R genotipinin de artma eğiliminde olduğu izlenmiştir (235). Sistemik amiloidozda düşük PON aktivitesi bildirilmiştir. Ateroskleroz riski bulunan üremik renal transplantlı olgularda düşük PON/HDL, PON/apoAI oranları izlenerek bu olgularda HDL'nin antioksidan kapasitesinin azaldığı tesbit edilmiştir.(236).

2.3. Kolesterol- Ester Transfer Proteini (CETP)

Kolesterol-ester transfer proteini (CETP), dolaşımda HDL'den kolesterol esterlerinin (KE) VLDL ve LDL'ye; VLDL yapısındaki TAG'lerin ise HDL ve LDL'ye transferini katalizleyen bir plazma proteindir. Hidrofobik olduğundan dolaşımda çoğunlukla HDL'ye bağlıdır (237). İnsan CETP geni 16. kromozomun uzun kolunda (16q21) bulunur ve 25 kilobazlık 16 ekson içerir. CETP esas olarak karaciğer, dalak ve yağ dokusunda eksprese olur. Ayrıca daha az oranda kalp, böbrek, iskelet kası ve adrenal bezde eksprese olmaktadır (238).

Yapılan çalışmalarda, dislipidemilerin birçoğunun CETP konsantrasyonundaki artış ile birlikte olduğu tesbit edilmiştir. CETP ile kolesterol esterlerinin HDL'den VLDL ve LDL'ye transfer edilmesiyle periferik dokulardaki kolesterol karaciğere taşınmış olur. Bu açıdan bakıldığında CETP'nin antiaterogenik aktiviteye sahip olduğu söylenebilir. Ancak kolesterol esterlerinin HDL'den VLDL ve LDL'ye transferi ile antiaterogenik HDL konsantrasyonu azalırken LDL konsantrasyonu artmaktadır (237).

CETP aracılı KE ve TAG'lerin yerdeğişimi, aynı zamanda lipoproteinlerin büyüklük, yapı ve ateroskleroz oluşturma potansiyellerinde değişikliğe yol açar. VLDL yapısındaki TAG'lerin KE ile yer değiştirmesi sonucu TAG'den zengin HDL ve LDL partikülleri oluşur. Söz konusu partiküller artık TAG lipaz için bir substrattır ve TAG'lerin hidrolize edilmesi sonucu küçük yoğun HDL ve LDL oluşur (239). Sonuç olarak, oluşan küçük yoğun LDL büyük LDL'ye göre daha aterojeniktir. Çünkü küçük-yoğun LDL(sdLDL) arter duvarı proteoglikanlarına büyük affinite gösterirler. Ayrıca bu sdLDL'ler makrofaj uptake'inden önce oksidatif modifikasyona uğrarlar (237).

Küçük yoğun HDL'de ise önce apo A-I yapıdan ayrılır. Ayrılan apo A-I, ya ABCA1 aracılığıyla hücrel kolesterol alıcısı olarak fonksiyon görür ya da böbrekler tarafından dolaşımdan uzaklaştırılır (240).

CETP aracılı HDL ve diğer lipoproteinler arasındaki lipid transferinin artması sonucu HDL'nin konsantrasyonu ile birlikte büyüklüğünde azalır. Sonuç olarak CETP aktivitesinin artışı ile birlikte HDL-K konsantrasyonu, HDL ve LDL'nin boyutunun azalması ve de LDL-K konsantrasyonunun arttığı tesbit edilmiştir. Bu sebeple CETP aktivitesindeki artışın ateroskleroza olan eğilimi arttırabileceği ifade edilmektedir (237). Bu sebeple son çalışmalarda CETP aktivitesi inhibisyonunun KAH için yeni bir tedavi

şekli olabileceği ifade edilmiştir. Bu amaçla üç molekül üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu moleküller;

CETi-1: Aşı formunda üretilen CETi-1, otoantikör oluşumuna yol açarak bu antikörlerin endojen CETP'nin spesifik bölgelerine bağlanıp aktivitesini inhibe etmektedir (241).

JTT-705: CETP proteinine disülfür bağıyla irreversibl olarak bağlanıp CETP aktivitesini inhibe eder (242,243).

Torcetropib: CETP'nin potent ve selektif inhibitörüdür. HDL ve diğer lipoproteinler arasındaki lipid transferini inhibe eder (244-246).

2.3.1 CETP Gen Polimorfizmleri

CETP geninin yaygın olarak görülen beş ayrı polimorfik yapıya (R451Q, A373P, -629C/A, Taq1B, ve -2505C/A) sahip olduğu tesbit edilmiştir. Bu polimorfizmlerin CETP aktivitesi, CETP konsantrasyonu, HDL-K ve LDL-K düzeyinde değişikliğe neden olduğu bulunmuştur. CETP aktivitesi düşük olan hastalarda HDL-K artarken LDL-K düzeyinin azaldığı görülmüştür (246).

CETP lokusunda en çok çalışılmış polimorfizmlerden birisi olan Taq1B, CETP geninin 1. intronunda 279. nükleotid pozisyonundaki guaninin adenine (G/A) değişimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu polimorfizmin Kafkas ırkında daha fazla görüldüğü rapor edilmiştir. Taq1B polimorfizminin B1 ve B2 olarak isimlendirilen iki alleli bulunmaktadır. Daha nadir olarak görülen B2 alleli, CETP aktivitesi ve konsantrasyonunu azalması ile ilişkilendirilmiştir (247,248). Normolipidemik bireylerde bu allelin, serum HDL-K düzeylerinde artışa sebep olduğu tesbit edilmiştir. Ancak bu artışın sigara kullanımı, alkol tüketimi ve çevresel faktörlerden oldukça fazla etkilendiği bulunmuştur (249).

CETP geninin kodlayıcı bölgesinde R451Q ve A373P polimorfizmlerinin sık olarak görüldüğü tesbit edilmiştir. Bu iki polimorfizmde minör alleller Q ve P'dir. Bu allellerin genel populasyonda görülme sıklığı düşüktür. Batı Avrupa populasyonunda görülme sıklığı %2-7 dir (250,251). Bu minör allelerin baskın olduğu genotipi taşıyan kişilerin düşük HDL-K konsantrasyonu (251) ve yüksek CETP aktivitesine sahip olduğu tesbit edilmiştir (246,252).

Diğer bir CETP gen polimorfizmi ise -629 C/A'dır. Bu polimorfizmin Kafkas ırkında daha sık görüldüğü rapor edilmiştir (253). A allelinin yüksek HDL-K düzeyi, düşük CETP konsantrasyonu ve aktivitesi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (254).

Son yıllarda promotor bölgede -2505 C/A polimorfizmi tanımlanarak rapor edilmiştir. Lu ve ark. 357 yaşlı Japon erkek üzerinde yapmış olduğu çalışmada A allel frekansını %20 olarak bulmuşlardır (255). Yine bu çalışmada AA genotipli kişilerin düşük CETP aktivitesi ve konsantrasyonuna ve de yüksek HDL-K düzeylerine sahip olduğu tesbit edilmiştir (246).

2.4. Myokard İnfarktüsü ve Ateroskleroz

Myokard infarktüsü (MI) terimi, lokal iskemi ile meydana gelen ve sınırlı bir alanda gelişen myokard nekrozunu tanımlamaktadır.

Koroner kalp hastalığı (KKH), myokardın oksijen ihtiyacı ile kan akımı arasındaki dengesizlik sonucu gelişen bir hastalık grubudur. KKH'nın en sık görülen sebebi, koroner arterlerin aterosklerozuna bağlı olarak gelişen koroner kan akımındaki azalmadır.

Koroner kan akımındaki azalmanın oranı ve myokardın cevabına bağlı olarak dört sendromdan biri gelişebilir: Bu sendromlar:

- 1) Anjina pektoris (göğüs ağrısı)'nın çeşitli formları
- 2) Akut myokard infarktüsü
- 3) Ani kardiyak ölüm
- 4) Konjestif kalp yetmezliği.

Bu sendromların, muhtemelen çocukluk döneminde başlayan koroner aterosklerozun ileriki dönem sonuçları olduğu düşünülmektedir.

2.4.1 Ateroskleroz

Damar duvarı histolojik olarak üç tabakadan oluşmaktadır:

Tunika intima (İç tabaka): İçte endotel hücre dizisi, bunun altında bazal lamina ve gevşek bir fibroelastik bağ dokusundan oluşan subendotelial tabakadan oluşur. Subendotelial tabakanın dış kısmında elastik fibrillerin yoğunlaşması ile membrana elastika interna meydana gelir. Bu yapı orta tip arterlerde belirgin bir şekilde görülür, ancak venler ve büyük tip arterlerde ayırt edilemez. Subendotelial tabakada arasına düz kas hücreleri de görülür. Bu tabakada hem bağ dokusu fibrilleri hem de düz kas

hücreleri genel olarak longitudinal düzenlenmiştir. Bu tabakada yaşam boyunca ilerleyici intimal kalınlaşma olur. Bu durum bağ dokusu lifleri, proteoglikanlar ve mezenşimal hücrelerin sürekli birikmesine bağlıdır. Mezenşimal hücrelerin kontraktilite kapasitesini kaybetmiş modifiye düz kas hücreleri olduğu düşünülmektedir.

Tunika media (Orta tabaka): Arter duvarının en geniş tabakasıdır. Esas olarak sirküler düzenlenmiş düz kas hücrelerinden meydana gelir. Kas hücreleri arasında dağılmış farklı miktarlarda elastik ve kollajen fibriller ile proteoglikanlar bulunur.

Tunika adventisya (Dış tabaka): En dış tabakadır. Daha çok uzunlamasına düzenlenmiş kollajen ve elastik fibrillerden oluşur. Özellikle venlerde bu tabakada düz kas hücreleri de bulunur. Media tabakasına yakınında elastik fibrillerin yoğunlaşması ile membrana elastika eksterna oluşur. Adventisya venlerin duvarlarında en belirgin tabakadır. Bu tabaka çevre bağ dokusu ile devam eder. Büyük damarlarda adventisya içinde "vaza vazorum" olarak adlandırılan küçük kan damarları bulunur. Vaza vazorumlar lümeniden diffüzyonla beslenemeyecek kadar kalın olan adventisya ve media tabakalarını besler. Arterlerde bu damarlar daha az sayıdadır ve sadece adventisya tabakasında bulunur. Venlerde ise daha çok sayıdadır ve media tabakasına da ulaşır. İntima ve medianın en iç tarafı damarsızdır ve kandan diffüzyonla beslenir (256-258).

2.4.1.1. Ateroskleroz Histopatolojisi

Damarın intima tabakası, aterosklerotik lezyonların geliştiği bölgedir. Aterosklerotik lezyonlar iki farklı tipte gelişebilir. Klinik hasar oluşturan tipinde, genellikle intimada asimetrik bir kalınlaşma vardır. Bu lümeni daraltarak kan akımını azaltır. İntimada kalınlaşmanın arterial dilatasyon ile birlikte olduğu diğer bir lezyon tipinde ise arter lümen çapında önemli bir değişiklik olmaz ve klinik hasar nadirdir.

Ateroskleroz patogenezinde üç önemli basamak vardır:

1. Yağlı çizgi: Her yaşta görülebilen ve ilk oluşan aterosklerotik lezyondur (30). Makroskobik olarak lümene doğru kabarıktır. Ancak obstrüksiyon oluşturmaz. Sarı renkte görülürler. Başlangıçta T lenfositlerle birlikte lipid yüklü makrofaj (köpük hücre) ve monositlerden oluşmakta, daha sonra yapısına değişik sayıda düz kas hücresi katılmaktadır.

2. Fibroz (stabil) plak: Zaman içinde risk faktörlerinin devam etmesi ile subendotelyal depolanma giderek artar. Makroskopik olarak beyaz renklidir. Lümeneye doğru büyür ve lümeni daraltır. Bu lezyonda en dışta endotel hücreleri, altında düz kas hücreleri, makrofajlar ve T lenfositler bulunur. Bu evrede mediadan intima'ya çekilen düz kas hücreleri bir fibröz başlık oluşturmak üzere dizilirler. Fibröz başlığın temel işlevi lümendeki kan ile lezyonun merkezindeki aterosklerotik lipid çekirdeğini birbirinden ayırmaktır. Arter lümeninin kısmen tıkanmasına ve klinik olarak semptomların gelişmesine yol açar. Ama asıl klinik olaylar, bu aterosklerotik plağın rüptüre olmasıyla ilgilidir (7).

3) Komplike lezyon (zedelenebilir plak): Aterosklerotik plak, dıştan mekanik stres ve ateroskleroza yol açan risk faktörlerinin devam etmesi ile yıpranırken, bir taraftan da içten yıpranır. Devam eden inflamatuvar süreç nedeni ile plak içindeki makrofajlar metalloproteinazlar salarak plağın fibröz çatısını yıpratır. Fibröz yapıda yapım ile yıkım dengededir. Plağın fissüre veya rüptüre olması ile klinik kardiyovasküler olaylar ortaya çıkar. Plağın üstündeki endotel ayrılınca, subendotelyal doku kan ile temasa geçer. Subendotelyal doku, faktör VII ve lipoprotein (a)'dan zengin olup trombojenik özelliktedir. Bu şekilde trombüs gelişir. Oluşan trombüs damar duvarını tam veya kısmi olarak tıkayarak akut kardiyovasküler olaylara neden olur (7).

2.4.1.2. Ateroskleroz Etiyopatogenezi

Ateroskleroz gelişimine neden olan faktörlerin belirlenmesi için pek çok çalışma yapılmaktadır. Bu nedenle patogenezi ile ilgili çeşitli teoriler öne sürülmüştür. En son kabul gören ve geçerlilik kazanan hipotez damar endotelinde meydana gelen inflamasyonun ateroskleroza başlattığı ve ilerlettiği şeklindedir. Ateroskleroz gelişimi ile ilgili ileri sürülen hipotezlerin bazıları şunlardır:

Lipid hipotezi: En eski hipotezlerden biridir. Aterosklerozun, damar duvarında lipid birikimine bağlı olarak geliştiği gösterilmiştir. Ancak bu hipotez, kolesterol düzeyleri normal olan hastalarda gelişen aterosklerotik kalp hastalıklarını izah edememektedir.

Trombojenik hipotez: Bu hipoteze göre, damar içinde oluşan trombüs yavaş yavaş arter duvarı içine girer ve ateroskleroza neden olur. Ancak bu hipotez immatür damarlardaki ateroskleroza izah etmez. Trombüs bir sebep değil bir sonuçtur.

Hasara cevap hipotezi: Bu hipotez Virchow tarafından ileri sürülmüştür. Arteriyel intimada çeşitli sebeplerle meydana gelen hasarın iyileşme sürecinin aterosklerozda görülen dejeneratif değişikliklere sebep olduğu söylenmiştir.

Modifiye hasara cevap hipotezi: 1973'te Russel Ross ve John Glomset hasara cevap hipotezini modifiye etmişlerdir. Endotel yaralanmasına karşı aşırı damar düz kası hücresi proliferasyonu sonucunda, aterom plağın oluşumu gösterilmiştir. Bu hipotez daha sonra revize edilmiştir: Endotel disfonksiyonun aterosklerozun temelinde rol oynadığı tesbit edilmiş ve de endotel hasarına yol açan risk faktörlerinin (DM, hiperlipidemi, okside LDL, hipertansiyon, sigara) disfonksiyon gelişmesinde rol oynadığı söylenmiştir.

İnflamasyon teorisi: Son olarak yapılan çalışmalar Ross'un hipotezinin devamı olarak yapılmıştır. İnflamasyon teorisinde en göze çarpan özellik endotelial disfonksiyondur. Bu sürecin en önemli hücreleri endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve inflamatuvar hücrelerdir.

Endotel disfonksiyonu, endotelin bariyer olma özelliğini, seçici geçirgenliğini ve antitrombosit yapısını bozar. Sonuç olarak gelişen inflamatuvar ve proliferatif olaylar aterosklerotik plağın oluşumunu başlatır.

Bu teoriye göre aterosklerozun gelişim basamakları şöyledir:

- Endotel disfonksiyonu
- LDL-K oksidasyonu
- Köpük hücre oluşumu
- Lipid çekirdeğinin oluşumu
- Fibröz kılıf oluşumu

Hiperkolesterolemi gibi aterojenik uyarılara maruz kalanlarda ilk saptanan değişiklikler subendotelial intimada serum lipidlerinin, endotel yüzeyinde lökosit adezyon moleküllerinin görülmesidir. Plazmada LDL düzeyleri yükseldiği zaman, LDL endotelden geçerek intimaya girer. Bu bölgede mikrosirkülasyon yetersiz olduğu için LDL'nin intimadan temizlenmesi mümkün olmaz. LDL, intimada agregasyon, oksidasyon ve LDL partiküllerinin parçalanmasını içeren bir seri modifikasyona uğrar.

LDL'nin oksidasyonu ile ortaya çıkan modifiye lipidlerden bazıları endotel hücrelerini aktive eden sinyal molekülleri olarak rol oynayabilir. Okside LDL ile aktive olmuş endotel hücreleri, aktive T hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofajlar ateroskleroz patogenezinde rol oynayan çeşitli inflamatuvar molekülleri salgırlar. Bu moleküller adezyon molekülleri (VCAM-1, ICAM-1, 2), sitokinler (IL-1, IL-6, IL-4, TNF), kemokinler (MCP-1, IL-8) ve büyüme faktörleridir (PDGF, FGF) (259).

Endotel hücreleri tarafından salgılanan lökosit adezyon molekülleri (VCAM-1, ICAM-1, 2) monosit ve T hücrelerinin endotele yapışmasını sağlar. Selektinler bir başka grup lökosit adezyon molekülleridir. E-selektin (endotelyal selektin) polimorfonükleer lökositlerin uyarılmasını sağlar. P-selektin (platelet kaynaklı) ateromada lökositlerin uyarılması ve endotel üzerinde yuvarlanma hareketi yapmalarında etkilidirler. Endotel yüzeyine yapışmış lökositlerin migrasyonunu, endotelden geçişini kemokinler sağlar (260). Kemotaktik sitokinlerin uyarıları mononükleer hücrelerin endotel tabakasından subendotelyal intima içerisine göçünü başlatır. Monosit kemokin proteini-1 (MCP-1) endotelden okside LDL ve çeşitli uyarılarla salınır. Salgılanan kemotaktik maddelerle lezyonlu alana göç eden monositler inflamatuvar sitokinler salgırlar. IL-6, monositlerden salgılanan prokoagülan sitokindir. Fibrinojen, plazminojen aktivatör inhibitörü tip 1, CRP düzeylerini artırır. Monositlerden salgılanan diğer sitokinler (IL-1, TNF alfa, CRP), adezyon moleküllerinin salınımını artırıp ve endotele daha çok lökosit ve LDL bağlanmasına neden olurlar ve trombojenisiteyi arttırırlar. CRP aynı zamanda monositleri uyararak koagülasyonda rol oynayan doku faktörü salınmasını artırır.

Endotel kaynaklı nitrik oksit'in (NO) salınımı hasarlı damar bölgesinde azalır. KVVH gelişimiyle NO üretiminin azalması yakından ilişkilidir. NO, trombositlerin damar duvarına tutunmasını, agregasyonunu, lökositlerin endotele tutunmasını, vazokonstriksiyonu ve düz kas hücresi proliferasyonunu baskılar. CRP, NO üretimini baskılar. Böylece NO azalması protrombotik, proinflamatuvar olaya katkıda bulunur.

Endotele tutunduktan sonra subendotelyal alana göçeden monositler burada makrofaja dönüşürler. Bu süreç, aktive olmuş damar hücreleri tarafından üretilen monosit-koloni stimüle edici faktör (M-CSF) tarafından başlatılır. Makrofajlar okside LDL'yi fagosite ederek köpük hücresine dönüşür ve yağlı çizgilenmeyi başlatırlar. Yağlı çizgilenme esas olarak sağlam endotelde köpük hücrelerinin, bir miktar T hücresi ve ekstrasellüler kolesterolle birlikte birikmesidir. (260).

Makrofajlar aterosklerotik lezyonlarda en çok bulunan hücredir. Makrofajlar sadece köpük hücreleri oluşturmayıp aynı zamanda proinflamatuvar araçlar, sitokinler, kemokinler, PDGF ve süperoksit anyonu gibi okside edici ajanları da salgırlar. Bu araçlar inflamasyonu başlatır ve lezyonun progresyonuna katkıda bulunur. Aynı zamanda aktive T ve mast hücreleri de endotele tutunurlar. Bütün hücreler lipid havuzundan oluşan fibröz kılıf ile kaplı ateromatöz lezyonun oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu hücreler metalloproteinazların üretimini sağlar. Bu proteolitik enzimler kollajenin parçalanmasına ve fibröz kılıfın bozulmasına neden olur. Ayrıca doku faktörü ve ateromatöz yıkım ürünlerinin kanla temasını sağlayarak tromboz oluşumunu destekler.

Aterosklerozun ilk basamakları olan endotelyal disfonksiyon ve LDL oksidasyonu görüldüğü gibi çok karmaşık mekanizmalar ile oluşmaktadır. İntimal lezyonun genişlemesi ile bazı lipid yüklü köpük hücreleri ortadan kaybolmaktadır. Köpük hücrelerinin ölümü programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptozis sonucu olmaktadır (261). Mononükleer fagositlerin ölümü sonucunda aterosklerotik plak merkezinde daha komplike nekrotik çekirdek olarak bilinen lezyon oluşur (262). Sonuçta oluşan lipid çekirdeği, intima tabakasının bağ dokusu içinde kolesterol ve hücre yıkım ürünleri ile dolu boşluklardır. Bu aşamada lipid çekirdeğinin üzerinde henüz fibrotik bir tabaka yoktur.

Olgunlaşmış aterom plağında lipid çekirdeğinin üstü fibröz bir başlıkla örtülüdür. Fibröz başlık çoğunlukla düz kas hücreleri ve onların ürettiği bağ dokusundan oluşur (263). Lezyon ilerledikçe düz kas hücrelerinin sayısı da artar. Düz kas hücrelerinin mediadan göçü ve proliferasyonu, PDGF, FGF gibi büyüme faktörlerinin uyarısı ile gerçekleşir. Aynı faktörler, bu hücrelerin bağ dokusu proteinlerini sentezlemesini uyarırlar. Bugün artık fibröz başlığın dinamik bir yapı olduğu bilinmektedir. Bir yandan düz kas hücreleri tarafından kollajen yapımı sürerken, diğer taraftan proteazlar tarafından sürekli bağ dokusu yıkımı olmaktadır. Bu yapım ve yıkım arasında çok sayıda sitokin tarafından kontrol edilen bir denge vardır.

Son olarak lipid çekirdek ve etrafındaki fibröz başlıkla birlikte bu lezyon “fibroaterom” adını almaktadır. Bu lezyon ateroskleroz gelişimindeki son basamak olup klinik olayların ve komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır.

2.5. PON ve Ateroskleroz Arasındaki İlişki

Ateroskleroz patogeneğinde belirtildiği gibi, LDL'nin damar duvarında birikip oksidasyona uğraması ateroskleroz gelişimindeki esas mekanizmadır. Bu yüzden LDL oksidasyonunun engellenmesi ateroskleroz gelişimini önlemektedir. HDL yapısında bulunan bir enzim olan PON, LDL oksidasyonunu engellediği için aterosklerozdan korunmada çok önemli bir rol üstlenmektedir (191).

LDL'nin oksidasyondan korunmasında, PON1'in HDL üzerine katalizör etkisinin olabileceği düşünülmektedir. PON1'in, lipid peroksitlerini hidrolize ederek aterosklerozdan koruyucu etki gösterdiği tesbit edilmiştir (113). PON1, ayrıca LDL'yi bakır iyonunun ve serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan korumaktadır (191). LDL oksidasyonu esnasında oluşan okside kolesterol esterleri ve lizofosfatidilkolinler PON1 enzimidaki serbest sülfidril grubu ile etkileşime girer ve enzimin inaktive olmasına yol açar. Oksidatif sistemlerdeki $\text{Cu}^{+1}/\text{Cu}^{+2}$ iyonlarının oksidasyon esnasında, PON1'in paraoksonaz/arilesteraz aktivitesi için gerekli olan Ca^{+2} iyonunun yerine geçmesinin PON1'in kısmen inaktivasyonundan sorumlu olabileceği de düşünülmektedir. PON1 inhibitörlerinin, LDL oksidasyonunu artırması, hem PON1 inaktivasyonuna hem de HDL lipidlerinin total lipid peroksit oluşumuna katılmasına bağlıdır (115). Kısmen okside olmuş fosfolipidlerin, PON1'in ekspresyonunu azalttığı, enflamatuvar sitokinlerin (IL- 6) apoJ'yi arttırdığı ve IL-6'nın PON1 regülasyonu için kısa dönemde etkili olduğu bulunmuştur. MCP-1'in okside olmuş fosfolipidlerin regülasyonu için gerekli olmadığı belirtilmiştir (116).

PON1'in sadece LDL oksidasyonunu değil, aynı zamanda HDL oksidasyonunu da engellediği gösterilmiştir. PON1'in HDL'ye eklenmesi ile doza bağımlı olarak oksidasyonun lag fazının uzadığı, HDL'de lipid peroksit ve aldehit birikiminin %95'e kadar azaldığı gösterilmiştir (191).

PON1, lipid peroksitlerinin yanı sıra hidrojen peroksit (H_2O_2) üzerine de etkilidir. Aterojenez sırasında arter duvarı hücrelerince üretilen majör toksik oksijen metaboliti olan H_2O_2 , oksidatif koşullarda daha potent ürünlere dönüşerek LDL oksidasyonuna neden olur. PON1'in oxLDL'deki kolesterol linoleat hidroperoksitlerini ve hidroksitleri indirgemesi nedeniyle peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu düşünülmektedir. HDL ile ilişkili diğer enzimlerin de (LCAT, PAF-AH vb.) oksidatif modifikasyonlara karşı LDL'yi koruduğuna inanılır. Yapılan çalışmalar, bu enzimlerin

MM-LDL (minimal modified LDL)'deki aktif lipitleri, tek başına gösterdikleri etkinin toplamı bir etki ile yıktıklarını göstermiştir. PON1'in yokluğunda LCAT ve PAF-AH, LDL'yi oksidasyondan korumada çok etkili değildir. Aviram ve ark. PON1'in tek başına, LDL'yi oksidasyondan korumada, LCAT ve apoA-I'den 90 kat fazla etkisi olmasına rağmen üçünün birlikte yaptığı etkinin azda olsa PON1'den daha fazla olduğunu gözlemlemişlerdir (191).

2.6.CETP ve Ateroskleroz Arasındaki ilişki

CETP, dolaşımda HDL'den kolesterol esterlerinin (KE) VLDL ve LDL'ye; VLDL yapısındaki TAG'lerin ise HDL ve LDL'ye transferini katalizleyen bir plazma proteindir (237).

CETP aracılı KE ve TAG'lerin yerdeğişimi, aynı zamanda lipoproteinlerin büyüklük, yapı ve ateroskleroz oluşturma potansiyellerinde değişikliğe yol açar. VLDL yapısındaki TAG'lerin KE ile yer değiştirmesi sonucu TAG'den zengin HDL ve LDL partikülleri oluşur. Söz konusu partiküller artık TAG lipaz için bir substrattır. TAG'lerin hidrolize edilmesi sonucu küçük yoğun HDL ve LDL oluşur (239). Sonuç olarak oluşan küçük yoğun LDL (sdLDL) aterojeniktir. Çünkü sdLDL arter duvarı proteoglikanlarına büyük affinite gösterirler. Ayrıca bu sdLDL'ler makrofaj uptake'inden önce oksidatif modifikasyona uğrarlar (237).

Küçük yoğun HDL'de ise önce apo A-I yapıdan ayrılır. Ayrılan apo A-I, ya ABCA1 aracılığıyla hücrel kolesterol alıcısı olarak fonksiyon görür ya da böbrekler tarafından dolaşımdan uzaklaştırılır (240).

CETP aracılı HDL ve diğer lipoproteinler arasındaki lipid transferinin artması sonucu HDL'nin konsantrasyonu ile birlikte büyüklüğü de azalır. Sonuç olarak CETP aktivitesinin artışı ile birlikte HDL-K konsantrasyonu, HDL ile LDL'nin boyutunun azalması ve LDL-K konsantrasyonunun arttığı tesbit edilmiştir. Bu sebeple CETP aktivitesindeki artışın ateroskleroza olan eğilimi arttırabileceği ifade edilmektedir (237).

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1. Çalışmanın Tanımlanması ve Etik Kurallara Uygunluğu

Bu çalışma myokard infarktüsü (MI) tanısı konulan 100 hasta üzerinde yapıldı. Bu hastalarda PON1 192 gen polimorfizmi, CETP gen polimorfizmi, paraoksonaz enzim aktivite düzeyi belirlendi. Çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Moleküler Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

Çalışma öncesinde Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun 15.05.2009 tarih ve 163 sayılı kararıyla çalışmanın uygun olduğuna dair onay alındı. Çalışma Helsinki Bildirisi' nin yeniden gözden geçirilmiş ilkelerine uygun olarak yürütüldü. Araştırmamıza dahil edilen bireylere çalışmanın amacı ve yöntemi hakkında bilgi verilerek onayları alındı.(Ek 1, Onay formu)

3.1.2. Hasta Seçimi

Çalışmaya Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Kliniği Yoğun Bakım Ünitesi'nde MI tanısı ile takip edilen ve anjiyografi ile aterosklerotik damar patolojisi tesbit edilen 100 hasta dahil edildi.

3.1.3 Örneklerin Ayrılması ve Saklanması

Hasta ve kontrol bireylerinden biyokimyasal ölçümler ve polimorfizm analizleri için venöz kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri enzim aktivitesi ve diğer biyokimyasal ölçümler için pıhtı aktivatörü içeren jelli tüplere, DNA izolasyonu için ise EDTA içeren tüplere aktarıldı. Jelli tüplere alınan kan örnekleri tamamen pıhtılaştıktan sonra 3500 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek serum kısmı ayrıldı. Paraoksonaz aktivitesi, arilesteraz aktivitesi, MDA ölçümü ve diğer biyokimyasal parametrelerin [total kolesterol (T-Kol), LDL, , HDL ve trigliserid (TG), apo A, apo B] ölçümü için serum örnekleri küçük hacimlere bölünerek analiz edilinceye kadar -80°C'de saklandı.

3.1.4 Kullanılan Kimyasal, Cihaz ve Ekipmanlar

Tablo 3.1’de çalışmada kullanılan kimyasallar ve bu kimyasalların temin edildiği firmalar gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan cihaz ve aletlerle ilgili bilgi ise tablo 3.2’te verilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan kimyasallar ve temin edildiği firmalar

Kimyasal madde	Firma
Tris (hidroksimetil)-aminometan	Merck
Hidroklorik asit,%35	Carlo Erba
Kalsiyum klorür	Merck
Sodyum klorür	Merck
Paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenilfosfat)	Sigma
Aseton	Riedel-de Haen
Fenilasetat	Aldrich
Asetik asit	Sigma-Aldrich
2-Tiyobarbütirik asit (TBA)	Sigma
Sodyum dodesilsülfat (SDS)	Merck
1-Bütanol	Sigma-Aldrich
Piridin	Merck
1,1,3,3-tetraetoksi-propan	Sigma
Etidyum bromür	Sigma
Agaroz	Sigma
10xTBE (tris, borik asit, EDTA) elektroforez tamponu	Fermentas
İnvisorb Spin Blood Mini Kit (250) (DNA izolasyon kiti)	İnvitek
10xTaq Buffer, KCl’li	Fermentas
Magnezyum klorür (MgCl ₂) çözeltisi, 25 mM	Fermentas
dNTP (deoksiribonükleozit trifosfat) karışımı, 25 mM	Fermentas
PON1 192 için F ve R primerler	Operon
CETP Taq1B için F ve R primerler	Operon
Taq DNA Polimeraz, 5 U/μL	Fermentas
Hsp92 RE, 10 U/μL	Promega
Bsh1236I RE, 10 U/μL	Fermentas
10xBuffer R, BSA’lı	Fermentas
10xBuffer K	Promega
Bovın serum albümin (BSA), asetilenmiş, 10 U/μL	Promega
Dimetilsülfoksit (DMSO), min %99,5	Sigma

Tablo 3.2 Kullanılan cihaz ve aletlerin markası ile ilgili firma ve/veya ülke

Cihaz veya alet	Firma ve/veya ülke
Mikroplate okuyucu	Bio-tek PowerWave XS, The USA
Spektrofotometreler	Beckman DU 500, China; Cecil, England
Thermocycler (PCR cihazı)	Biometra T Gradient Thermoblock, Germany
Elektroforez sistemi	1. Tank: Biometra Agagel Midi 2. Translüminatör : Biometra BDA Digital 3. Güç kaynağı : Biometra High Voltage Power Pack P30
Hassas terazi	Denver Instrument, Germany
Saf su cihazı	Mes mp minipure Su Arıtma Sistemleri, Türkiye
Derin dondurucular	1. Sanyo Ultra Low Temperature Freezer MDF-U281, Japan 2. Uğur USS 374 DTKL, Türkiye 3. Arçelik 2031 D, Türkiye
Su banyosu	Kotterman, Germany
Magnetik karıştırıcı	1. Fisher, USA 2. Yellowline MSH basic, Germany
Vorteks	Heidolph Reax Top, Germany
pH metre	Istek 730 P, Korea
Santrifüjler	Hettich Zentrifügen Rotofix 32, Germany; MSE mikro centaur Sanyo, U.K.
Otomatik pipetler	Multikanallı finnpipette Labsystems; Tranferpette brand, Germany; Eppendorf research physioCare concept; Exelpette, elkay; medispec-plus
Otoklav	HMC-Hirayama, Japan.
Mikrodalga fırın	KENWOOD microwave grill mw304, UK
Thermoblock	Biometra TB1, Germany
Thermomixer	Eppendorf Termomixer Comford, Germany
Class II Biyogüvenlik kabini	Nüve LN 120, Türkiye
HPLC	Agilen 1100 modüler sistem, Germany

3.2 Yöntemler

3.2.1 DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplere alınan periferik venöz kan örneklerinden ticari kit (Invisorb Spin Blood Kit, Invitek GmbH, Germany) kullanılarak genomik DNA izolasyonu yapıldı. Bu izolasyon metodu, spin-kolon yöntemine dayanmaktaydı ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulandı:

1. 1.5 ml'lik steril kapaklı ependorf tüpe 200 µL EDTA'lı kan örneği pipetlendi. Üzerine 200 µL lysis buffer (parçalama tamponu) ve 20 µL proteinaz K eklendi. Vorteksle iyice karıştırıldıktan sonra 56°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı (Bu aşamada hücrelerin parçalanması ve lökosit çekirdeğinde bulunan DNA'nın açığa çıkması sağlanır).
2. İnkübasyon sonrası ependorf tüpe 400 µL binding buffer (bağlama tamponu) ilave edildi ve vortekslenerek karışması sağlandı. Karışım steril ependorf tüplere yerleştirilen spin kolona boşaltıldı ve 12000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi (Bu aşamada DNA'nın spin kolon membranına bağlanması sağlanır).
3. Kolon, bir başka steril ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 500 µL wash buffer 1 (yıkama tamponu 1) eklenerek kolon yıkandı. 12000 rpm'de 1 dakika tekrar santrifüj edildi (Bu aşamada kolona bağlanan DNA dışındaki safsızlıkların uzaklaşması sağlanır).
4. Santrifüj sonrası ependorf tüpte oluşan süzüntü döküldükten sonra kolon tekrar aynı eppendorf tüpün eçerisine yerleştirildi. Kolona 800 µL wash buffer 2 (yıkama tamponu 2) ilave edilerek 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Yine altta kalan sıvı kısım atıldı. Bu kez içindeki kolonla birlikte ependorflar 14000 rpm'de 4 dakika boş olarak çevrildi. Bu aşamada da kolona bağlanan DNA dışındaki safsızlıkların ve yıkama tamponu içerisinde bulunan ve PCR inhibitörü olan etanolün tamamen uçması sağlanır.
5. Santrifüjlemeden sonra kolon yeni steril kapaklı ependorf tüpe aktarıldı. Kolona 56°C'de ısıtılan elution buffer'dan 100 µL ilave edilerek DNA'nın kolondan çözünmesi sağlandı.
6. İzole edilen genomik DNA örneklerinin DNA konsantrasyonu ve saflık derecesi spektrofotometrik olarak ölçüldükten sonra analiz edilinceye kadar -80 °C'de saklandı.

3.2.2 DNA Saflık Tayini ve Konsantrasyonunun Hesaplanması

PCR reaksiyonunda kullanılacak DNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesi önemlidir. Periferik kan örneklerinden izole edilen DNA'ların konsantrasyon ve saflıkları, spektrofotometrik yöntemle 260 ve 280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlendi. Bu amaçla Cecil CE3041 model spektrofotometre ve quartz küvet kullanıldı. Mikro quartz küvet içine 195 µL saf su ve 5 µL DNA örneği pipetlenerek 260 ve 280 nm dalga boylarında su körüne karşı absorban değerleri okutuldu. A_{260} / A_{280} oranından DNA saflığı saptandı ve 1.7-1.8 değerleri saf olarak kabul edildi ve PCR analizlerinde kullanıldı. İzole edilen DNA'ların konsantrasyonları aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\text{DNA (ng/ } \mu\text{L)} = A_{260} \times 50 \text{ ng/ } \mu\text{L} \times \text{Seyrelme Faktörü}$$

(Çift iplik DNA'nın 260 nm'de vermiş olduğu 1 absorban 50 ng/ µL dir.)

Ayrıca izole edilen DNA'lar, 0.125 µg/mL etidyum bromür içeren % 0.7'lik agaroz jelde yürütülerek DNA bütünlüğü doğrulandı (1xTBE tamponda, 80 volt, 30 dakika). Bu amaçla 5 µL DNA örneği, 1 µL 6X yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jel kuyucuklarına yüklendi ve elektroforez sonrası oluşan bantlar 300 nm dalga boyunda UV transillüminatörde (Whatman T12, Biometra, Germany) görüntülendi.

3.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, herhangi bir organizmaya ait özel bir DNA bölgesinin *in vitro* şartlarda tüp içerisinde enzimatik olarak çoğaltılması işlemidir. PCR'da, yüksek sıcaklık (92-95 °C) etkisi ile bazlar arasındaki hidrojen bağlarının kopartılmasıyla çift iplikçik DNA'nın birbirinden ayrılması (denatürasyon), belli bir sıcaklıkta (~ 50-60 °C; primerin baz özelliğine göre değişmektedir) yaklaşık 20 baz uzunluğunda sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (annealing, hibridizasyon), DNA Taq polimeraz enziminin etkisi ile çift zincir DNA'nın sentezi (72 °C de, elengasyon, zincir uzaması) ve bu siklusların belli sayıda (yaklaşık 30 döngü) tekrarlanmasına dayanır. PCR sonunda, hedeflenen DNA bölgesi çoğaltılarak analiz edilebilir seviyeye getirilmiş olur (Tablo 3.3).

PON 192 R/Q ve CETP Taq1B polimorfizm analizleri için özgül primer dizileri kullanılarak PCR'ları gerçekleştirildi:

PON 192 R/Q polimorfizmi için kullanılan primer dizileri

F 5-TTGAATGATATTGTTGCTGTGGGACCTGAG-3

R 5-CGACCACGCTAAACCCAAATACATCTCCCAGaA-3

CETP Taq1B polimorfizmi için kullanılan primer dizileri

F 5-CACTAGCCCAGAGAGAGGAGTGCC-3

R 5-CTGAGCCCAGCCGCACACTAAC-3

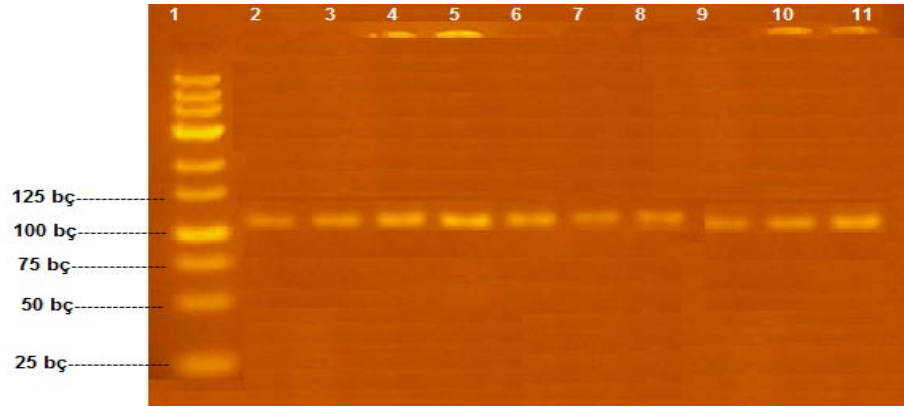
Tablo 3.3. PON 192 R/Q , PCR reaksiyonu karışımı hacimleri ve son konsantrasyon değerleri

	Hacim	Konsantrasyon
Steril dH ₂ O	15 µL	-
10X Taq Buffer	2.5 µL	1 X
25 mM MgCl ₂	1.5 µL	1.5 mM
25 mM dNTP	0.2 µL	0.2 mM
F primer	0.3 µL	0.5 mM
R primer	0.3 µL	0.5 mM
Taq polimeraz	0.2 µL	1 Ü/ µL
DNA	5 µL	100 ng/ µL
Toplam hacim	25 µL	

Tablo 3.4: PON 192 R/Q polimorfizm analizleri için uygulanan PCR programı:

95 °C	5 dakika	1 döngü
94 °C	1 dakika	40 döngü
65 °C	45 saniye	
72 °C	45 saniye	1 döngü

Reaksiyon sonucunda PON 192 R/Q için 111 baz çifti (bç) uzunluğunda PCR ürünü elde edildi. Bu PCR ürünleri % 3,5'luk agaroz jel elektroforezinde görüntüldü. Bu amaçla, 5 µL PCR ürünü, 1 µL 6X yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jel kuyucuklarına yüklendi ve 1xTBE (tris, borik asit, EDTA) tampon içerisinde 80 volt sabit voltajda 30 dakika yürütüldü. Elektroforez sonrası oluşan bantlar UV transillüminatörde görüntülenerek kontrol edildi. Şekil 3.1.'de 111 bç'lik PCR ürünlerinin %3.5'luk agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 3.1.:111 bç'lik PCR ürünlerinin %3.5'luk agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi

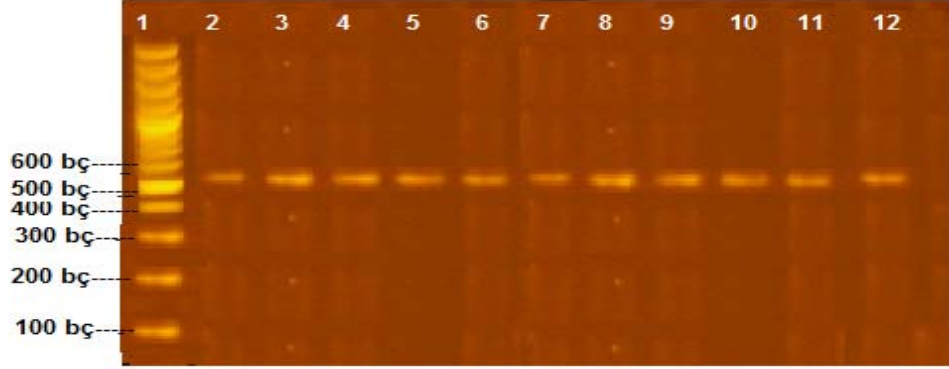
Tablo 3.5.:CETP Taq1B , PCR reaksiyonu karışımı hacimleri ve son konsantrasyon değerleri.

	Hacim	Konsantrasyon
Steril dH ₂ O	15 µL	-
10X Taq Buffer	2.5 µL	1 X
25 mM MgCl ₂	1.5 µL	1.5 mM
25 mM dNTP	0.2 µL	0.2 mM
F primer	0.3 µL	0.5 mM
R primer	0.3 µL	0.5 mM
Taq polimeraz	0.2 µL	1 Ü/ µL
DNA	5 µL	100 ng/ µL
Toplam hacim	25 µL	

Tablo 3.6.:CETP Taq1B polimorfizm analizleri için uygulanan PCR programı

95 °C	3 dakika	1 döngü
95 °C	30 saniye	30 döngü
60 °C	30 saniye	
72 °C	45 saniye	
72 °C	5 dakika	1 döngü

Reaksiyon sonucunda CETP Taq1B polimorfizmi için 535 baz çifti uzunluğunda PCR ürünü elde edildi. Bu PCR ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Bu amaçla, 5 µL PCR ürünü, 1 µL 6X yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra jel kuyucuklarına yüklendi ve 1xTBE (tris, borik asit, EDTA) tampon içerisinde 80 volt sabit voltajda 30 dakika yürütüldü. Elektroforez sonrası oluşan bantlar UV transillüminatörde görüntülenerek kontrol edildi. Şekil 3.2.'de 535 bç'lik PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 3.2.:535 bç'lik PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jel elektroforezinde görüntülenmesi

Daha sonra PON 192 ve CETP PCR ürünleri kullanılarak, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi (RFLP) analiz yöntemi ile genotip tayini yapıldı.

3.2.4. Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi

Restriksiyon endonükleaz (RE) lar, DNA üzerinde spesifik bir baz dizisini her iki DNA zincirini bu diziler içindeki özgül bir bölgeden veya bu dizilere yakın bölgelerden tanıyarak kesen enzimlerdir.

Bu çalışmada PON 192 R/Q polimorfizmi için HinfI restriksiyon enzimi kullanıldı. HinfI, DNA zinciri üzerindeki “ANTC” baz dizisini tanıyıp “A” bazından kesmektedir (5'.... A N T C ↓....3'). Şekil 3.1.'de HinfI restriksiyon enziminin tanıma ve kesme bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 3.3. : HinfI enziminin tanıma ve kesme bölgeleri

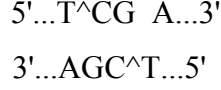
PON 192 R/Q polimorfizmi RFLP analizi için reaksiyon karışımı tablo 3.7.'deki gibi hazırlandı:

Tablo 3.7. : PON 192 RFLP analizi için reaksiyon karışımı.

Steril H ₂ O	3,5 µL
10 X Buffer R	1,1 µL
HinfI	0,4 µL
PCR DNA	5 µL
Toplam hacim	10 µL

PON 192 RFLP analizi için hazırlanan reaksiyon karışımı, kesim için üç saat 37 °C'de inkübasyona bırakıldı.

CETP Taq1B polimorfizmi için ise Taq1 Fast Digest restriksiyon enzimi kullanıldı. Taq1 Fast Digest , DNA zinciri üzerindeki “CGA” baz dizisini tanıyıp “C” bazından kesmektedir (5'.... CGA ↓....3'). Şekil 3.2'de Taq1 Fast Digest enziminin tanıma ve kesme bölgeleri gösterilmiştir.



Şekil 3.4.: Taq1 Fast Digest enziminin tanıma ve kesme bölgeleri

CETP Taq1B polimorfizmi RFLP analizi için reaksiyon karışımı tablo 3.8.'deki gibi hazırlandı:

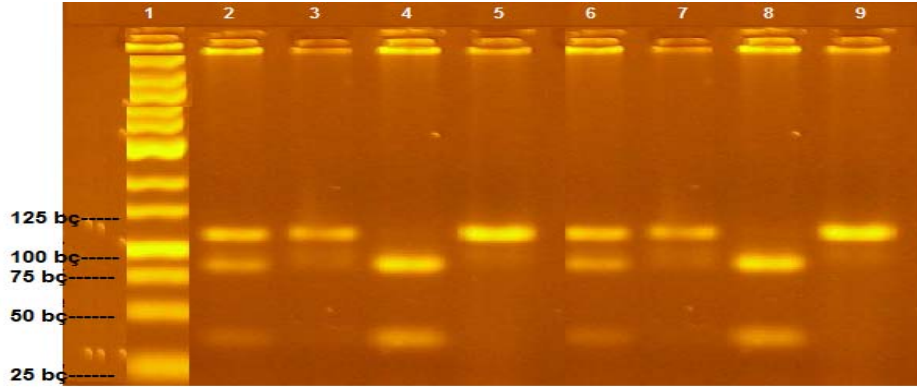
Tablo 3.8. : CETP Taq1B polimorfizmi RFLP analizi için reaksiyon karışımı.

Steril H ₂ O	17 µL
10X Fast Digest Buffer	2 µL
Taq1 Fast Digest	1 µL
PCR DNA	10 µL
Toplam hacim	30 µL

CETP Taq1B polimorfizmi RFLP analizi reaksiyon karışımı kesim için 9 dakika 65 °C'de inkübasyona bırakıldı.

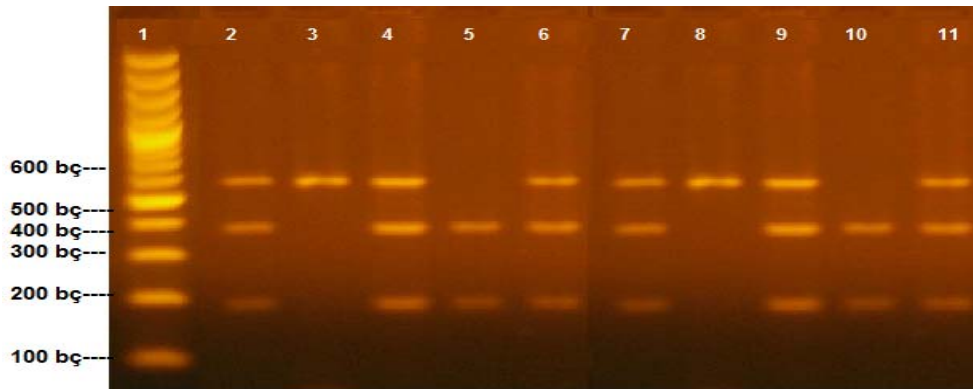
3.2.4.1 Kesim Ürünlerinin Analizi

PON1 192 R/Q RFLP analizi için elde edilen kesim ürünleri % 4'lük Nu-micropor agaroz (Prona, Spain) jelde yürütüldü. Bu amaçla mikrodalga fırında ısıtılarak hazırlanan agaroz jeli 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklendi ve elektroforez tepsisine döküldü. 1 ml 6x yükleme tamponu ile karıştırılan 5 µL PCR kesim ürünü kuyucuklara yüklendi ve ½ x TBE tamponu içerisinde 80 voltta 1.5 saat yürütüldü. Standart olarak 25 bp'lik DNA standardı kullanıldı. Jeller, BDA Jel Analiz Sistemi ile görüntülenerek kesim sonucu oluşan bant profilleri saptandı. RE ile kesim olmazsa, AA genotipi için 111 bp'lik tek bant oluşur. Kısmi kesimde, AB genotipi için 34, 77 ve 111 bp'lik üç bant görülür. Tam kesim olduğunda ise BB genotipi için 34 ve 77 bp'lik iki bant oluşmaktadır. Şekil 3.3.'de PON192 R/Q için RFLP sonuçları gösterilmiştir.



Şekil.3.5.: HinfI restriksiyon enzim kesiminden elde edilen PON1 192 Q/R genotipleri: % 4'lük Nu mikropor agarozda görüntülendi. 1, 25 bç'lik DNA standardı; 2 ve 6 PON 192 AB genotipi; 3,5,7 ve 9 PON 192 AA genotipi; 4 ve 8 PON 192 BB genotipi

CETP Taq1B RFLP analizi için, kesim sonucu elde edilen ürünler % 2'lik agaroz jelde yürütüldü ($\frac{1}{2}$ x TBE, 80 volt, 1.5 saat). Standart olarak 100 bç'lik DNA standardı kullanıldı. Bant profilleri BDA Jel Analiz Sistemi (Whatman Biometra, Göttingen, Almanya) ile görüntülenerek değerlendirildi. RE ile kesim olmazsa, B2B2 genotipi için 535 bç'lik tek bant oluşurken; kısmi kesimde, B2B1 genotipi için 174, 361 ve 535 bç'lik üç bant; tam kesim olduğunda ise B1B1 genotipi (R, arjinin) için 174 ve 361 bç'lik iki bant görülmektedir. Şekil 3.4.'de CETP Taq1B için RFLP sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 3.6.: Taq1 Fast Digest restriksiyon enzim kesiminden elde edilen CETP Taq1B genotipleri: %2'lik agaroz jelde yürütüldü.1, 100 bç'lik DNA standardı; 2,4,6,7,9 ve 11 B2B1 genotipi; 3 ve 8 B2B2 genotipi; 5 ve 10 B1B1 genotipi 3.2.5.PON1 Enzim Aktivitelerinin Tayini

3.2.5. PON-1 Enzim Aktivitelerinin Tayini

3.2.5.1 Paraoksonaz Aktivitesinin Ölçümü

Paraoksonaz aktivitesi için substrat olarak paraokson kullanıldı. Paraokson hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolün 25°C ve 405 nm’de spektrofotometrik olarak birim zamandaki absorbans değişiminin tesbit edilmesi ölçümün esasını oluşturmaktadır. Ölçümde örnek olarak serum kullanılmaktadır (156).

Kullanılan Çözeltiler:

1) 100 mM’lık tris/HCl tamponu (pH=8): 3,027g tris+ 34,7 mg CaCl₂ + 14,61 g NaCl tartılır, yaklaşık 200 mL saf suda çözünür. HCl ile çözeltinin pH’sı 8’ e ayarlanır. Son hacim saf suyla 250 mL’ ye tamamlanır.

2) Paraokson çözeltisi: 18 µL paraokson 654 µL asetonda çözünür, üzerine 12,7 mL tris/HCl tamponu eklenir ve iyice karıştırılır. Renkli şişede taze olarak hazırlanır. Daha sonra üzerine 50 mL tris tamponu ilave edilerek paraokson reaktifi hazırlanmış olur.

Paraoksonaz Aktivite Ölçümü

Tablo 3.9.’da paraoksonaz aktivite ölçümü reaksiyon karışımı gösterilmiştir.

Tablo 3.9.: Paraoksonaz aktivite ölçümü reaksiyon karışımı

	Numune	Kör
Tris/HCl tamponu (100 mM, pH 8.0)	190 µL	190 µL
Numune	13 µL	-
H ₂ O	-	13µL
Paraokson	47 µL	47µL

Tablo’daki gibi reaksiyon karışımı hazırlandıktan sonra mikropate okuyucuda 25°C ve 405 nm’de 5 dakika boyunca absorbanslar okundu, p-nitrofenolden dolayı meydana gelen dakikadaki absorbans değişimi ($\Delta A/dk$) kaydedildi. Paraoksonaz aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı. Dakikada bir nmol p-nitrofenol oluşturan enzim miktarı bir ünite olarak ifade edildi (156).

Paraoksonaz Aktivitesinin Hesaplanması:

$$U/mL \text{ (nmol/dk/mL)} = \frac{\Delta A/dk}{\epsilon} * SF * 10^6 * 1/0,6$$

$\Delta A/dk$: Bir dakikadaki absorbans değişimi

ϵ : p-nitrofenolün molar absorbtivite katsayısı, mevcut deney şartları için (pH:8) 17600.

SF : Seyreltme faktörü (Total hacim/Numune hacmi)

10^6 : nmole çevirme faktörü

1/0,6 : Plate ışık yolunun uzunluğu

3.2.5.2. Arilesteraz Aktivitesinin Ölçümü

Arilesteraz (ARE) aktivitesi ölçümünde substrat olarak fenilasetat kullanıldı. ARE aktivitesi ölçüm prensibi, fenilasetatın hidrolizi sonucu oluşan fenolün absorbans değişiminin 25°C ve 270 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler:

1. 100 mM’lık tris/HCL tamponu (pH=8): 3,027g tris+ 34,7 mg CaCl₂ tartılır, yaklaşık 200 mL saf suda çözünür. HCl ile çözeltinin pH’sı 8’e ayarlanır. Son hacim saf suyla 250 mL’ ye tamamlanır.
2. Fenilasetat çözeltisi: 24 µL fenilasetat 15,2 mL tris tamponunda çözülür ve üzerine 40 mL tris tamponu ilave edilir.

ARE aktivite ölçümü:

Örnekler 1/40 oranında dilüe edilir (8 µL serum, 292 µL distile su). 10 µL dilüsyonlu örnek + 200 µL fenilasetat çözeltisi plate’ e pipetlendi. 25°C ve 270 nm’de 3 dk kinetik okuma yapıldı.

Dakikada bir µmol fenol oluşturan enzim miktarı 1 ünite olarak ifade edildi. Molar absorbtivite katsayısı 1310 (ε) kullanılarak ARE aktivitesi hesaplandı.

ARE Aktivitesinin Hesaplanması:

$$U/ml (\mu mol/dk/ml) = \frac{\Delta A/dk}{\epsilon} * SF * 10^3 * 1/0,6$$

$\Delta A/dk$: Bir dakikadaki absorbans değişimi

ϵ : Molar absorbtivite katsayısı, 1310

SF : Seyreltme faktörü

10^3 : mikromole çevirme katsayısı

1/0,6 : plate ışık yolu uzaklığı

3.2.6. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Lipid hidroperoksitlerinin yıkım ürünü olan MDA, LDL oksidasyon düzeyinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler:

- 1) 0,44 M H_3PO_4 = 44,49 mL H_3PO_4 alınır, son hacmi distile suyla 1,5 L ye tamamlanır.
- 2) 42 mM TBA = 6,052 gTBA alınır 200 mL distile suda çözülür. Son hacmi yine distile suyla 1 L'ye tamamlanır.
- 3) 1 M NaOH 211,5 mL = 8,46 g NaOH alınır ve son hacmi distile suyla 211,5 mL' ye tamamlanır.
- 4) Alkalen metanol : 50 mL metanol + 4,5 mL 1 M NaOH
- 5) MDA std= 25 μ L tetraetohidroksipropan 500 μ L distile su ile çözülür.

Çözeltiler hazırlandıktan sonra serum MDA düzeylerini ölçmek için tablo belirtilen şekilde standart ve numune tüpleri hazırlandı. Tablo 3.10.'da serum MDA düzeyi ölçümü için reaksiyon karışımı gösterilmiştir.

Tablo 3.10.: Serum MDA düzeyi ölçümü için reaksiyon karışımı

	Numune	Standart
Serum	50 µL	--
0,44 M H ₃ PO ₄	750 µL	750 µL
42 mM TBA	250 µL	250 µL
Distile su	450 µL	450 µL
MDA standardı	--	50 µL
60 dakika kaynar su banyosunda bekletilir		
Alkalen metanol	1,5 mL	1,5 mL
2000 g'de 3 dk santrifüjden sonra süpernatant kısmından 200 µL viallere aktarılır. Oluşan MDA TBA kompleksi HPLC'de analizi yapılır.		

Kromatografik şartlar.

Akış hızı: 0,8 mL/dk

Mobil faz: 50 mM fosfat tamponu/metanol(ph 6,8, 40:60 v/v)

Basınç: 90 ± 10 barr kolon PHENOMEX RP-C18 kolon (150mm*4,6 mm,5mikrometre)

Dedektör: floresan dedektör(eksitasyon:527 nm , emisyon 551 nm)

Kolon sıcaklığı : 25 °C (183)

3.2.7.Çalışma Gurubuna Uygulanan Rutin Biyokimyasal Testler**3.2.7.1. Total Kolesterol Ölçümü**

Ölçüm Prensibi: Totak kolesterol ölçümü enzimatik-kolorimetrik yöntemle yapılır. Kolesterol düzeyi ölçümünde öncelikle kolesterol, kolesterol esterase ile esterlerinden hidroliz edilir. Daha sonra kolesterol oksidaz kullanılarak H₂O₂ oluşturulur. H₂O₂ daha sonra fenol ve 4-aminoantipirin ile peroksidaz enzimi katalizörlüğünde reaksiyon vererek renkli bir bileşik oluşturulur. Oluşan bu renkli kompleksin absorbansı kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kolesterol ölçümleri Cobas c 501 Otoanalizör cihazında Cobas Roche Kolesterol kiti kullanılarak yapıldı.

3.2.7.2. HDL-Kolesterol Ölçümü

Ölçüm Prensibi: HDL-kolesterol ölçümü enzimatik-kolorimetrik yöntemle yapılır. HDL-kolesterol tayini anti-human beta-lipoprotein antikorlarının LDL, VLDL ve şilomikronlarla antijen-antikor kompleksi oluşturması esasına dayanır. HDL-kolesterol konsantrasyonu, amino gruplarına bağlanan polietilen glikol (PEG) ile kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz varlığında gerçekleşen reaksiyonla enzimatik olarak ölçülür. Oluşan mavi renkli kompleksin absorbansı HDL-kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

HDL-Kolesterol ölçümleri Cobas c 501 Otoanalizör cihazında Cobas Roche HDL kiti kullanılarak yapıldı.

3.2.7.3.LDL-Kolesterol Ölçümü

Ölçüm Prensibi: LDL-Kolesterol ölçümü enzimatik-kolorimetrik yöntemle yapılır. LDL-kolesterol düzeylerinin ölçümünde öncelikle serum örnekleri kolesterol esteraz ile kolesterol ve yağ asitlerine hidroliz edilir. Oluşan LDL-kolesterol oksijen varlığında kolesterol oksidaz ile okside olur ve H_2O_2 oluşur. H_2O_2 ' nin 4-aminoantipirin ile reaksiyonu sonucu oluşan mavi-mor renkli pigmentin absorbansı LDL-kolesterol düzeyi ile doğru orantılıdır.

LDL-kolesterol ölçümleri Cobas c 501 Otoanalizör cihazında Cobas Roche LDL kiti kullanılarak yapıldı.

3.2.7.4.Trigliserid Ölçümü

Ölçüm Prensibi:Trigliserid ölçümü enzimatik-kolorimetrik yöntemle yapılır. Serum trigliserid düzeyinin tayininde önce trigliseridlerin lipoprotein lipaz (LPL) enzimiyle gliserol ve yağ asitlerine ayrıştırılması sağlanır. Daha sonra gliserol ATP varlığında gliserol kinaz enzimiyle gliserol-3-fosfata (G-3-P)' a dönüştürülür. G-3-P, gliserol fosfat oksidaz (GPO) enziminin katalizörlüğünde oksitlenerek dihidroksi aseton fosfat (DAP) ve H_2O_2 oluşturmaktadır. Oluşan H_2O_2 , 4-aminofenazon ve 4-aminofenol varlığında peroksidaz enzimiyle oksitlenir. Reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renkli kromojenin absorbansı trigliserid konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Trigliserid

ölçümleri Cobas c 501 Otoanalizör cihazında Cobas Roche Triglicerid kiti kullanılarak yapıldı.

3.2.7.5.VLDL Ölçümü:

Çalışma grubunda ,serum trigliserid düzeyi 400 mg/dl'den düşük olan kişilerin VLDL düzeyleri Friedewald formülü ($\text{trigliserid} / 5$) kullanılarak belirlendi.

3.2.7.6.ApoA1 Ölçümü

Serum apoA1 düzeyleri immünonefelometrik yöntemle Siemens Dade Behring BNII cihazında ölçüldü.

3.2.7.7. ApoB Ölçümü

Serum apoA1 düzeyleri immünonefelometrik yöntemle Siemens Dade Behring BNII cihazında ölçüldü.

3.2.8.İstatistiksel Değerlendirme:

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 15.00 for Windows (SPSS, Inc, Chicago, Illinois, USA) paket programı kullanıldı. Parametrelerin normal dağılıp dağılmadığını anlamak için önce histogram grafiği çizildi. Daha sonra frekans analizinde skewness değerlerine bakıldı. Ayrıca Levene testi uygulanarak varyansların homojenliğine bakıldı. Verilerin hepsi normal dağıldığı için parametrik testler kullanıldı. Biyokimyasal parametrelerin gruplar arası karşılaştırılmasında İndipendent Student's t-testi, genotip ve allel frekanslarının gruplar arası farklılıklarının değerlendirilmesinde ise Ki kare (χ^2) testi uygulanarak p değerleri hesaplandı. Ölçülen biyokimyasal parametrelerin serum düzeyleri arası ilişkinin incelemesinde, Pearson korelasyon analizi yapıldı. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ olması anlamlı, $p < 0.01$ olması çok anlamlı olarak kabul edildi.

4.BULGULAR

Bu çalışmada Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Yoğun Bakım Ünitesinde myokard infarktüsü tanısı ile tedavi edilen ve yapılan koroner anjiyografi sonucu aterosklerotik damar patolojisi tesbit edilen 100 kişi hasta grubu olarak tanımlandı. Yine aynı kliniğe göğüs ağrısı şikayeti ile başvurup, yapılan koroner anjiyografi sonucu aterosklerotik damar patolojisi tesbit edilemeyen 100 kişi ise kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Tablo 4.1.'de hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri ve klinik karakteristikleri, tablo 4.2.'de ise çalışılan parametrelerin ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilişi gösterilmiştir.

Tablo 4.1.: Hasta ve kontrol gruplarının demografik özellikleri ve klinik karakteristikleri.

	Hasta (n=100)	Kontrol(n=100)	p
Erkek	75	56	0,007
Kadın	25	44	0,007
Yaş	61.8 $\pm$ 12.1	57.8 $\pm$ 11.8	0,018
Sigara içimi	49	23	0,000
Diyabet	15	14	1,000
Hipertansiyon	36	28	0,289
Ailede KAH	6	6	1,000
Sistolik T/A (mm/Hg)	118.1 $\pm$ 22.2	114.6 $\pm$ 15.7	0,201
DiastolikT/A (mm/Hg)	72.0 $\pm$ 12.9	70.1 $\pm$ 10.1	0,250

Tablo 4.2.: Çalışılan parametrelerin ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde ifade edilişi.

	Hasta (n=100)			Kontrol (n=100)			p
		%95 GA			%95 GA		
		Düşük	Yüksek		Düşük	Yüksek	
Glukoz (mg/dL)	135.1±63.7	120.8	150.7	108.7± 35.7	100.2	115.2	0,000
T.Kl(mg/dL)	177.3± 42.7	165.2	185.3	183.9± 43.7	174.8	193.5	0,282
LDL-K (mg/dL)	119.9 ± 35.8	110.0	126.8	116.3± 34.9	109.6	124.3	0,474
HDL-K(mg/dL)	36.5 ± 8.2	34.5	38.7	42.7 ± 13.1	39.5	44.8	0,000
Trigliserid (mg/dL)	152.7 ± 93.6	128.1	174.7	143.9± 68.9	130.6	160.1	0,447
VLDL (mg/dL)	30.5 ± 18.7	25.6	34.9	28.7 ± 13.7	26.1	32.0	0,757
ApoB (g/L)	0.97 ± 0.30	0.92	1.06	0.88 ± 0.25	0.82	0.92	0,030
ApoA1 (g/L)	1.08 ± 0.21	1.04	1.15	1.25 ± 0.35	0.91	1.63	0,281
ApoB/ApoA1	0.91 ± 0.30	0.85	1.00	0.84 ± 0.47	0.74	0.95	0,260
PON (U/ mL)	89.5 ± 37.5	80.3	98.6	128.1± 78.4	111.5	144.6	0,000
MDA(mmol/ mL)	6.04 ± 4.03	5.34	7.41	1.19 ± 0.43	1.08	1.26	0,000
Arilesteraz (U/mL)	42.0 ± 12.7	37.9	43.5	38.8 ± 14.7	35.2	40.5	0,107

PON 192 R/Q genotipleri ve A/B (R/Q) allel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımları analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre PON 192 R/Q genotipleri ve A/B (R/Q) allel frekansları açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu ile hasta grubu arasındaki fark anlamlıydı($p<0,01$). Kontrol ve hasta grubundaki A/B (R/Q) allel frekansları, PON 192 R/Q genotip dağılımı ve istatistiksel değerlendirmesi tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Tablo 4.3.:PON 192 R/Q polimorfizmi genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımları.

		KONTROL		HASTA		p
GENOTİP		n	%	n	%	
PON 192 R/Q Genotipleri	AA (QQ)	53	(%53)	24	(%24)	0,000
	AB (QR)	39	(%39)	63	(%63)	
	BB (RR)	8	(%8)	13	(%13)	
PON 192 Allel frekansı	A (Q)	145	(%57)	111	(%43)	0,000
	B (R)	55	(%38)	89	(%62)	

Hasta grubunda PON1 192 Q/R polimorfizmi genotiplerine göre demografik özellikler ve biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirmesi Tablo 4.4’de gösterilmiştir.

Tablo 4.4.:Hasta Grubunda PON1 192 R/Q Polimorfizmi Genotiplerine Göre Demografik Özellikler ve Biyokimyasal Parametrelerin Dağılımı

	PON 1 192 R/Q GENOTİPLERİ			p
	AA (QQ) (n:24)	AB (QR) (n:63)	BB (RR) (n:13)	
Yaş	61.12±11.79	62.0± 12.71	62.53 ±10.21	0.935
Erkek	16	49	10	0.556
Kadın	8	14	3	0.556
Sigara	12	30	7	0.914
Diyabet	5	9	1	0.546
Ailede KAH	0	5	1	0.365
Hipertansiyon	9	23	4	0.912
T.Kolesterol(mg/dL)	175.5± 41.7	176.2± 40.8	186.0± 55.1	0.738
HDL-K(mg/dL)	35.66 ± 7.91	36.96 ± 8.53	35.97 ± 8.09	0.935
LDL-K (mg/dL)	122,67 ± 36,68	117,60 ± 35,23	126,38 ± 39,23	0.886
Trigliserid (mg/dL)	137.1± 52.9	151.5 ±91.9	187.8± 146.6	0.289
ApoB (g/L)	1.00± 0.32	0.95± 0.28	0.93± 0.33	0.760
ApoA1 (g/L)	1.07± 0.24	1.09± 0.20	1.05± 0.21	0.760
ApoB/ApoA1	0.98± 0.40	0.89 ±0.27	0.87± 0.16	0.413
PON (U/ mL)	61.61 ± 28.39	99.90 ± 36.21	111.0 ± 31.34	0.567
MDA (mmol/ mL)	5.16 ± 3.69	6.44 ± 4.05	5.72 ± 4.54	0.887
Arilesteraz (U/ mL)	43.75± 12.97	40.44 ±13.40	46.38± 7.41	0.234

Kontrol grubunda PON1 192 Q/R polimorfizmi genotiplerine göre demografik özellikler ve biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirmesi Tablo 4.5’de gösterilmiştir

Tablo 4.5.: Kontrol Grubunda PON1 192 R/Q Polimorfizmi Genotiplerine Göre Demografik Özellikler ve Biyokimyasal Parametrelerin Dağılımı

	PON 1 192 R/Q GENOTİPLERİ			p
	AA (QQ) (n:53)	AB (QR) (n:39)	BB(RR) (n:13)	
Yaş	55.96± 10.73	60.02± 13.57	59.12± 9.24	0.257
Erkek	28	22	6	0.499
Kadın	25	17	2	0.499
Sigara	14	8	1	0.612
Diyabet	4	8	2	0.546
Ailede KAH	2	4	0	0.365
Hipertansiyon	15	11	2	0.981
T.Kolesterol(mg/dL)	181.4± 38.14	193.7± 44.0	152.1± 62.54	0.139
HDL-K(mg/dL)	43.39 ± 11.36	42.74 ± 15.35	38.97 ± 13.94	0.865
LDL-K (mg/dL)	112,91 ± 30,47	125,97 ± 35,63	92,50 ± 46,71	0.367
Trigliserid (mg/dL)	140.6± 66.6	152.4± 73.5	124.1± 62.1	0.505
ApoB (g/L)	0.89± 0.26	0.84± 0.23	0.95± 0.26	0.415
ApoA1 (g/L)	1.14± 0.21	1.46± 0.25	1.05 ±0.21	0.599
ApoB/ApoA1	0.81± 0.28	0.87± 0.67	0.94± 0.32	0.694
PON (U/ mL)	115.9 ± 77.02	139.0 ± 78.56	151.4 ± 84.78	0.543
MDA (mmol/ mL)	1.17 ± 0.39	1.24 ± 0,47	1.02 ± 0.39	0.864
Arilesteraz (U/ mL)	38.12 ±12.63	40.68 ±17.60	34.71± 13.25	0.511

Her iki çalışma grubunda, PON1 192 R/Q polimorfizmi genotiplerine göre demografik özellikler ve biyokimyasal parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tesbit edilememiştir ($p>0.05$).

CETP Taq1B genotipleri ve B1/B2 allel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımları analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre CETP genotipleri ve B1/B2 frekansları açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu ile hasta grubu arasındaki fark anlamlı değildi($p>0.05$). Kontrol ve hasta grubundaki B1/B2 allel

frekansları, CETP Taq1B genotip dağılımı ve istatistiksel değerlendirmesi tablo 4.6. da gösterilmiştir.

Tablo 4.6.:CETP Taq1B polimorfizmi genotip ve allel frekanslarının hasta ve kontrol gruplarındaki dağılımları.

GENOTİP		KONTROL		HASTA		p
		n	%	n	%	
CETP Taq1B Genotipleri	B2B2	22	(%22)	22	(%22)	0,944
	B2B1	53	(%53)	51	(%51)	
	B1B1	25	(%25)	27	(%27)	
PON 192 Allel frekansı	B2	97	(%48,5)	95	(%47,5)	0,944
	B1	103	(%51,5)	105	(%52,5)	

Hasta grubunda CETP Taq1B polimorfizmi genotiplerine göre demografik özellikler ve biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirmesi Tablo 4.7’de gösterilmiştir

Tablo 4.7.: Hasta Grubunda CETP Taq1B Polimorfizmi Genotiplerine Göre Demografik Özellikler ve Biyokimyasal Parametrelerin Dağılımı.

	CETP Taq1B Genotipleri			p
	B2B2 (n:22)	B2B1 (n:51)	B1B1 (n:27)	
Yaş	61.25± 13.42	62.22± 12.47	61.66± 10.86	0.951
Erkek	14	39	22	0.759
Kadın	6	11	18	0.759
Sigara	7	27	15	0.353
Diyabet	3	6	6	0.625
Ailede KAH	1	3	2	0.971
Hipertansiyon	5	19	12	0.510
T.Kolesterol(mg/dL)	176.2 ±34.6	171.3 ±43.3	188.0 ±45.8	0.238
HDL-K(mg/dL)	38,03 ± 8,08	35,48 ± 7,63	37,25 ± 9,41	0.456
LDL-K (mg/dL)	122,67 ± 36,68	117,60 ± 35,23	126,38 ± 39,23	0.554
Trigliserid (mg/dL)	166.5± 108.8	145.3± 88.2	156.3± 93.8	0.680
ApoB (g/L)	0.93± 0.30	0.96± 0.31	0.99± 0.27	0.779
ApoA1 (g/L)	1.06± 0.20	1.09± 0.19	1.08± 0.26	0.851
ApoB/ApoA1	0.90± 0.29	0.88± 0.23	0.97± 0.38	0.407
PON (U/ mL)	85.83± 36.14	91.31 ±38.16	91.77± 40.04	0.891
MDA (mmol/ mL)	5,59 ± 3,33	5,95 ± 4,18	6,47 ± 4,27	(p>0,05)
Arilesteraz (U/ mL)	40.38 ±11.28	41.78± 13.86	43.45 ±12.00	0.700

Kontrol grubunda CETP Taq1B polimorfizmi genotiplerine göre demografik özellikler ve biyokimyasal parametrelerin istatistiksel değerlendirmesi Tablo 4.8’da gösterilmiştir.

Tablo 4.8.: Kontrol Grubunda CETP Taq1B Polimorfizmi Genotiplerine Göre Demografik Özellikler ve Biyokimyasal Parametrelerin Dağılımı.

	CETP Taq1B Genotipleri			p
	B2B2 (n:22)	B2B1 (n:53)	B1B1 (n:25)	
Yaş	54.9 ±10.89	57.35 ±12.86	61.28± 9.96	0.173
Erkek	11	29	16	0.605
Kadın	11	24	9	0.605
Sigara	4	15	4	0.402
Diyabet	3	6	5	0.587
Ailede KAH	0	6	0	0.971
Hipertansiyon	6	11	11	0.510
T.Kolesterol(mg/dL)	181.0 ±51.7	186.5± 42.0	180.9 ±40.9	0.822
HDL-K(mg/dL)	41,90 ± 10,42	44,07 ± 15,33	40,64 ± 10,17	0.679
LDL-K (mg/dL)	112,91 ± 30,47	125,97 ± 35,63	125,97 ± 35,63	0.453
Trigliserid (mg/dL)	169.6± 104.2	133.5± 55.1	143.2± 51.7	0.119
ApoB (g/L)	0.88± 0.25	0.86± 0.24	0.89± 0.28	0.914
ApoA1 (g/L)	1.08± 0.17	1.39± 0.22	1.12± 0.29	0.666
ApoB/ApoA1	0.82± 0.22	0.86± 0.60	0.83± 0.32	0.914
PON (U/ mL)	110.7± 63.7	127.0± 78.9	146.2± 88.3	0.362
MDA (mmol/ mL)	1,13 ± 0,49	1,19 ± 0,42	1,23 ± 0,39	0.876
Ariesteraz (U/ mL)	35.82± 10.49	40.41± 16.12	38.20 ±15.04	0.462

Her iki çalışma grubunda CETP Taq1B polimorfizmi genotiplerine göre demografik özellikler ve biyokimyasal parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tesbit edilememiştir.

Çalışma Grubunun Korelasyon Bulguları

İncelenen parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon testi ile hasta ve kontrol gruplarında araştırıldı.

Hasta grubunun korelasyon bulguları:

MDA ile ApoB($r=-0.207$, $p<0.05$) arasında negatif korelasyon saptandı.

Arilesteraz ile ApoB($r=0.281$, $p<0.01$), arasında pozitif korelasyon saptandı.

ApoB ile ApoA1 ($r= 0.358$, $p<0.01$), ApoB/ApoA1($r= 0.661$, $p<0.01$), LDL-K ($r= 0.257$, $p<0.01$), total kolesterol ($r= 0.199$, $p<0.05$) arasında pozitif korelasyon saptandı.

ApoA1 ile ApoB/ApoA1 ($r= -0.372$ $p<0.01$), arasında negatif ,HDL-K($r=0.384$, $p<0.01$); ile pozitif korelasyon saptandı.

ApoB/ApoA1 ile HDL-K($r=-0,247$ $p<0,05$) arasında negatif korelasyon saptandı.

HDL-K ile trigliserid ($r=-0,268$, $p<0,01$), VLDL ($r=-0,268$, $p<0,01$) arasında negatif korelasyon tesbit edildi.

LDL-K ile total kolesterol ($r=0.941$, $p<0.01$), trigliserid ($r=0.215$, $p<0.05$), VLDL($r=0.215$, $p<0.05$) arasında pozitif korelasyon saptandı.

Total kolesterol ile trigliserid ($r=0.395$ $p<0.01$), VLDL ($r=0.396$ $p<0.01$) arasında pozitif korelasyon tesbit edildi.

Trigliserid ile glukoz($r=0.282$ $p<0.01$) arasında pozitif korelasyon tesbit edildi.

Tablo 4.5.'de hasta grubunda incelenen biyokimyasal parametrelerin korelasyon bulguları gösterilmektedir.

Tablo 4.5.: Hasta grubunun korelasyon bulguları

	PON1	MDA	AE	ApoB	ApoA1	ApoB/ApoA1	HDL-K	LDL-K	Total Kol.	TG	VLDL	Glukoz
PON1		0,174	0,234	0,145	0,147	-0,020	0,231	0,162	237	0,060	0,060	0,084
MDA			0,076	-0,207*	0,010	-0,188	-0,039	-0,170	-0,193	-0,048	-0,050	-0,136
AE				0,281**	0,166	0,164	0,040	0,052	0,075	-0,012	-0,012	-0,036
ApoB					0,358**	0,661**	0,043	0,257**	0,199*	-0,086	-0,085	0,140
ApoA1						-0,372**	0,384**	0,007	0,040	-0,155	-0,155	-0,022
ApoB/ ApoA1							-0,247*	0,168	0,099	0,036	0,037	0,109
HDL-K								0,131	0,185	-0,268**	-0,268**	-0,104
LDL-K									0,941**	0,215*	0,215*	0,052
Tot.K.										0,395**	0,396**	0,157
TG											1,000**	0,282**
VLDL												0,282**
Gluk.												

**p<0,01*p<0,05

Kontrol grubunun korelasyon bulguları

PON1 ile total kolesterol ($r=-0,234$, $p<0,05$) arasında negatif korelasyon saptandı.

MDA ile arilesteraz ($r=-0,300$, $p<0,01$) arasında negatif korelasyon saptandı.

Ariesteraz ile HDL-K ($r=0,245$, $p<0,05$), LDL-K ($r=0,210$, $p<0,05$), total kolesterol ($r=0,271$, $p<0,01$) arasında pozitif korelasyon saptandı.

ApoB ile ApoB/ApoA1 ($r=0,464$, $p<0,01$) arasında pozitif korelasyon saptandı.

ApoB/ApoA1 ile HDL-K ($r=0,336$, $p<0,01$) arasında pozitif korelasyon saptandı.

HDL-K ile total kolesterol ($r=0,209$, $p<0,05$) arasında pozitif korelasyon; trigliserid ($r=-0,231$, $p<0,05$) ve VLDL ($r=-0,231$, $p<0,05$) arasında negatif korelasyon saptandı.

LDL-K ile total kolesterol ($r=0,942$, $p<0,01$), trigliserid ($r=0,942$, $p<0,01$) ,VLDL ($r=0,942$, $p<0,01$) arasında pozitif korelasyon saptandı.

Tablo 4.6'da kontrol grubunda incelenen biyokimyasal parametrelerin korelasyon bulguları gösterilmektedir.

Tablo 4.6.: Kontrol grubunun korelasyon bulguları

	PON1	MDA	AE	ApoB	ApoA1	ApoB/ApoA1	HDL-K	LDL-K	Total Kol.	TG	VLDL	Glukoz
PON1		0,073	0,137	0,032	0,038	-0,067	-0,166	-0,201	-0,234*	-0,037	-0,037	-0,043
MDA			-0,300**	-0,132	-0,008	-0,096	0,168	0,020	0,017	-0,057	-0,057	0,196
AE				0,151	0,062	-0,027	0,245*	0,210*	0,271**	0,019	0,019	-0,123
ApoB					0,142	0,464**	0,104	0,096	0,132	-0,038	-0,038	0,189
ApoA1						-0,248	-0,106	0,150	0,102	0,034	0,034	-0,029
ApoB/ApoA1							0,336**	-0,054	0,070	-0,101	-0,101	0,137
HDL-K								0,010	0,209*	-0,231*	-0,231*	-0,076
LDL-K									0,942**	0,437**	0,437**	-0,047
Tot,K										0,456**	0,456**	-0,031
TG											1,000**	-0,070
VLDL												-0,070
Gluk.												

*p< 0,05 **p<0,01

5. TARTIŞMA

Myokard infarktüsü (MI) tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de erişkinlerde başta gelen mortalite ve morbidite nedenidir. Her yıl yaklaşık 1,5 milyon kişi MI, 500 bin kişi ise inme (stroke) geçirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün hazırladığı rapora göre 2020 yılında KAH ve MI'nin mortalitede birinci sırada olacağı tahmin edilmektedir.

MI ateroskleroza bağlı olarak koroner kan akımının azalması sonucu meydana gelen bir hastalık tablosudur. Ateroskleroz ise hiperlipidemi, hipertansiyon, diyabet ve obezite gibi bazı risk faktörleri ile tetiklenen, çocukluk yaşlarda başlayan kompleks inflamatuvar bir olaydır. (7).

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar aterosklerotik damar hastalığının etiopatogenezini büyük ölçüde aydınlatmaktadır. Bugünkü görüşler, belirli bir genetik altyapıya sahip kişilerde çevresel risk faktörlerinin etkisi ile aterosklerozun başladığı, ilerlediği ve klinik olaylara yol açtığı şeklindedir. Aterosklerotik damar hastalığına yol açan bağımsız risk faktörleri birçok çalışmada tanımlanmıştır. Bu risk faktörlerinin birbirleri ile sinerjik etki göstererek koroner arter hastalığı gelişimini hızlandırdıkları anlaşılmıştır.

Bu faktörlerin başında hiperlipidemi gelmektedir. Çünkü deneysel çalışmalarla hiperlipidemi oluşturulmasından sonra damar duvarında aterosklerotik lezyonlar tesbit edilmiştir. Bununla birlikte hiperlipidemi düzeyi ile ateroskleroz gelişimi arasında birlikteliğin olduğu saptanmıştır. Ayrıca tedavi ile aterosklerotik sürecin geri döndürülebilir olması bu risk faktörünün önemini daha da artırmaktadır. Aterosklerozun ortaya çıkmasında en önemli basamak düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'nin oksidasyonla değişime uğramasıdır. Damar duvarına girip okside olan LDL, sitokinlerin salınımının stimülasyonu ve nitrik oksit inhibisyonu yoluyla endotelial hasar oluşturup ateroskerozu hızlandırır.

HDL'nin ateroskleroz sürecindeki önleyici rolü iyi bilinmektedir. Koroner arter hastalığı ile HDL kolesterol seviyesi arasında güçlü bir ters ilişki vardır. HDL-K'deki her %1'lik azalma, KAH riskini %2-3 artırmaktadır. (8)

Başlangıçta HDL'nin ateroskleroz gelişimini önleyici etkisinin, revers kolesterol transport sistemi ile periferik dokulardaki ihtiyaç fazlası kolesterolü uzaklaştırmasına bağlı olduğu düşünülüyordu. Ancak son çalışmalar, HDL'nin LDL partiküllerinin oksidatif modifikasyonunu inhibe etmesinin aterosklerozun önlenmesinde çok daha önemli olduğunu

saptamıştır. HDL, LDL oksidasyonunun inhibisyonunu yapısında bulunan bir enzim olan paraoksonaz aracılığıyla gerçekleştirmektedir.

In vitro çalışmalarda, HDL-bağımlı PON1'in LDL oksidasyonunu önlediği ve okside LDL'deki biyolojik olarak aktif olan lipidleri hidrolize ettiği gösterilmiştir (264).

PON1 enziminin, normal arter duvarında bulunduğu ve aterosklerotik süreçte konsantrasyonunun arttığı saptanmıştır (265).

Ateroskleroz riski ile serum PON aktivitesi arasında ters bir ilişki bulunmuş ve bu ilişki PON'un okside LDL üzerine olan hidrolitik aktivitesine bağlanmıştır. Serum PON aktivitesi, popülasyon grupları arasında ve aynı popülasyon içinde geniş varyasyonlar gösterdiği saptanmıştır. Çünkü PON1 aktivitesi ve konsantrasyonu genetik, yaşam tarzı, diyet ve çevresel faktörlere bağlı olarak değiştiği tesbit edilmiştir. Serum PON aktivitesindeki bu varyasyonları belirleyen en önemli etkenin 192. kodonda (Q/R192) arginin ile glutamin (Glu-Arg) aminoasitlerinin yer değiştirmesine ve 55.kodonda (M/L55) metionin ile lösin (M/L) aminoasitlerinin yer değiştirmesine bağlı olarak oluşan polimorfizmden kaynaklandığı düşünülmektedir.

PON 192 Q/R polimorfizminde, genotip dağılımı ve allel frekansının ateroskleroz ve KAH gelişim riski ile ilişkisini araştıran birçok çalışma yapılmış ve birbiriyle uyumsuz sonuçlar elde edilmiştir. Bazı çalışmalar R alleli ile KAH riski arasında pozitif ilişki olduğunu bildirirken, diğer bazı çalışmalar tam tersini söylemektedir. Birbiriyle uyumsuz olan sonuçların, incelenen nüfus, diyet alışkanlıkları, çevresel faktörler ve çalışma tipindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kaman D. ve ark. Türk popülasyonunda koroner anjiyografi sonucu KAH tanısı konulan 277 kişi(hasta grubu) ve yine anjiyografi ile koroner ateroskleroz tesbit edilemeyen 92 kişi (kontrol grubu) ile yapmış oldukları çalışmada, hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) daha fazla sigara içimi, yüksek TK, LDL-K ve düşük HDL-K düzeyleri tesbit etmiştir. Serum PON1 paraoksonaz aktivitesi hasta grubunda kontrol grubuna göre daha düşük olarak tesbit edilip bunun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,001$) olduğu belirtilmiştir. PON192 genotip dağılımı açısından hasta grubu (QQ için 42.2, QR için 41.2, RR için 16.6) ile kontrol grubu (QQ için 46.7, QR için 44.6, RR için 8.7) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamış ($p=0,17$) ve PON192 Q/R gen polimorfizminin KAH ilişkili olmadığı sonucuna varılmıştır. Her iki çalışma grubunda da paraoksonaz aktivitesi RR genotipinde en yüksek, QR genotipinde orta derecede, QQ genotipinde düşük olarak tesbit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada PON1 gen

polimorfizmi, PON1 aktivite düzeyi ve KAH'nın şiddeti arasındaki ilişki araştırılmış, KAH şiddeti ile diğerleri arasında herhangi bir ilişki tesbit edilmemiştir (266). Türk toplumunda yapılan bir başka çalışmada, bu çalışmaya benzer şekilde, KAH ile PON 192 R/Q polimorfizmi arasında anlamlı ilişki gözlenmemiştir (267)

Taşkıran P. ve ark. KAH tanısı konan 120 kişi (hasta grubu) ile özgeçmişinde KAH öyküsü olmayan, rutin laboratuvar incelemeleri ve elektrokardiyografileri normal bulunan 102 sağlıklı birey (kontrol grubu) üzerinde yapmış oldukları çalışmada, hasta grubunda PON 192 polimorfizmi için genotip dağılımını RR %4.2, QQ %55.8 ve RQ %40 olarak tesbit etmişlerdir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PON 192 R/Q polimorfizmi ile KAH arasında anlamlı ilişki bulamamışlardır. ($p>0.05$). Aynı çalışmada aile öyküsü, hipertansiyon, DM, sigara, aşırı kilo, yüksek total kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserit sıklığının KAH grubunda daha fazla olduğu gözlenmiştir (264).

Hermann ve arkadaşları, Fransa'nın kuzey (Lille), doğu (Strasbourg), güneybatı (Toulouse) bölgelerinde ve İrlanda'nın Belfast (kuzey İrlanda) bölgesinde KAH ile PON 192 gen polimorfizmi arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma yapmışlardır. Lille'de 106 hasta 144 kontrol, Strasbourg'da 206 hasta 186 kontrol, Toulouse'da 145 hasta 201 kişi kontrol, Belfast'ta 195 hasta 170 kişilik kontrol grubuyla yaptıkları çalışmada PON1 192 Q/R gen polimorfizminin MI ile ilişkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Ramakrishnan ve ark. (268) Hindistanda 124 kişilik hasta (MI) ve 221 kişilik kontrol grubu üzerinde yapmış oldukları çalışmada PON 192 genotip dağılımını hasta grubunda QQ(%33,9), QR (56,4), RR(%9,7), kontrol grubunda QQ(%48,9), QR (45,2), RR(%5,9) olarak tesbit etmişlerdir. Ayrıca allel frekansı hasta grubunda Q(0,62), R(0,38), kontrol grubunda Q(0,71), R(0,29) olarak saptamışlardır. Elde ettikleri veriler istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,021$) olup, sonuç olarak PON 192 gen polimorfizminin (RR genotipi) MI ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı çalışmada PON 192 genotiplerine göre PON aktivite düzeyi karşılaştırıldığında QQ genotipinde hem hasta hem de kontrol grubunda RR genotipine göre daha düşük tesbit edilmiştir. Bu durum ise lipid düşürücü tedavi alan kişilerin çalışma dışı bırakılmamasına bağlanmıştır (268). Çünkü son zamanlarda yapılan çalışmalarda statinlerin (serum lipid düzeyini düşüren ilaçlar) PON1 aktivitesini QR+RR genotiplerinde QQ genotipine göre daha fazla arttırdığı rapor edilmiştir. Tomas ve ark. nın, hiperkolesterolemili hastalarda 20 mg/gün simvastatin tedavisinin serum PON1 aktivitesinde belirgin artış sağladığını

saptamışlardır. Ayrıca PON1 değişiminin HDL değişiminden bağımsız olduğunu göstermişlerdir (269,270).

Randa ve ark Mısır popülasyonunda PON1 192 RR genotipinin tek başına KAH gelişme riskini 9 kat, QR genotipinin ise 4 kat arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca paraoksonaz aktivitesi ve MDA düzeylerinin PON 192 RR genotipinde QQ genotipine göre artmış olduğunu saptamışlardır. İnsanlarda PON1 aktivitesinin popülasyonlar arasında büyük farklılıklar gösterdiği tesbit edilmiştir. PON1 enzimini kodlayan gen bölgerindeki polimorfizmlerin bu farklılığın esas sebebi olduğu düşünülmektedir. PON1 192 R allelinin paraokson hidrolizi için Q alleleline göre birkaç kat daha fazla aktivite gösterdiği bulunmuştur. Lipid peroksidasyonu ile ilgili çalışmalarda PON1 192 RR genotipinin QQ genotipine göre lipid peroksidlerini daha az etkili olarak hidrolize ettiği saptanmıştır. Ayrıca Regieli ve ark. PON1 192 R izoformunun Q izoformuna göre Cu^{+2} ile indüklenen LDL oksidasyonuna karşı daha düşük peroksidaz aktivitesi gösterdiğini tesbit etmişlerdir. Bu sebeple PON1 192 Q izoformunun LDL oksidasyonuna karşı koruyucu bir faktör olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmaya benzer şekilde 192. pozisyonda arjinin bulunan homozigot bireylerin (RR genotipi) paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinin yüksek, glutamin bulunan homozigot bireylerde (QQ genotipi) aktivite daha düşük, heterozigot bireylerde (QR genotipi) ise orta düzeyde aktivite görülmüş ve PON1'in LDL'yi oksidasyondan koruma kapasitesi ile paraoksonu hidrolize etme aktivitesi arasında ters orantının olduğu çeşitli yazarlar tarafından rapor edilmiştir (176, 266, 271).

Ayrıca Randa ve ark. aynı çalışmada, HDL-K düzeylerinin PON1 192 RR genotipinde PON1 192 QQ genotipine göre daha düşük olduğunu göstermişlerdir (271). Yine bu çalışmada TK, trigliserid ve LDL-K seviyelerinin PON 192 RR genotipinde PON 192 QQ genotipine göre önemli oranda artmış olduğunu tesbit etmişlerdir. Paraoksonaz aktivitesinin HDL-K ile pozitif korelasyon ve TK, trigliserid, LDL-K, MDA düzeyleri ile negatif korelasyon gösterdiğini bulmuşlardır. Randa ve ark. sonuç olarak Mısır popülasyonundaki KAH'da PON1 aktivitesinin düşük olduğunu ve koroner aterosklerozun şiddeti ile PON1 aktivitesi arasında önemli bir ilişkinin olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca PON1 R alleli ile Mısırlı hastalarda KAH gelişimi arasında anlamlı ilişkinin olduğunu tesbit etmişlerdir. Benzer şekilde Hegele ve ark. homozigot ve heterozigot yüksek aktiviteli allelin (R) homozigot düşük aktiviteli allele (Q) göre daha yüksek aterojenik lipid profiline sahip olduğunu gözlemlemişlerdir.

100 hasta ve 100 kontrol üzerinde yapmış olduğumuz çalışmada PON1 192 genotip dağılımını hasta grubunda, QQ(0.24), QR(0.63), RR(0.13), kontrol grubunda; QQ(0.53),

QR(0.39), RR(0.8) olarak tesbit edilmiştir. Allel frekansları ise hasta grubunda Q(0.43), R(0.62), kontrol grubunda Q(0.57), R(0.38) olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz veriler istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Sonuç olarak yapmış olduğumuz bu çalışmada, Türk popülasyonunda yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak PON1 192 gen polimorfizminin (RR genotipi) MI ile ilişkili olduğu tesbit edilmiştir. Aynı etnik popülasyonda gözlenen bu farklı sonuçlar PON1 192 gen polimorfizminin popülasyonlar arası ve aynı popülasyon içinde değişiklik gösterdiği düşüncesini doğrulamıştır. PON1 192 genotiplerine göre PON1 enzim aktivite düzeyini hasta grubunda QQ genotipinde 61.61 ± 28.39 U/mL, QR genotipinde 99.90 ± 36.21 U/mL, RR genotipinde 111 ± 31.34 U/mL olarak tesbit edilmiştir. Hasta grubunda, PON aktivitesindeki genotipler arası fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Kontrol grubunda PON 192 genotiplerine göre PON aktivitesi; QQ genotipinde 115.9 ± 77.02 U/mL, QR genotipinde 139.0 ± 78.56 U/mL, RR genotipinde ise 151.4 ± 84.78 U/mL olarak saptanmıştır. Kontrol grubunda, PON aktivitesindeki genotipler arası fark istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Ancak her iki grupta da QQ genotipinde, MI ile ilişkisi istatistiksel olarak gösterilen RR genotipine göre daha düşük PON1 aktivitesi düzeyi tesbit edilmiştir. Başlangıçta bu durum PON enziminin ateroskleroz oluşumunu engelleyici etkisine zıt olarak gözükmekteydi. Ancak çalışmayı planlarken lipid düşürücü tedavi alanları (statin) çalışma dışı bırakılmamıştır. Mirdamadi ve ark. yapmış olduğu çalışmada da belirtildiği üzere statin tedavisi QR ve RR genotipinde QQ genotipine göre PON aktivite düzeyini arttırmaktadır. Çalışmamızdaki BB genotipindeki AA genotipine göre yüksek PON aktivite düzeyleri bu ve benzeri çalışmalarla ilişkilendirilmiştir. Ancak diğer bazı çalışmalarda R alleli taşıyanların Q alleli taşıyanlara göre daha yüksek paraoksonaz aktivitesi ve lipid peroksidlerine karşı daha düşük peroksidaz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu durum bizim çalışmamızda anlamlı olarak R alleli taşıyanlarda Q alleli taşıyanlara göre yüksek PON1 aktivitesi tesbit edilmesinin sebebini daha iyi açıklamaktadır. Ayrıca PON 192 genotipleri ile HDL-K , MDA ve LDL-K düzeyleri arasında her iki çalışma grubunda da anlamlı bir ilişki tesbit edilememiştir.

PON1 192 gen polimorfizmi ile KAH arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalardaki farklı sonuçlar etnik , çevresel, ve metodolojik faktörlere (denek sayısı ve özellikleri) bağlı olabilir. Bu faktörler içinde en önemlisi etnik gruplardır. Örneğin Mısır popülasyonu ve Kafkasyalılarda QQ genotipinin sık görüldüğü tesbit edilmiştir. Ayrıca, Japon ve Çinlilerde R allel frekansının fazla olduğu ispatlanmıştır. Serrato ve ark. USA’da yapmış oldukları çalışmada R alleli KAH arasındaki ilişkiyi açık bir şekilde tesbit etmişlerdir. Sangera ve ark. PON 192 gen

polimorfizmi ile KAH arasındaki ilişkiyi Hindistanlılarda tesbit edip, Çinlilerde böyle bir ilişkiye rastlamamışlardır. Ko ve ark. Taiwan da yapmış oldukları çalışmada KAH ile kontrol grubu arasında PON192Q/R polimorfizmi açısından anlamlı bir fark bulamamışlardır.

Navab ve ark. düşük PON aktivitesinin HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruma kapasitesini azalttığı ve bu nedenle KAH gelişimine neden olduğunu göstermişlerdir. PON1 aktivitesinin azalmasına yol açan olası mekanizma, ya okdidatif stresin artmasına bağlı enzim inaktivasyonu ya da akut faz cevabına bağlı olarak karaciğerde sentezinin azalması olabilir. PON1 aktivitesinin azalması KAH olanlarda HDL-K seviyesinin düşük olmasına bağlı olabilir. Lipid peroksitler PON1'in substratıdır. KAH olan kişilerde lipid peroksit düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Lipid peroksitlerin düzeyinin artması PON1 aktivitesini inhibe etmektedir. Aviram ve ark. benzer şekilde oxLDL tarafından PON1 inaktivasyonunun PON1 aktivitesinin ve LDL'yi oksidasyondan koruma özelliğinin azalması ile sonuçlandığını açıkça göstermiştir. oxLDL varlığında enzim zaman bağımlı olarak inhibe olmaktadır. OxLDL ile PON1 inaktivasyonu, okside lipidler ile enzimin serbest sülfidril grupları arasındaki etkileşime bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca bakır iyonlarının kalsiyum iyonlarıyla yer değiştirmesi sonucu enzim aktivitesinin inhibe olduğu tesbit edilmiştir.(272)

HDL yapısında bulunan PON1'in LDL'nin oksidasyonunu önleyerek inflamatuvar cevabı engelleyebileceği düşünülmüştür. Ancak akut faz reaksiyonu süresince PON1 aktivitesinin önemli derecede kaybolduğu, bu nedenle HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruyamadığı gösterilmiştir. Ayrıca, koroner aterosklerozlu hastalarda HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruyamadığı bildirilmiş ve bunun düşük serum PON1 aktivitesinden kaynaklanıyor olabileceği öne sürülmüştür. Mackness ve ark. ise, serum PON1 aktivitesinin ve konsantrasyonunun myokard infarktüsü belirtilerinin başlamasından sonraki iki saat içinde azaldığını, PON1 düzeyinin miyokard infarktüsü sonrasındaki 42 gün boyunca akut faz reaksiyonu geçmiş olduğu halde değişmediğini göstermiştir. PON1 aktivitesindeki bu azalmanın akut olgunun öncesinde mevcut olabileceğini bildirmişlerdir. Tüm bu verilere ek olarak, ateroskleroza yatkınlık oluşturan beslenmenin tavşanlarda, farelerde ve insanlarda PON1 düzeyini azalttığı gösterilmiştir. Koroner kalp hastalığı olan kişilerde arttığı gösterilen ve PON1'in substratı olan lipid peroksitleri aynı zamanda PON1'in inhibitörüdür. Sonuç olarak koroner kalp hastalığında PON1 aktivitesinin düşük olmasından çevresel faktörlerin genetik faktörlere, (PON1- M55Lve PON1-Q192R polimorfizmleri) göre daha fazla sorumlu olabileceği ifade edilmektedir (272).

Çalışmamızda PON1 enzim aktivitesini hasta grubunda $89,5 \pm 37,5$ U / mL, kontrol grubunda ise $128 \pm 78,4$ mmol/mL olarak saptanmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). Hasta grubunda kontrol grubuna göre daha düşük olan PON1 enzim aktivite düzeyi, MI ile PON1 enziminin hem genotipik hemde fenotipik olarak ilişkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca hasta grubunda kontrol grubuna göre daha düşük HDL-K, daha yüksek MDA ve apoB düzeyleri tesbit edilmiştir. Bu sonuçların istatistiksel olarak çok anlamlı olması ($p < 0,01$) PON1'in ateroskleroz ve MI riski ile olan ilişkisini bir kez daha doğrulamış olmaktadır.

Kolesteril ester transfer proteini (CETP), kolesterol esterleri ve trigliseridlerin lipoproteinler arasında yer değiştirmesini ve ters kolesterol taşınmasını kolaylaştıran bir enzimdir. Aynı zamanda CETP, HDL-K metabolizması, HDL çapı ve altgruplarının dağılımının belirlenmesinde önemli bir rol oynar. CETP gen polimorfizmlerinin, CETP aktivitesi ve HDL-K düzeylerindeki değişikliklerden sorumlu olduğu bulunmuştur (273). CETP eksikliği olan hastalarda yüksek HDL-K ve düşük LDL-K düzeyleri tesbit edilmiştir (274). CETP gen bölgesi ile ilgili üzerinde en fazla çalışma yapılan Taq1B polimorfizmi olup, CETP geninin 1. intronunun 279. nükleotid pozisyonunda guaninin adeninle yer değiştirmesi sonucu meydana gelir. Daha az sıklıkta görülen B2 alleli düşük CETP aktivitesi ve konsantrasyonu ile ilişkili bulunmuştur (275). Normolipidemik kişilerde bu allelin, yüksek serum HDL-K düzeyleri ve düşük CETP aktivitesine neden olduğu gözlemlenmiştir. Ancak bu ilişkinin popülasyona özgü karakteristikler gösterdiği ve çevresel faktörlerden(alkol tüketimi, sigara içimi ve obezite) çok fazla etkilendiği tesbit edilmiştir (276, 277).

Özsait B ve ark. Türkiye'nin yedi değişik bölgesinde 2000-2006 yılları arasında 1585 kişi ile (773 erkek, 812 bayan) yapmış olduğu çalışmada, cinsiyetten bağımsız olarak CETP Taq1B polimorfizminin HDL-K düzeyleri ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Yaşa ve cinsiyete göre HDL-K ortalama düzeyleri düzenlendiğinde B1B1(41,3 mg/dL) genotipine göre B1B2 (43,8 mg/dL) genotipinde %6,12, B2B2 genotipinde (47,8 mg/dL) %15,9 artış olduğu saptanmıştır. Ayrıca düşük HDL-K düzeyleri (erkekde ≤ 40 mg/dL, bayanda ≤ 50 mg/dL) ile çevresel faktörler (yaş, BMI, alkol alımı, sigara içimi, fiziksel aktivite düzeyi) arasındaki ilişki araştırılmıştır. Her iki cinsiyette yaş ve BMI'in düşük HDL-K düzeyi en fazla ilişkili faktörler olarak tesbit edilmiştir. Ayrıca erkeklerde sigara içimi ile düşük HDL-K arasında ilişki bulunmuştur. Bu çalışmada yüksek TK/HDL-K oranının her iki cinsiyette B1B1 genotipi ile ilişkisi istatistiksel olarak ($p < 0,01$) anlamlı bulunmuştur. Bayanlarda TK düzeyleri B2B2

genotipinde B1B1 genotipinden anlamlı olarak yüksek saptanmıştır. LDL-K ve trigliserid düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. ApoA1 düzeyi ise B2B2 ve B2B1 genotiplerinde yüksek bulunmuştur. Türk adult popülasyonunda yapılan bu çalışmada, Türk popülasyonu (Türk kalp çalışması) (278) ve başka popülasyonlarla yapılan diğer çalışmalarla (23,279) benzer şekilde B2 alleli daha az (%43) sıklıkta tesbit edilmiştir. Ayrıca başka çalışmalarla benzer şekilde (279,280) B2B2 genotipinde yüksek HDL-K düzeyleri tesbit edilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda B2 alleli ile düşük CETP aktivitesi arasındaki anlamlı ilişki tanımlanmıştır. Bu durum B2B2 genotipine sahip olanlardaki yüksek HDL-K düzeylerini açıklamaktadır (23).

Taq1B polimorfizminin CETP aktivitesi ve HDL-K düzeyi ile ilişkili olduğu ve özellikle daha az görülen B2 allelinin düşük CETP aktivitesi , yüksek HDL-K düzeyi ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Buna rağmen söz konusu ilişki net bir şekilde ortaya konulamayıp, çevresel ve metabolik faktörler tarafından modifiye edildiği saptanmıştır. Kuzey Amerika ve Avrupa popülasyonuna göre Türk popülasyonunda HDL-K düzeyleri daha düşüktür (281). Düşük HDL-K düzeylerinin Türkiye dışında yaşayan Türklerde de görülmesi, Türk'lerdeki düşük HDL-K seviyesinin çevresel faktörlerden daha çok genetik faktörlerle ilişkili olduğu ihtimalini güçlendirmektedir (281).

S.Doğru-Abbasoğlu ve ark. yaşları 20 ile 63 arasında olan 92 sağlıklı kadın ve 49 sağlıklı erkek ile Türkiye'de yapmış oldukları çalışmada CETP Taq1B polimorfizmi genotip dağılımını B1B1 için %29,8, B2B1 için %47,5, B2B2 için %22,7 ve B2 allel frekansını 0,46 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada B2B2 genotipinde B1B1 genotipine göre %8,3 daha yüksek HDL-K düzeyi tesbit edilmesine rağmen bu sonucun anlamlı olmadığı saptanmıştır. Ayrıca diğer lipid parametreleri ile Taq1B genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (282). Taq1B polimorfizmi ile HDL-K düzeyleri arasındaki ilişki bazı çalışmalarda saptanırken (23) diğer bazı çalışmada böyle bir ilişkinin olmadığı (283) tesbit edilmiştir. Geçmişte yapılan çalışmalardaki bu tutarsızlık genetik faktörler dışındaki faktörlerin de (yaş, cinsiyet, BMI, sigara içimi, alkol tüketimi) HDL-K düzeyleri üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. (277)

Düşük serum HDL seviyesi ile KAH risk artışının ilişkili olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Klinik tecrübeler ile plazma HDL seviyesindeki %1'lik artışın kardiyovasküler morbidite ve mortalite riskini %2-3 azalttığını saptanmıştır. Bu sebeple CETP, HDL metabolizması üzerindeki etkisinden dolayı ateroskleroz gelişiminde rol oynamaktadır. Ordovas ve ark. 1411 erkek(163 kişi KAH), 1505 bayan (62 kişi KAH) ile yapmış olduğu

Framingham adlı çalışmada, erkeklerde Taq1B polimorfizminin HDL-K ve apoA1 seviyesi ile bayanlarda ise yalnızca HDL-K seviyesi ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkisinin olduğunu saptamışlardır. Diğer lipid parametreleri ile anlamlı ilişki tesbit edilememiştir. B2 alleli taşıyanlarda (B2B2, B2B1) B1B1 genotipi taşıyanlara göre daha yüksek HDL-K ve daha düşük aterogenik lipid (TK, trigliserid, LDL-K) düzeyi bulunmuştur. Ayrıca B2 allelinin KAH riskinin yaklaşık %30 azalması ile ilişkili olduğu tesbit edilmiştir. CETP aktivitesi B1 alleli taşıyanlarda B2 alleli taşıyanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda yüksek HDL-K düzeyi ve düşük CETP aktivitesinin KAH riskini azalttığı tesbit edilmiştir (23).

Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar, düşük HDL-K düzeylerinin prematür kardiyovasküler hastalığı bulunan kişilerde sık görülen dislipidemi tipi olduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle HDL metabolizmasının CETP gibi proteinlerle regülasyonuna olan ilgi artmıştır. CETP aktivitesi ile HDL-K düzeyleri arasında ters orantı vardır. CETP inhibitörlerinin HDL-K düzeyini arttırdığı tesbit edilmiştir. CETP geninin CETP aktivitesi ve/veya konsantrasyonu ve HDL-K konsantrasyonu ile ilişkili polimorfizmleri gösterilmiştir. Bu polimorfizmlerden biri olan Taq1B polimorfizmi nisbeten Kafkasya'lılarda (beyaz ırka mensup) daha yaygın olarak tesbit edilmiştir (284). B2 alleli yüksek HDL-K düzeyi, düşük CETP aktivitesi ve konsantrasyonu ile ilişkili bulunmuştur (254). CETP, HDL metabolizması için önemlidir ve CETP gen polimorfizminin HDL konsantrasyonundaki değişikliklerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Ancak CETP gen polimorfizmi ile KAH riski arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalarda tutarsızlık olduğu belirtilmiştir. Michael Y. Tsai ve ark. Amerika'da çeşitli etnik gruplarla (Kafkasya, Çin, Afrika-Amerika, İspanya) yapmış oldukları MESA (Multipl Ethnic Study of Atherosclerosis) adlı çalışmada CETP gen polimorfizmlerinin HDL-K düzeyi ve ateroskleroz oluşumuna olan etkisini incelemişlerdir. Çalışmaya 855 kişi katılmıştır. Taq1B B2 allel frekansı etnik gruplara göre belirlendiğinde (Kafkasya için 0.42, Çin için 0.42, Afrika-Amerika için 0.27, İspanya için 0.39) Afrika-Amerika etnik grubunda diğerlerine göre çok daha düşük olduğu gözlenmiştir. Etnik grupların HDL-K düzeyleri (Kafkasya için 52.8 mg/dL, Çin için 48.4 mg/dl, Afrika-Amerika için 52.1 mg/dl, İspanya için 48.5 mg/dl) ve trigliserid düzeyleri (Kafkasya için 130.3 mg/dL, Çin için 128.4 mg/dL, Afrika-Amerika için 103.3 mg/dL, İspanya için 161.8 mg/dL) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı($p<0.01$) olup, LDL-K düzeyleri (Kafkasya için 121.2 mg/dL, Çin için 111.6 mg/dL, Afrika-Amerika için 118.0 mg/dL, İspanya için 118.6 mg/dL) ise anlamsız olarak ($p<0.067$) tesbit edilmiştir. Taq1B genotipleri arasında HDL-K düzeyleri (B1B1 için 47.8 mg/dL, B2B1 için 49.8 mg/dL, B2B2

için 53.3 mg/dL), CETP aktivitesi ((B1B1 için 44.0 nmol/mL/hr, B2B1 için 40.0 nmol/ mL /hr, B2B2 için 35.3 nmol/ mL /hr) ve CETP konsantrasyonu (B1B1 için 1.92 µg/ mL, B2B1 için 1.75 µg/ mL, B2B2 için 1.44 µg/ mL) açısından istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.01$) saptanmıştır. Bu çalışmada koroner ateroskleroz ile Taq1B polimorfizmi arasında ilişki tesbit edilememiştir. Ayrıca HDL-K konsantrasyonu, CETP aktivitesi, CETP konsantrasyonu ve etnik gruplar arasında karşılıklı etkileşim saptanamamıştır. Sonuç olarak bu çalışmada diğer çalışmalarla benzer şekilde (284,254), Taq1B B2 allelinin yüksek HDL-K konsantrasyonu, düşük CETP aktivitesi ve konsantrasyonu ile ilişkili olduğu tesbit edilmiştir (246).

CETP'nin aterogenezdaki rolü hala tartışmalıdır. Reverse kolesterol transportundaki fonksiyonu nadeniyle antiaterogenik olduğu ve vücuttaki ihtiyaç fazlası kolesterolün LDL reseptörü aracılığıyla karaciğer tarafından alınıp safra yolu ile atılmasına sebep olduğu düşünülmektedir. CETP gen mutasyonlarının artmış HDL-K düzeyine rağmen KAH artışı ilişkili olduğu saptanmıştır. Jihène Rejeb ve ark. Tunus popülasyonunda 212 KAH ve 104 kontrol ile yapmış oldukları çalışmada hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı($p<0,05$) daha yüksek trigliserid ve apoB/apoA1 oranı, daha düşük HDL-K ve apoA1 düzeyi tesbit etmişlerdir. B2 allel frekansını hasta grubunda 0.29, kontrol grubunda 0.34 olarak tesbit etmişlerdir. B2 alleli taşıyanlarda B1B1 genotipine göre istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek HDL-K ($p<0.039$) ve apoA1 ($p<0.01$) düzeyi saptamışlardır. Diğer lipid parametreleri ile Taq1B genotipleri arasında ilişki bulunamamıştır. Ayrıca hasta grubunda genotip frekansı B1B1 %49, B2B1 %44, B2B2 %7 ve B2 allel frekansı 0.29 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar Afrika-Amerika popülasyonu ile yapılan bir çalışmadaki sonuçlarla benzerdi. Ancak diğer etnik gruplarla yapılan çalışmalarda B2 allel frekansı frekansı (Avrupa için 0.43, Amerika için 0.44, İsrail için 0.43, Taiwan için 0.42) farklıydı. Sonuç olarak bu çalışmada Tunus popülasyonunda CETP Taq1B gen polimorfizmi, B2 allelinin yüksek HDL-K ile ilişkili olduğu ve KAH riskini azalttığı tesbit edilmiştir (285).

Taq1B polimorfizminin HDL-K konsantrasyonuna olan etkisinin mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca HDL-K konsantrasyonundaki değişikliklerden sadece Taq1B polimorfizmi sorumlu değildir. Çünkü Taq1B sessiz bir mutasyon olup CETP'nin transkripsiyonel regulasyonu ve sekansını direkt olarak etkilememektedir. Taq1B polimorfizmindeki istatistiksel olarak anlamsız HDL-K düzeyleri , promotor bölgedeki diğer genlerin fonksiyonel polimorfizmlerine bağlı olabilir. Bu polimorfizmlerin CETP aktivitesini azaltmasına bağlı olarak HDL-K konsantrasyonu artmaktadır (254).

Yapılan birçok çalışmada çevresel faktörler ve CETP Taq1B polimorfizminin HDL-K konsantrasyonu üzerine olan etkisi arasında bir etkileşimin mümkün olduğu gösterilmiştir. Jihène Rejeb ve ark. B2 alleli taşıyanlarla artmış HDL-K düzeyleri arasındaki korelasyonun sigara içmeyen erkeklerde içenlere göre daha güçlü olduğunu tesbit etmişlerdir. WOSKOP çalışmasında Taq1B genotipi ile KAH arasındaki ilişki yalnızca sigara içmeyenlerde gözlenmiştir (286). Fumeron ve ark. ise sigara içimi ile ilgili bir etkileşim tesbit edememişlerdir (283).

Jihène Rejeb ve ark ayrıca B2 allelinin koroner stenoz riskinin %14 azalması ile ilişkili ve bunun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,042$) olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca çoklu risk faktörleri (yaş, cinsiyet, sigara içimi, diyabet, hipertansiyon, dislipidemi) için düzeltme yapıldıktan sonra bu ilişkinin istatistiksel olarak çok daha anlamlı olduğunu bulmuşlardır. Bu yüzden B2 allelinin sigara içmeyen erkeklerde koroner stenoz riskinin %38 azalması ile ilişkili ve bunun istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,037$) olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada elde edilen veriler REGRESS (Regression Growth Evaluation Statin Study), Framingham, WOSCOP (West of Scotland Coronary Prevention) VA-HIT (Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial) çalışmalarındaki verilerle uyuyormaktaydı. B1B1 genotipinin B2B2 genotipine göre koroner aterosklerozda ilerlemeye sebep olduğu REGRESS çalışmasında, daha fazla kardiyovasküler olaylara yol açması ise VA-HIT çalışmasında gösterilmiştir. Çalışmaların hepsinde B1B1 genotipi taşıyanların B2B2 genotipi taşıyanlara göre daha düşük HDL-K düzeylerine sahip oldukları saptanmıştır. Sonuç olarak Jihène Rejeb ve ark. yapmış olduğu bu çalışmada Tunus populasyonunda CETP Taq1B gen polimorfizmi B2 allelinin yüksek HDL-K ile ilişkili olduğu ve KAH riskini azalttığı tesbit edilmiştir. B2 alleli HDL-K düzeylerini arttırarak KAH'a karşı koruyucu etki göstermiştir. Bu koruyucu etki özellikle sigara içmeyen erkeklerde saptanmıştır. (285).

N.Padmaja ve ark. Hindistanda 504 KAH ve 338 kontrol ile yapmış oldukları çalışmada, hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek TK, trigliserid ve LDL-K düzeyi tesbit etmişlerdir. HDL-K açısından iki grup arasında bir fark bulamamışlardır. CETP Taq1B polimorfizmi için genotip dağılımında B1B1 genotipinin hasta grubunda (%32,3) kontrol grubuna göre (%25,4) anlamlı olarak ($p<0,01$) yüksek olduğunu tesbit etmişlerdir. B2B1 genotipi içinde (%52,8-%47,6 $p<0,01$) aynı durumu saptamışlardır. B2B2 genotipi ise kontrol grubunda (%26,92) hasta grubuna (%15,28) göre daha yüksek olarak tesbit edilmiştir. Kontrol grubunda B2B2 genotipi yüksek HDL-K düzeyi ile ilişkili iken hasta grubunda bu

saptanamamıştır. Kontrol grubu CETP B2B2 genotipinde (43,5 mg/dL) B1B1 genotipine (37,2 mg/dL) göre istatistiksel anlamlı ($p<0,01$) daha yüksek HDL-K düzeyi tesbit edilmiştir. Lipid düşürücü tedavilerin B2B2 genotipinde görülen yüksek HDL-K düzeylerini baskıladığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olup, hasta grubunda B2B2 genotipinde HDL-K düzeyinde anlamlı bir yükselişin olmaması buna bağlı olabilir. Hasta grubunda LDL-K düzeyleri B2B2 genotipinde (126,4 mg/dL) B1B1 genotipine (117,3 mg/dL) göre daha yüksek olarak tesbit edilmiştir. Hasta B2B1 genotipinde ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p<0,01$) yüksek LDL-K düzeyleri saptanmıştır. Hasta grubunda B2 alleli taşıyanlarda anlamlı olarak ($p<0,01$) düşük TK / HDL-K oranı bulunmuştur (287).

CETP Taq1B gen polimorfizmi için bizim yapmış olduğumuz çalışmada, A.Ü. Tıp Fakültesi Kardiyoloji Kliniği Yoğun Bakım Ünitesinde MI tanısı ile tedavi gören ve yapılan koroner anjiyografi sonucu aterosklerotik damar patolojisi tesbit edilen 100 kişi hasta grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Yine aynı kliniğe göğüs ağrısı ile başvurup yapılan koroner anjiyografi sonucu aterosklerotik damar bulgusu saptanamayan 100 kişi kontrol grubu olarak çalışmaya alınmıştır. CETP Taq1B polimorfizmi analizi sonucu, hasta grubunda (B1B1 için 0,27) kontrol grubuna(B1B1 için 0,25) göre B1B1 genotipinin (daha önceki çalışmalarda ateroskleroz ve KAH ile birlikteliği gösterilmiş olan) daha fazla olduğunu göstermiştir. B2B2 genotipi ise (önceki çalışmalarda ateroskleroza karşı koruyucu bir faktör olduğu gösterilen) her iki çalışma grubunda aynı olarak saptanmıştır. (B2B2 için 0,22). B1 allel frekansı hasta grubunda (hasta grubu için %52,5, kontrol grubu için %51,5), B2 allel frekansı ise (kontrol grubu için %52,5, hasta grubu için %51,5) kontrol grubunda daha fazla olarak tesbit edilmiştir. Ancak hem genotip dağılımı hem de allel frekansları açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p<0,944$).

CETP Taq1B polimorfizminin, CETP aktivitesi ve HDL-K düzeylerini etkilediği bilinmektedir. Çalışmamızda CETP genotiplerinden bağımsız olarak HDL-K konsantrasyonunu kontrol grubunda ($42,7 \pm 13,1$ mg/dL) hasta grubuna göre ($36,5 \pm 8,2$ mg/dL) daha yüksek tesbit edilmiştir. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak çok anlamlıydı ($p<0,001$). Cinsiyete göre HDL-K düzeylerini hasta grubunda erkeklerde $36,01 \pm 8,12$ mg/dL, bayanlarda $38,06 \pm 8,71$ mg/dL; kontrol grubunda erkeklerde $41,87 \pm 11,71$ mg/dL, bayanlarda $43,84 \pm 14,91$ mg/dL olarak saptanmıştır. Her iki grupta da bayanlardaki HDL-K düzeyi erkeklere göre yüksek olup, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$).

Hasta grubunda CETP Taq1B genotiplerine göre HDL-K düzeyi; B2B2 genotipinde $38,03 \pm 8,08$ mg/dL, B2B1 genotipinde $35,48 \pm 7,63$ mg/dL, B1B1 genotipinde $37,25 \pm 9,41$ mg/dL olarak bulunmuştur. Hasta grubunda, HDL-K düzeyindeki genotipler arası fark, istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p>0,05$). Kontrol grubunda, CETP Taq1B genotiplerinde HDL-K düzeyi; B2B2 genotipinde $41,90 \pm 10,42$ mg/dL, B2B1 genotipinde $44,07 \pm 15,33$ mg/dL, B1B1 genotipinde ise $40,64 \pm 10,17$ mg/dL olarak tesbit edildi. Kontrol grubunda, HDL-K düzeyindeki genotipler arası fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Ayrıca CETP genotiplerinde LDL-K ve VLDL düzeyleri her iki grupta anlamlı değildi. Sonuç olarak CETP Taq1B polimorfizmi ile MI arasında anlamlı bir ilişki tesbit edilememiştir. Buna gerekçe olarak CETP geninin hem promotor hem de kodlayıcı bölgedeki polimorfizmlerin ateroskleroz ve MI gelişim sürecinde daha etkili olmasına bağlanmıştır. Hasta ve kontrol gruplarında HDL-K düzeylerinde istatistiksel olarak çok anlamlı fark olması ve Taq1B genotiplerine HDL-K düzeylerinde böylesine anlamlı bir farkın olmayışı gerekçemizi doğrular nitelikteydi.

Çalışmamızda, ayrıca ateroskleroz ve MI gelişmesinde rolleri olduğu düşünülen apoB, apoA1, MDA, lipid profili (TK, HDL-K, LDL-K ve trigliserid) ve glukoz düzeylerinin analizini yapıldı. Tartışmamızın bu bölümünde bu parametrelerin MI ile olan ilişkileri gözden geçirilecektir

Ateroskleroz ve MI gelişimine yol açan risk faktörlerinin tesbiti için yapılan çeşitli araştırmalar sonucu apoB, apoA1 düzeylerinin ve apoB/apoA1 oranının hastalık riski ile çok yakın birliktelik gösterdiği tesbit edilmiştir. ApoB, VLDL, IDL, büyük çaplı LDL ve küçük yoğunluklu LDL (sdLDL) gibi aterojenik lipoprotein partiküllerinin yapısında bulunmaktadır. Bu yüzden apoB, aterojenik lipoproteinlerin toplam ateroskleroz potansiyelini tek başına yansıtabilir. Plazma apoA-I düzeyi ise HDL-K seviyesiyle büyük oranda korelasyon gösterir. ApoA-I'nin ekspresyonu, plazma HDL seviyesini etkiler. Bu yüzden apoA1, HDL'nin antiaterojenik özelliklerinin iyi bir göstergesidir. Bu özelliklerinden dolayı serum apoA1, apoB düzeyleri ve apoB/apoA1 oranı LDL ve diğer lipoproteinlere göre KAH riskini daha doğru bir şekilde gösterebilir (35).

Ramakrishnan ve ark. Hindistanda 124 kişilik hasta (AMI) ve 221 kişilik kontrol grubu üzerinde yapmış oldukları çalışmada apoB düzeyi ve apoB/apoA1 oranını gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bulmuşlardır. Lamarche ve ark. yaşları 45-76 arasında olan yeni tanı konmuş 2155 erkek KAH'da 5 yıl süren çalışmada (Quebec kardiyovasküler çalışması) apoB düzeylerinin ateroskleroz gelişimi ile ilişkili olduğunu tesbit etmişlerdir (288). Pischon

ve ark. 18225 katılımcı ile yaptıkları ve 6 yıl süren çalışmada apoB'nin, trigliserid, VLDL-K ve LDL-K'e göre MI riskinin daha iyi bir göstergesi olduğunu ifade etmişlerdir. (289). Sniderman ve ark. son yıllarda yapmış oldukları çalışmada da apoB'nin koroner kalp hastalığı için trigliserid, VLDL-K ve LDL-K'e göre daha iyi bir gösterge olduğunu bulmuşlardır (290). Van Lennep ve ark. anjiyografi ile KAH tanısı konan 675 erkek ve 137 bayan üzerinde yapmış olduğu çalışmada düşük apoA1, yüksek apoB ve apoB/apoA1 oranının hastalığın gelişiminde oldukça önemli bir risk faktörü olduğunu ifade etmişlerdir (291). İsveç'te yapılan AMORİS adlı prospektif çalışmada yaşları 20 ile 80 arasında değişen 98722 erkek ve 76381 bayan 11 yıl süre ile takip edilmiştir. Bu süre içinde takip edilen kişilerden 864 erkek ve 569 bayan ölümcül MI geçirmişlerdir. Araştırmacılar apoB seviyesi ile ölüm riski arasında güçlü bir birliktelik olduğunu tesbit etmişlerdir. ApoA1'in ise ölümcül MI için koruyucu bir faktör olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca MI gelişimi için LDL-K seviyesinin risk faktörü, HDL-K seviyesinde koruyucu bir faktör olduğu belirtilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada düşük apoA1 seviyesi, yüksek apoB seviyesi ve apoB/apoA1 oranının yaş, cinsiyet, TK ve trigliserid seviyesinden bağımsız bir risk faktörü olduğu ifade edilmiştir (35).

Yusuf ve ark. 15152 akut MI'lı hasta, yaş ve cinsiyetleri benzer 14820 kontrol üzerinde yapmış oldukları çalışmada apoB ve apoA1 seviyesinin diğer lipid profillerine göre hastalık riskini göstermesi bakımından çok daha önemli olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca apoB/apoA1 oranının diğer tüm risk faktörlerinden (sigara içimi, hipertansiyon, abdominal obezite, diabet, alkol, psikososyal stres, egzersiz) MI riski için daha önemli olduğunu tesbit etmişlerdir (292).

Meisinger ve ark. yaşları 35-64 arasında değişen daha önce MI geçirmemiş 1414 erkek, 1436 bayan ile yapmış oldukları 13 yıl süren çalışmada, çalışmaya katılanlardan 114 erkek ve 31 bayan bu süre içerisinde MI (71 fatal, 74 nonfatal) geçirmişlerdir. Çalışmada yüksek apoB düzeyleri ile MI risk artışı arasında güçlü bir birliktelik olduğunu tesbit etmişlerdir. Ancak yüksek apoA1 seviyesiyle MI riskinin azalması arasında önemli bir ilişkinin olmadığı ifade edilmiştir. (293) Cremer ve ark. yaşları 40-59,9 olan 5790 erkek ile yapmış oldukları 10 yıl süren çalışmada, takip süresince 45 kişide fatal 259 kişide nonfatal MI görülmüştür. MI geçiren kişilerde yüksek apoB seviyesi ve apoB/apoA1 oranı, düşük apoA1 düzeyleri tesbit edilmiştir (294).

Westerveld ve ark. anjiyografi ile KAH tanısı konmuş hasta grubunda apoB=1,48 g/L , apoA1=1,49 g/L; kontrol grubunda(n=129) apoB=1,25 g/L, apoA1= 1,53 g/L olarak tesbit etmişlerdir. Sonuç olarak yüksek apoB seviyesi ve apoB/apoA1 oranı, düşük apoA1

düzeylerinin diğer lipid düzeylerine göre KAH için daha önemli risk faktörü olduğunu ifade etmişlerdir (295). Lipid düşürücü tedavilerin apoB düzeyini ve apoB/apoA1 oranını azalttığı, apoA1 düzeyini ise arttırdığı pek çok çalışmada ifade edilmiştir. Statinlerin apoB'yi %15-50 azalttığı, apoA1'i ise %5-15 arttırdığı tesbit edilmiştir.

Son yıllarda Nissen ve ark. yapmış oldukları çalışmada akut koroner sendromlu hastalar 2 yıl süre ile günde 40 mg statin (rosuvastatin) ile tedavi edilmiştir. Tedavi sonucunda koroner arterlerdeki aterosklerotik lezyonlardaki gerileme istatistiksel olarak anlamlı($p<0,001$) bulunmuştur. Ayrıca hastaların LDL-K düzeyi 130 mg/dl'den 60 mg/dl'ye ve apoB/apoA1 oranı 0,95'den 0,49'a gerilemiştir (296).

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada hasta grubunda ApoB düzeyi $0,97 \pm 0,30$ g/L, kontrol grubunda ise $0,88 \pm 0,25$ g/L olarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlıydı. ($p>0,05$). Ayrıca apoB ile TK ve LDL-K arasında pozitif korelasyon tesbit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile benzerdi. ApoA1 düzeyleri ise hasta grubunda $1,08 \pm 0,21$ g/L, kontrol grubunda ise $1,25 \pm 0,35$ g/L olarak ölçüldü. Kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek apoA1 düzeyi tesbit edilmiştir. Ancak elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p>0,05$) ApoA1 ile HDL-K arasında pozitif korelasyon tesbit edildi. Bu sonuçlar diğer çalışmaların sonuçları ile benzerdi. Hasta grubunda ApoB/ApoA1 oranı $0,91 \pm 0,30$, kontrol grubunda ise $0,84 \pm 0,47$ olarak ölçüldü. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p>0,05$). ApoB/apoA1 oranı ile HDL-K arasında negatif korelasyon tesbit ettik.

Sonuç olarak çalışmamızda apoB düzeylerindeki artışın MI gelişimi ile ilişkili olduğunu, ayrıca apoB düzeylerinin aterogenik lipid profillerinin iyi bir göstergesi olduğu tesbit edildi. ApoA1 düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı olmasada hasta grubunda daha düşük olması ve HDL-K ile pozitif korelasyon göstermesi ateroskleroz için koruyucu bir faktör olduğu yönünde değerlendirildi. ApoB/ApoA1 oranı ise hasta grubunda daha yüksek olup, aterosklerozdan koruyucu etkisi ispatlanmış olan HDL-K ile negatif korelasyon gösterdiğinden dolayı ateroskleroz için bir risk faktörü olabileceği düşünüldü

KAH ile lipid anormallikleri arasında ilişkinin olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu anormallikler arasında artmış LDL-K düzeylerinin anahtar bir rol oynadığı düşünülmektedir. LDL-K aterogenitesi, onun büyüklük ve dansitesine bağlı olup küçük ve yoğun partiküller daha aterojeniktir (297). Hindistan'da diğer Asyalı populasyonlara göre daha yüksek sdLDL düzeyleri tesbit edilmiştir (298). Çalışmamızda hasta grubunda LDL-K düzeyi 119.9 ± 35.8

mg/dL, kontrol grubunda ise 116.3 ± 34.9 mg/dL olarak ölçüldü. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p>0.05$). Ayrıca hasta ve kontrol grubunda LDL-K ile TK ve trigliserid düzeyi arasında pozitif korelasyon tesbit edildi. Sonuç olarak LDL-K düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre bir miktar artmış bulunsada, LDL-K ile MI arasında bir ilişki saptayamadık.

LDL-K düzeylerinin normal olduğu durumlarda koroner hastalık riski, HDL-K düzeylerinin yüksek veya düşük oluşuna göre değişiklik gösterebilir. Bu durumda söz konusu kişilerin hastalık riskini değerlendirmek için lipoprotein (LDL-K/HDL-K) ve TK/HDL-K oranının kullanılmasının doğru sonuçlar verebileceği tesbit edilmiştir. TK/HDL-K oranı aynı zamanda VLDL düzeylerinin de gösterdiğinden daha sık kullanılmaktadır. Özellikle Türk toplumu gibi trigliserid düzeyi ve metabolik sendrom insidansı yüksek toplumlarda KAH risk tahmininde daha doğru sonuçlar verdiği saptanmıştır (299). TK/HDL-K oranının median değerleri sırasıyla erkek ve kadında Alman toplumunda 4,6-3,5 (300), Amerikan toplumunda 4,5-3,8 (301) ve Türk toplumunda 5,18-4,25 (299) olarak tesbit edilmiştir. KAH'ları üzerinde yapılan çalışmalarda genellikle median değerlerin 5,17-5,05 (302) olduğu bulunmuştur. TEKHARF çalışmasında KAH olan Türk erkeklerinde TK/HDL-K oranının $\geq 5,5$ olduğu ve Türk bayanlarda ise $\geq 5,0$ olduğu tesbit edilmiştir. Türk kalp çalışmasında ise erkeklerde 5,4 ve bayanlarda 3,9 oranı bulunmuştur. Framingham ve PROCAM (300) çalışmalarında ise TK/HDL-K oranındaki 2 birimlik artışın KAH riskini %68 arttırdığı gösterilmiştir. Biz hasta grubunda TK/HDL-K oranını 4.85 ve kontrol grubunda 4.30 olarak tesbit ettik. Bulduğumuz sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p>0,05$).

Yüksek glukoz düzeyleri ile ateroskleroz gelişimi arasındaki ilişki birçok çalışmada gösterilmiştir. Çünkü diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin fazla yapımının kronik hiperglisemi, hiperinsülinemi, artmış serbest yağ asidi ve dislipidemiye bağlı olduğu saptanmıştır (303). Diyabette, HDL ya da HDL yapısındaki PON1'in glikasyonu sonucu PON1 HDL'den ayrılır ve inaktive olur (304,305). PON1 diyabetiklerde, HDL'ye sağlıklı kişilere göre daha zayıf bağlandığından dolayı enzim aktivitesi stabil değildir (306). Sonuç olarak diyabetlilerde, HDL'nin serum düzeyinin azalmasına, HDL yapısındaki değişikliğe ya da okside lipidler tarafından direkt inaktivasyonuna bağlı olarak PON1 aktivitesinin azalmış olduğu tesbit edilmiştir (307).

Diabetik hastalarda oksidatif stres artmıştır. Bu artış ya LDL'nin glukoz tarafından glikasyon ve glikooksidasyonu sonucu ya da HDL'nin LDL'yi oksidasyona karşı koruyucu

etkisinin azalmasına bağlı olduğu saptanmıştır (308). Pajunen ve ark. yapmış oldukları çalışmada diabette HDL-K düzeyi normal olsa bile, HDL yapısında glikasyona bağlı yapısal ve fonksiyonel değişiklik olduğu için, aterosklerozdan koruyucu etkisinde belirgin bir azalma olduğunu tesbit etmişlerdir (309).

Flekac ve ark. 86 Tip1 DM, 246 Tip2 DM ve 110 sağlıklı kişide yapmış olduğu çalışmada PON1 aktivitesini kontrol grubuna göre (203 ± 58 mmol/min/ml)) hem tip1DM'da (110 ± 6 mmol/min/ml) hemde tip2DM'da (118 ± 69 mmol/min/ml) düşük olarak tesbit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlar her iki DM tipi için istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,01$). Aynı çalışmada PON1 192 gen polimorfizmi allel frekansları (Q: 0,54(kontrol), 0,81(T1DM), 0,85(T2DM); R: 0,46(kontrol), 0,19(T1DM), 0,15 (T2DM) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0,05$). Ayrıca diyabetik hasta grubunda PON1 enzim aktivitesi RR genotipinde QQ genotipine oranla daha yüksek olarak tesbit edilmiştir. Kontrol grubunda ise herhangi bir farklılık bulunamamıştır. Sonuç olarak QQ genotipine sahip olanların RR genotipine göre diyabetik kontrollerinin kötü olduğu ve bu nedenle ilerlemiş non-enzimatik glikasyon ile PON1 aktivitesinin azalması sebebiyle makrovasküler komplikasyon ve ateroskleroza yatkınlığı arttırdığı tesbit edilmiştir (310).

Çalışmamızda, glukoz düzeyi hasta grubunda $135,1 \pm 63,7$ mg/dL, kontrol grubunda ise $108,7 \pm 35,7$ mg/dL olarak ölçüldü. Elde edilen veriler istatistiksel olarak anlamlıydı. ($p < 0,05$). Hasta grubunda 15, kontrol grubunda ise 14 kişinin diyabet hikayesi olup gruplar arasında anlamlı bir fark tesbit edilmedi. Hasta grubunda kontrol grubuna göre glukoz düzeyinin yüksek olması yukarıdaki çalışmalarla benzerdir. Çalışmamızda glukoz yüksekliği ve MI arasındaki ilişkiyi, hiperglisemiye bağlı olarak HDL ve PON1'in glikasyonu sonucu ateroskleroz gelişiminin hızlanması şeklinde yorumladık. Ancak glukoz düzeyleri ile HDL-K ve PON1 aktivite düzeyleri arasında korelasyon olmaması (diyabet hikayesi olanların sayısının azlığı dikkate alındığında) glukoz tayini yapılan örneklerin uygun şartlarda (açlık kanı) alınmadığı şeklinde yorumlandı.

Lipid hidroperoksitlerin yıkımı sonucu oluşan aldehidler (MDA, α β unsature aldehidler) LDL yapısındaki Apo B100'un lizin residüsünün ω amino grupları ile birleşerek LDL yapısında değişikliğe yol açmaktadır. Sonuçta oluşan yapı, oxLDL olarak adlandırılır ve ateroskleroz patogenezindeki temel mekanizmayı oluşturmaktadır. Pek çok çalışmada LDL oksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyleri ile ateroskleroz arasındaki birliktelik gösterilmiştir (311).

Randa ve ark. yapmış olduğu çalışmada KAH'da kontrol grubuna göre TC, trigliserid LDL-C ve MDA düzeyini daha yüksek olarak tesbit etmişlerdir. De Rijke ve ark. çalışmasında oksidasyon parametreleri (MDA düzeyleri) ve koroner arter stenozunun ilerlemesi arasında ilişkinin olduğu ve oxLDL artışı ile stenozun kötüleştiğini gözlemlemişlerdir. Diğer bir çalışmada Rengtröm ve ark. LDL'nin oksidasyona karşı direnci ile koroner stenozun şiddeti arasında ters orantı olduğunu bulmuşlardır. Croft ve ark. ise diğer çalışmalardan farklı olarak oksidasyon parametreleri açısından (TBARS,MDA) KAH olanlarla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuşlardır

Çalışmamızda, hasta grubunda MDA düzeyi $6,04 \pm 4,03$ mmol/ mL, kontrol grubunda ise $1,19 \pm 0,43$ mmol/ mL olarak ölçüldü. Elde edilen veriler istatistiksel olarak çok anlamlıydı ($p<0,01$). Elde ettiğimiz sonuçlar diğer çalışmalarla benzer olup, ateroskleroz patogenezindeki temel mekanizmanın LDL oksidasyonu olduğunu teyit etmektedir.

Sigara içenlerde, içmeyenlere göre KAH riskinin iki kat daha fazla olduğu tesbit edilmiştir. Ancak sigara içimi ile ateroskleroz gelişmesi arasındaki ilişkinin patofizyolojik mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Yapılan çalışmalarda, sigara dumanı içinde bulunan insan sağlığına zararlı çok sayıdaki maddeye (özellikle nikotin ve karbonmonoksit) bağlı olarak kısa vadede kalp hızı, kan basıncı ve kalp kasılma hızı artarak damarlarda spazm olduğu tesbit edilmiştir. Daha sonra endotelial disfonksiyon, plazma fibrin ve hematokrit düzeylerinde artış, kan lipid ve lipoprotein profilinde değişiklik ve dolaşan antioksidan düzeylerinde azalma olduğu saptanmıştır. Gelişen bu olaylara bağlı olarak bir yandan ateroskleroz hızlanırken diğer yandan myokard iskemisi, MI ve ani ölüme yol açabileceği bulunmuştur. Bu sebeple sigara içiminin tüm dünyada KAH için her iki cinsiyette de en önemli risk faktörlerinden biri olduğu tahmin edilmektedir (312). Craig WY ve ark. yapmış olduğu çalışmada, sigara içenlerde içmeyenlere göre trigliserid %1.7, LDL %9.1 daha yüksek, HDL ise %5.7 daha düşük olarak tesbit edilmiştir (313) Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda, sigara kullanımının enzim serbest tiyol gruplarını modifiye ederek, PON1 aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Sigara tarafından PON1 aktivasyon inhibisyonunun, doz ve zamana bağlı olduğu saptanmıştır. PON1 inhibisyonu sonucu LDL oksidasyonunun arttığı ve ateroskleroz oluşumunun hızlandığı tesbit edilmiştir (314).

Çalışmamızda hasta grubunda sigara içenlerin oranı %49, kontrol grubunda ise %23 olarak tesbit edilmiştir. Her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.01$).

Ayrıca hasta grubunda sigara içenlerde (87.24 ± 39.3 U/ mL) sigara içmeyenlere(91.52 ± 36.4) göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan ($p>0.05$) daha düşük PON1 aktivitesi saptanmıştır.

TEKHARF(Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri)çalışmasında diğer faktörlerden bağımsız olarak her yaşın KAH ihtimalini erkekte %6.1, kadında %6.6 arttırdığı tesbit edilmiştir. Bu sebeple her on yıl yaşlanma KAH ihtimalini Türk erkeğinde 1.8 kat, Türk kadınında 1.9 kat arttırdığı saptanmıştır. Ayrıca yaş kişinin en önemli çevresel risk faktörlerinden biri olup, gen-çevre etkileşiminin iyi bir göstergesi olduğu saptanmıştır(299). Ayrıca yaşlanma ile birlikte dolaşımdaki akut faz reaktanları ve CRP düzeylerinin artması sonucu inflamatuvar olayların meydana gelmesine bağlı olarak oksidatif stres artmaktadır. Oksidatif stresin artması PON1 aktivitesini inhibe etmekte ve HDL lipid peroksidasyonuna daha duyarlı hale gelmektedir. Yaşla birlikte PON1 enziminin inhibisyonuna bağlı olarak HDL ve LDL'nin oksidasyona karşı duyarlılığının artması ateroskleroz gelişimini hızlandırdığı saptanmıştır (315).

Çalışmamızda hasta grubu yaş ortalaması 61.8 ± 12.1 , kontrol grubu yaş ortalaması 57.8 ± 11.8 olarak tesbit edilmiştir. Her iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). Diğer çalışmalarla benzer şekilde çalışmamızda ileri yaş MI gelişimi ile ilişkili bulunmuştur.

Kardiyovasküler olayların klinik görünüm ve şiddetinin her iki cinsiyet arasında farklılık gösterdiği tesbit edilmiştir. KAH'nın kadınlarda erkeklere göre 10-20 yıl daha geç meydana geldiği saptanmıştır. Erkeklerde kardiyovasküler risk faktörlerine bağlı olarak KAH ve MI gelişiminin 3. veya 4. dekatta olduğu bulunmuştur. Kadınlarda ise reproduktif yaşlardaki seks hormon aktivitesinin, risk faktörlerinin etkisini azalttığı ve aterosklerotik lezyonların menopoza sonrasına kadar yavaş ilerlemesine neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca lipid profili açısından, her iki cinsiyet arasında farklılık olduğu tesbit edilmiştir. Erkeklerde 35 ile 50 yaş arası TK ve LDL-K düzeyleri artmıştır. 50 yaşından sonra TK, LDL-K, trigliserid ve Lp(a) düzeyleri sadece kadınlarda artmış olarak bulunmuştur. Ayrıca premenopozal kadınlarda HDL-K düzeyi aynı yaştaki erkeklere 9.7 mg/dl daha fazla olduğu saptanmıştır. HDL-K düzeyindeki her 1 mg/dl'lik artışın KAH riskini bayanlarda %3.0-4.7, erkeklerde ise %2.0-3.7 azalttığı tesbit edilmiştir. Menopoz sonrası kadınlarda antiaterogenik etkisi daha fazla olan HDL₂ azaldığı ve HDL₃ 'ün konsantrasyonunun arttığı saptanmıştır. Hipertrigliseridemi her iki cinsiyette de KAH için bağımsız bir risk faktörü olduğu bulunmuştur. Hipertrigliseridemi'nin HDL-K 'un normal düzeylerine rağmen kardiyovasküler olay gelişme ihtimalini kadınlarda

%37 erkeklerde ise %14 arttırdığı tesbit edilmiştir. Bu sebeplerden dolayı bir çok yazar özellikle 50 yaş öncesi erkek cinsiyetin KAH ve MI için bir risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir (316).

Çalışmamızda erkek cinsiyet hasta grubunda 75 kişi (%57), kontrol grubunda 56 (%43) kişi olarak tesbit edilmiştir. Kadın cinsiyet hasta grubunda 25 kişi(%36) , kontrol grubunda 44 kişi(%64) olarak saptanmıştır. Her iki cinsiyet için gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0.01$). Elde ettiğimiz sonuçlar diğer çalışmalarla benzer olup erkek cinsiyetin MI gelişimi için bir risk faktörü olduğunu göstermiştir.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Kardiyoloji yoğun bakım ünitesinde MI tanısı ile takip edilen,ve yapılan koroner anjiyografi sonucu aterosklerotik lezyon saptanan 100 kişi hasta grubu olarak tanımlanmıştır. Hasta grubunun yaş ortalaması $61,8 \pm 12,1$ olup, 75 erkek ve 25 kadın'dan oluşmaktaydı. Yine aynı kliniğe göğüs ağrısı(anjina) şikayeti ile başvuran ve yapılan koroner anjiyografi sonucu aterosklerotik lezyon tesbit edilemeyen 100 kişi kontrol grubu olarak tanımlanmıştır. Kontrol grubunun yaş ortalaması $57,8 \pm 11,8$ olup 56 erkek ve 44 kadın'dan oluşmaktaydı. Ateroskleroz ve MI gelişimine karşı HDL'nin koruyucu bir rol üstlendiği ispatlanmıştır. HDL'nin, bu etkisine PON1 ve CETP enzimlerinin aracılık ettiği saptanmıştır. Bu iki enzimin aktivitesinin genetik ve çevresel faktörler tarafından değiştirildiği bir çok çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada amacımız PON1 ve CETP gen polimorfizmi ile MI arasındaki ilişkiyi tesbit ederek, genetik açıdan yüksek riskli bireyleri saptamaktır. Bu amaç doğrultusunda yapmış olduğumuz çalışmada, her iki çalışma grubundaki bireylerin, PON1-192 ve CETP Taq1B gen polimorfizimleri, PON1 enzim aktivitesi, serum MDA düzeyi, apoB ve apoA1 konsantrasyonu ve lipid profili analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde özetlenmiştir:

- Hasta grubunda kontrol grubuna göre, ileri yaş ($p<0.01$), erkek cinsiyet ($p<0.01$) ve sigara içimi ($p<0.01$) anlamlı olarak daha fazla oranda tesbit edilmiştir .
- Kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek HDL-K düzeyleri gözlenmiştir ($p<0,01$) Hasta grubunda HDL-K ile apoB/apoA1 oranı ve trigliserid düzeyi arasında negatif , apoA1 arasında ise pozitif korelasyon saptanmıştır.
- Serum glukoz düzeyleri, hasta grubunda daha yüksek olarak tesbit edilmiştir($p<0,01$) .
- Serum apoB düzeyi, hasta grubunda daha yüksek olarak bulunmuştur($p<0,05$). Hasta grubunda apoB ile TK ve LDL-K arasında pozitif korelasyon saptanmıştır.
- PON1 paraoksonaz aktivitesi, kontrol grubunda daha yüksek olarak bulunmuştur.($p<0.01$)
- Serum MDA düzeyi, hasta grubunda daha yüksek olarak gözlenmiştir($p<0,01$)
- PON1 192 R/Q gen polimorfizmi, BB(RR) genotipi hasta grubunda, AA(QQ) genotipi ise kontrol grubunda daha fazla oranda tesbit edilmiştir($p<0.01$)

- PON1 192 B(R) allel frekansı, hasta grubunda, A(Q) allel frekansı ise kontrol grubunda daha fazla oranda saptanmıştır ($p<0,01$)
- Hasta grubunda, PON1 192 BB(RR) ve AB(RQ) genotipinde, AA(QQ) genotipine göre daha yüksek PON1 aktivitesi tesbit edilmiştir ($p<0,05$)

Bu sonuçlara göre, ateroskleroz ve buna bağlı olarak gelişen MI'dan korunmada HDL düzeyleri önemlidir. Yaptığımız çalışmada HDL'nin bu koruyucu fonksiyonu, daha çok yapısında bulunan PON1 enzimi ile gerçekleştirdiği tesbit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda belirtildiği üzere, aterosklerozdaki temel mekanizma, LDL'nin okside olarak damar duvarında bir seri inflamatuvar sitokinlerin salgılanmasıdır. PON1'in bu süreçteki görevi ise lipid peroksitlerini hidrolize ederek hem LDL hem de HDL'yi oksidasyondan korumaktır. Hasta grubunda, lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeylerinin yüksek, PON1 ve HDL-K düzeylerinin düşük olması önemlidir. Ayrıca kontrol grubunda tam tersi verilerin olması bu hipotezimizi doğrulamaktadır.

Sonuç olarak çalışmamızda MI gelişiminde, hem PON1 192 BB genotipinin hemde diğer çevresel faktörlerin (yaş, cinsiyet, sigara içimi, PON1 aktivitesi, HDL-K, apoB, MDA düzeyleri) etkili olduğu tesbit edilmiştir.

Ayrıca, HDL düzeylerini belirleyen diğer bir faktör olan CETP Taq1B gen polimorfizmi ile MI arasında herhangi bir ilişki tesbit edilememiştir. Bunun sebebi CETP geninin Taq1B dışında hem kodlayıcı hem de promotor bölgede polimorfizmlerinin varlığına bağlı olabilir. Çünkü Taq1B'nin sessiz bir mutasyon olduğu belirtilmektedir. Bu konuda kesin karar verilmesi için diğer bölge polimorfizmlerinin de araştırılması gerekmektedir.

MI morbidite ve mortalite insidansı yüksek bir hastalıktır. Bu sebeple risk altındaki kişilerin tesbiti ve tedavi edilmesi oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar sonucu, MI 'ın gen polimorfizmleri ve çevresel risk faktörleri ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Ayrıca, MI ile ilişkili gen polimorfizmlerinin, populasyonlar arası ve aynı populasyon içinde farklılıklar gösterdiği tesbit edilmiştir. Bu yüzden, Türk populasyonunda yaptığımız bu çalışmanın değerli olduğu düşüncesindeyiz. Bununla birlikte çalışmaya katılanların sayısının artırılarak, PON1 ve CETP geni ile ilgili diğer bölge polimorfizmlerinin de belirlenmesinin bu çalışmaya katkı sağlayacağı inancındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Hakan Karpuz. Hiperlipidemiye güncel yaklaşım. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri Sık Görülen Kardiyolojik sorunlarda güncelleme sempozyum dizisi No:40 Haziran 2004; s69-74.
2. World Health Organisation. World health report 1999, making difference, Geneva WHO 1999.
3. Levy D, Wilson PF, Anderson KM, Castelli WP: Stratifying the patient at risk from coronary disease: New Insights from the Framingham Heart Study. Am Heart J 1990; 119:712.
4. Neaton JD, Blackburn H, Jacobs D, et al. Serum cholesterol levels and mortality findings for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. Arch Intern Med 1992; 152: 1490-500.
5. Chen Z, Peto R, Collins R, MacMahon S, Lu J, Li W. concentration and coronary heart disease in a population with low cholesterol concentration. Br Med J 1991; 303:276-82.
6. Rosenson RS. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. Atherosclerosis. 2004; 173: 1-12.
7. Tokgözoğlu L, Özer N. Ateroskleroz patogenezi. Özcan N. Koroner kalp hastalıkları. 1. Baskı. Ankara 1997. 129-163.
8. Gordon DJ, Probstfeld JL, Garrison RJ. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American study. Circulation 1989; 37: 47-53.
9. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE: Modulation of paraoxonase (PON1) activity. Biochem Pharmacol 2005, 69(4):541-550.
10. Mackness B, McElduff P, Mackness MI: The paraoxonase-2-310 polymorphism is associated with the presence of microvascular complications in diabetes mellitus. J Intern Med 2005, 258(4):363-368.
11. Baum L, Ng HK, Woo KS, Tomlinson B, Rainer TH, Chen X, Cheung WS, Chan DK, Thomas GN, Tong CS et al: Paraoxonase 1 gene Q192R polymorphism affects stroke and myocardial infarction risk. Clin Biochem 2006, 39(3):191-195.

12. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJ, Mackness MI: Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci (Lond)* 2000, 98(3):355-363.
13. Hofer SE, Bennetts B, Chan AK, Holloway B, Karschinkus C, Jenkins AJ, Silink M, Donaghue KC: Association between PON 1 polymorphisms, PON activity and diabetes complications. *J Diabetes Complications* 2006, 20(5):322-328.
14. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol.* 1998; 31: 329-336.
15. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 473-80.
16. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraoxonase and coronary heart disease. *Atheroscler Suppl.* 2002; 3: 49-55.
17. Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today.* 1999; 5: 381-386.
18. Mackness MI, Arool S, Mackness B, Durrington PN. Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation. *The Lancet* 1997; 349: 851-2.
19. Sanghera DK, Aston CE, Saha N, Kamboh MI. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON-2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am J Hum Genet* 1998; 62:36-44.
20. Zuliani, A Cherubini, S Volpato, E Palmieri, P Mecocci and P de Rango et al., Genetic factors associated with the absence of atherosclerosis in octogenarians, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57 (2002), pp. M611–M615.
21. Chen Q, Reis SE, Kammerer CM et al: Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 13–22.
22. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, et al. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective study. *Circulation* 2003; 107 : 2775-9.

23. Jose M. Ordovas; L. Adrienne Cupples; Dolores Corella; James D. Otvos; Doreen Osgood; et al. Association of Cholesteryl Ester Transfer Protein–TaqIB Polymorphism With Variations in Lipoprotein Subclasses and Coronary Heart Disease Risk Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2000;20:1323-1329.
24. Brousseau ME, O'Connor JJ Jr, Ordovas JM, et al. Cholesteryl ester transfer protein TaqII B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of Coronary Heart disease end points in men with HDL deficiency. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2002;22: 1148-1154.
25. Skoglund-Andersson C, Ehrenborg E, Fisher RM, Olivecrona G, Hamsten A, Karpe F. Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and APO E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men. Atherosclerosis. 2003; 167: 311–317.
26. Vallance P, Chan N Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance Heart 2001;85:342-356.
27. Roos R. The Pathogenesis of Atherosclerosis. Farmer JA, Gotto AM. Dyslipidemia and Other Risk Factors for Coronary Artery Disease. In: Braunwald E, editor. Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, Vol. 2, 5th edition. W.B. Saunders Company, USA, 1997: 1105-1155.
28. Ballantyne CM, O'Keefe JH, Gotto A, Dyslipidemia Essentials, Physicians Press 2003;3-17.
29. Bhagavan NV: Plasma Lipoproteins. Medical Biochemistry. 4th edition, Harcourt Academic Press, pp.429-452, 2002.
30. Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ. Lipids, Lipoproteins, And Apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 3rd edition. W. B. Saunders Company USA. 1999; 809-861.
31. Naito HK : Coronary Artery Disease and Disorders of Lipid Metabolism. Clinical Chemistry, Editors: Lawrence Kaplan , Amadeo J. Pesce , Steven C. Kazmierczak, Mosby, 4th ed., pp.603-638, 2003.

32. Lange. Harper's Biochemistry. Lipid Taşınması ve Depolanması. Tercüme: Serhat Tokgöz. Harper Biyokimya. Ankara Nobel Tıp Kitabevleri 25. Baskı. 268-285.
33. Williams Textbook of Endocrinology (1998)
34. Zannis VI, Cole FS, Jackson CL, Kurnit DM, Karathanasis SK (1985) Distribution of apolipoprotein A-I, C-II, C-III, and EmRNA in fetal human tissues. Time-dependent induction of apolipoprotein E mRNA by cultures of human monocytemacrophages. *Biochemistry* 24:4450–4455.
35. Walldius G., Jungner I. The apoB/apoA-I ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy– a review of the evidence *Journal of Internal Medicine* 2006; 259: 493–519.
36. Roheim PS, Asztalos BF: Clinical significance of lipoprotein size and risk for coronary atherosclerosis. *Clin Chem* 1995;41:147-152.
37. Eggerman TL, Hoeg JM, Meng MS, Tombragel A, Bojanovski D, Brewer HB, Jr.. Differential tissue-specific expression of human apoA-I and apoA-II. *J Lipid Res* 1991;32:821-8.
38. Brewer HB, Jr., Ronan R, Meng M, Bishop C. Isolation and characterization of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV. *Methods Enzymol* 1986;128:223-46.
39. Brewer HB, Jr., Lux SE, Ronan R, John KM. Amino acid sequence of human apoLp-Gln-II (apoA-II), an apolipoprotein isolated from the high-density lipoprotein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1972;69:1304-8.
40. Lusis AJ, Taylor BA, Wangenstein RW, Leboeuf RC. Genetic control of lipid transport in mice. II. Genes controlling structure of high density lipoproteins. *J Biol Chem* 1983;258:5071-8.
41. Lackner KJ, Law SW, Brewer HB, Jr., Sakaguchi AY, Naylor SL. The human apolipoprotein A-II gene is located on chromosome 1. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:877-83.
42. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Fruchart JC, Staels B, et al. Fibrates increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the peroxisome proliferatoractivated receptor. *J Clin Invest* 1995;96:741-50.
43. Fruchart JC, Duriez P, Staels B. Molecular mechanism of action of the fibrates. *J Soc Biol* 1999;193:67-75.

44. Vu-Dac N, Schoonjans K, Kosykh V, Dallongeville J, Heyman RA, Staels B, et al. Retinoids increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the retinoid X receptor but not the retinoic acid receptor. *Mol Cell Biol* 1996;16:3350-60.
45. Vu-Dac N. Regulation of human apo A-II promoter by the orphan receptor ROR- α is mediated through PPAR- α acting as a docking factor. *Circulation* AD/1/1;102 supplement.
46. Kan HY, Pissios P, Chambaz J, Zannis VI. DNA binding specificity and transactivation properties of SREBP-2 bound to multiple sites on the human apoA-II promoter. *Nucleic Acid Res* 1999;27:1104-17.
47. Jahn CE, Osborne JC, Schaefer EJ, Brewer HB. Activation of the enzymic activity of hepatic lipase by apolipoprotein A-II. Characterization of a major component of high density lipoprotein as the activating plasma component in vitro. *Eur J Biochem* 1983;131:25-9.
48. Shinomiya M, Sasaki N, Barnhart RL, Shirai K, Jackson RL. Effect of apolipoproteins on the hepatic lipase-catalyzed hydrolysis of human plasma high density lipoprotein2-triacylglycerols. *Biochim Biophys Acta* 1982;713:292-9.
49. Mowri HO, Patsch JR, Gotto AM, Patsch W. Apolipoprotein AII influences the substrate properties of human HDL2 and HDL3 for hepatic lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:755-62.
50. Zhong S, Goldberg IJ, Bruce C, Rubin E, Breslow JL, Tall A. Human ApoA-II inhibits the hydrolysis of HDL triglyceride and the decrease of HDL size induced by hypertriglyceridemia and cholesteryl ester transfer protein in transgenic mice. *J Clin Invest* 1994;94:2457-67.
51. Lagrost L, Dengremont C, Athias A, de Geitere C, Fruchart JC, Lallemant C, et al. Modulation of cholesterol efflux from Fu5AH hepatoma cells by the apolipoprotein content of high density lipoprotein particles. Particles containing various proportions of apolipoproteins A-I and A-II. *J Biol Chem* 1995;270:13004-9.
52. Durbin DM, Jonas A. The effect of apolipoprotein A-II on the structure and function of apolipoprotein A-I in a homogeneous reconstituted high density lipoprotein particle. *J Biol Chem* 1997;272:31333-9.

53. Durbin DM, Jonas A. Lipid-free apolipoproteins A-I and A-II promote remodeling of reconstituted high density lipoproteins and alter their reactivity with lecithin:cholesterol acyltransferase. *J Lipid Res* 1999;40:2293-302.
54. Labeur C, Lambert G, Van Cauteren T, Duverger N, Vanloo B, Chambaz J, et al. Displacement of apo A-I from HDL by apo AII or its C-terminal helix promotes the formation of pre-beta1 migrating particles and decreases LCAT activation. *Atherosclerosis* 1998;139:351-62.
55. Mowri HO, Patsch W, Smith LC, Gotto AM, Jr., Patsch JR. Different reactivities of high density lipoprotein subfractions with hepatic lipase. *J Lipid Res* 1992;33:1269-79.
56. Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 2026–33.
57. Lagrost L, Persegol L, Lallemand C, Gambert P. Influence of apolipoprotein composition of high density lipoprotein particles on cholesteryl ester transfer protein activity. Particles containing various proportions of apolipoproteins AI and AII. *J Biol Chem* 1994;269:3189-97.
58. Stein EA, Myers GL. Lipids, lipoproteins And Apolipoproteins. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. 2nd edition, W.B. Saunders Company, USA, 1994; 1002-1081.
59. Jain, R.S., Quarfordt, S.H. : The Carbohydrate Content of Apolipoprotein E from Human Very Low Density Lipoproteins. *Life Sciences*. 1979; 25:1315-1324.
60. Ashwell, G., Morell, A.G.: The Role of Surface Carbohydrates in the Hepatic Recognition and Transport of Circulating Glycoproteins. *Adv.Enzymol.* 1974; 41:99-128.
61. Wang C, McConathy WJ, Kloer HU, Alaupovic P: Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. *J Clin Invest* 1985;75:384-90
62. Sehayek E, Eisenberg S: Mechanisms of inhibition by apolipoprotein C of apolipoprotein E-dependent cellular metabolism of human triglyceride-rich

- lipoproteins through the low-density lipoprotein receptor pathway. *J Biol Chem* 1991;266:18259-67
63. Uiterwaal CSPM, Grobbee DE, Witteman JCM, et al: Postprandial triglyceride response in young adult men and familial risk for coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1994;121:576-83.
 64. Ginsberg HN, Jones J, Blaner WS, et al.: Association of postprandial triglyceride and retinyl palmitate responses with newly diagnosed exercise-induced myocardial ischemia in middle-aged men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:1829-38.
 65. Sacks FM, Alaupovic P, Moya LA, et al: VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial, *Circulation* 2000;102:1886-92.
 66. Luc G, Fievet C, Arveiler D, et al: Apolipoproteins C- III and E in apo-B- and non-apo-B-containing lipoproteins in two populations at contrasting risk for myocardial infarction: the ECTIM study. *J Lipid Res* 1996;37:508-17.
 67. Eichinger A., Nasreen A., Kim H. J., and Skerra A. Structural insight into the dual ligand specificity and mode of high density lipoprotein association of apolipoprotein D. *J Biol Chem.* 2007 Oct 19;282(42):31068-75.
 68. Rassart, E., A. Bedirian, S. Do Carmo, O. Guinard, J. Sirois, L. Terrisse, and R. Milne. Apolipoprotein D. *Biochim Biophys Acta* 2000,1482: 185-198.
 69. Skerra, A. 2000. Lipocalins as a scaffold. *Biochim Biophys Acta* 1482: 337-350.
 70. Yang, Q., T. E. Graham, N. Mody, F. Preitner, O. D. Peroni, J. M. Zabolotny, K. Kotani, L. Quadro, and B. B. Kahn. Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nature* 2005,436: 356-362.
 71. Wolfrum, C., M. N. Poy, and M. Stoffel. Apolipoprotein M is required for prebeta-HDL formation and cholesterol efflux to HDL and protects against atherosclerosis. *Nat Med* 2005,11: 418-422.
 72. Ganfornina, M. D., S. Do Carmo, J. M. Lora, S. Torres-Schumann, M. Vogel, M. Allhorn, C. Gonzalez, M. J. Bastiani, E. Rassart, and D. Sanchez. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell* 2008,7: 506-515.

73. Drayna, D., C. Fielding, J. McLean, B. Baer, G. Castro, E. Chen, L. Comstock, W. Henzel, W. Kohr, L. Rhee, K. Wion, and R. Lawn. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *The Journal of biological chemistry* 1986,261: 16535-16539.
74. Seguin, D., M. Desforges, and E. Rassart. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Brain Res Mol Brain Res* 1995,30: 242-250.
75. McConathy, W. J., and P. Alaupovic. Studies on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma. *Biochemistry* 1976,15: 515-520.
76. Lakins J, Bennett SA, Chen JH, Arnold JM, Morrissey C, Wong P, O'Sullivan J, Tenniswood M. Clusterin biogenesis is altered during apoptosis in the regressing rat ventral prostate. *J Biol Chem* 1998;273:27887–27895.
77. Kujiraoka T, Hattori H, Miwa Y, Ishihara M, Ueno T et al. Serum Apolipoprotein J in health, Coronary Heart Disease and Type 2 Diabetes Mellitus. *J. Atheroscler Thromb.* 2006, 13:314-322.
78. Caccamo AE, Scaltriti M, Caporali A, D'Arca D, Scorcioni F, Astancolle S, Mangiola M, Bettuzzi S. Cell detachment and apoptosis induction of immortalized human prostate epithelial cells are associated with early accumulation of a 45 kDa nuclear isoform of clusterin. *Biochem J* 2004;382:157–168.
79. Ishikawa Y, Akasaka Y, Ishii T, Komiyama K, Masuda S et al. Distribution and synthesis of apolipoprotein J in the atherosclerotic aorta arterioscler thromb *Vasc Biol*, 1998; 18: 665-672.
80. Wilson, M. R.; Easterbrook-Smith, S. B. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem. Sci.* 2000;25:95–98.
81. Michel D., Chatelain G., North S., Brun G. Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem. J.* 1997;328:45–50.
82. Viard I, Wehrli P, Jornot L, Bullani R, Vechietti JL, Schifferli JA, Tschopp J, French LE. Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress. *J Invest Dermatol* 1999;112:290–296.

83. Mc Gill HC: The Pathogenesis of Atherosclerosis. Clin Chem 1988; 34-8 (B): B33-B39.
84. G. Walldius, I.Jungner. Apolipoprotein B and apolipoprotein A-I: risk indicators of coronary heart disease and targets for lipid-modifying therapy. J Intern Med. 2004 Feb;255(2):188-205.
85. Sniderman AD, Furberg CD, Keech A et al. Apolipoproteins versus lipids as indices of coronary risk and as targets for statin treatment. Lancet 2003; 361: 777–80.
86. Mahley RW. Apolipoprotein E : Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. Science 1988;240: 622-30.
87. Weisgraber KH., Innerarity TL., Harder KJ, et al. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E . Monoclonal antibody inhibition of binding. J Biol Chem 1983; 258 / 20: 12348-54.
88. Zannis VI, Breslow JL. Human very low density lipoprotein Apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. Biochemistry 1981;20:1033-41.
89. Lenzen HJ., Assman G, Buckwalsky R, Schulte H. Association of apolipoprotein E polymorphism, low density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease. Clin Chem 1986;32 / 5: 778-81.
90. Braeckman L, De Bacquer D, Rosseneu M, De Bacquer G. Apolipoprotein E polymorphism in middle-aged Belgian men : phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins. Atherosclerosis 1996;120: 67-73.
91. Davignon J, Greeg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis . Atherosclerosis 1988;8:1-21.
92. Hixson JE and the Pathological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group: Apolipoprotein E polymorphism affect atherosclerosis in young males. Arterioscler Thromb 1991;11 :1237-44.
93. Murray, Peter A.Mayes, Daryl K. Granner, Victor W. Rodwell, Appleton & Lange, Çevirenler: Gülriz Mentep, Biltan Ersöz, 22.baskı, Barış Kitabevi, pp.292-326,1993.
94. Kaplan LA, Pesce AJ,Kamierczak SC.Clinical Chemistry. Mosby Publishers, Fourth Edition, Chapter 33,2003.

95. Baynes J, Dominiczah MH. Medical Biochemistry. Mosby, 1999.
96. Jackson RC, Gotto AM. Phospholipids in biology and medicine. N.Eng.J.Med.1974;290:24-9.
97. Carr, A. C., McCall, M. R., Frei, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000, 20,1716-1723.
98. Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland.(1996).
99. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları. Konya. (1995).
100. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. W.B. Saunders Company. Philadelphia Pennsylvania.1995:88-91.
101. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania(1999).
102. Binder CJ, Chang M, Shaw PX, Miller YI, Hartvigsen K et al.: Innate and acquired immunity in atherogenesis. Nature Medicine 2002; Vol 8, Number 11:1218-1226.
103. Steinberg D: Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. Nature Medicine 2002; Vol 8 Number 11:1211-1217.
104. Cushing, S. D., Berliner, J. A., Valente, A. J., Territo, M. C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C. J., Fogelman, A. M. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990;87,5134-5138.
105. Roland Stocker and John F. Keaney, JR. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis Physiol Rev 2004;84:1381–1478.
106. Boulanger, C. M., Tanner, F. C., Bea, M. L., Hahn, A. W., Werner, A., Luscher, T. F. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. Circ. Res. 1992;70:1191-1197.

107. Liao, J. K., Shin, W. S., Lee, W. Y., Clark, S. L. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.* 1995;270:319-324.
108. Thorin, E., Hamilton, C. A., Dominiczak, M. H., Reid, J. L. Chronic exposure of cultured bovine endothelial cells to oxidized LDL abolishes prostacyclin release. *Arterioscler. Thromb.* 1994;14:453-459.
109. Penn, MS, Cui MZ, Winokur AL, et al. Smooth muscle cell surface tissue factor pathway activation by oxidized low-density lipoprotein requires cellular lipid peroxidation. *Blood.* 2000;96:3056-3063.
110. Ishii, H., Kizaki, K., Horie, S., Kazama, M. Oxidized low density lipoprotein reduces thrombomodulin transcription in cultured human endothelial cells through degradation of the lipoprotein in lysosomes. *J. Biol. Chem.* 1996;271:8458-8465.
111. Wilson, B. D., Pitas, R. E., Rodgers, G. M. Regulation of endothelial cell protein C activation by native and oxidized low density lipoprotein. *Semin. Thromb. Hemost.* 1992;18,11-17.
112. Kugiyama, K., Sakamoto, T., Misumi, I., et al. Transferable lipids in oxidized low-density lipoprotein stimulate plasminogen activator inhibitor-1 and inhibit tissue-type plasminogen activator release from endothelial cells. *Circ. Res.* 1993;73:335-343.
113. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation* 2000; 101: 2510-17.
114. Heijmans BT, Westendorp RGJ, Lagaay AM, Knook DL, Kluft C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis*, 2000; 149: 91-7.
115. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:551–61.

116. Brushia E, Montali A, Vega GL, Grundy SM Production of recombinant proteins using multiple-copy gene integration in high60 cell-density fermentations of *Ralstonia eutropha*. *Biotechnol Bioeng*. 2003 Oct 5;84(1):114-20.
117. B. Chappey; B. Beyssen; E. Foos; F. Ledru; J. L. Guernonprez; J. C. Gaux; ; I. Myara Sialic Acid Content of LDL in Coronary Artery Disease *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1998;18:876-883.
118. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986;123-34. 18. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*1991;88:1785.
119. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol* 1993;71:9.
120. Lyons TJ. Oxidized low density lipoproteins:a role in the pathogenesis of atherosclerosis in diabetes. *Diabetes Med* 1991;8:411.
121. Tertov VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Characterization of desialylated low density lipoproteins which cause intracellular lipid accumulation. *Int J Tiss Reac* 1992;14:155.
122. Tertov VV, Sobenin IA, Gabbasov SA, et al. Multiple modified desialylated low density lipoproteins that cause intracellular lipid accumulation. Isolation, fractionation and characterization. *Lab Invest* 1992;67:665.
123. Sönmez H, Sür S, Ulutin T, Kökoğlu E, Üçışık N. The relationship of various factors in the pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Appl Thrombosis/ Hemostasis* 1998; 4(2):105-10.
124. Bowie A, Owens D, Collins P, et al: Glycosylated low density lipoprotein is more sensitive to oxidation: Implications for the diabetic patient? *Atherosclerosis* 102: 63-67, 1993.
125. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani B ,Cantin S : Small dense low- density lipoprotein particles as a predictor of ischemic heart disease in men. *Circulation* 1997;95:69-75.
126. Mohan V, Deepa R, et al.: Association of small dense LDL with coronary artery disease and diabetes in urban Asian Indians- The Chennai Urban Epidemiology Study (CURES 8). *J Assoc Physcians India* 2005;53:95-100.

127. Packard CJ: Triacylglycerol- rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. *Biochemical Society Transactions* 2003; 31(5):1066-1069.
128. Berneis K, Rizzo M: LDL size: does it matter? *Swiss Med Wkly* 2004;134:720-724.
129. Landray MJ, Sagar G, Muskin J, Murray S, Holder RL, Lip GYH : Association of atherogenic low density lipoprotein subfractions with carotid atherosclerosis, *Q J Med* 1998; 91:345-351.
130. Deric M: Pathophysiology and Clinical Significance of Atherogenic Lipoprotein Phenotype and Small Dense LDL Particles. *Jugoslav Med Biochem* 2003;22:101-107.
131. Brown ML, Hesler C, Tali AR: Plasma enzymes and transfer proteins in cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 1990;1:122-127.
132. Krieger M: Scavenger receptor class B type 1 is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 2001;108:783-7.
133. Silver DL, Tali AR: The cellular biology of scavenger receptor class B type 1. *Curr Opin Lipidol* 2001;12:497-504.
134. Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR: Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility in atherosclerosis. *J Lipid Res*, 2001;42:1717-26.
135. Oram JF, Lawn RM: ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res* 2001;42:1173-9.
136. Santamarina-Fojo S, Remaley AT, Neufeld EB, Brever HB, Jr: Regulation and intracellular trafficking of the ABCA1 transporter. *J Lipid Res* 2001;42:1339-45.
137. Acton S, Rigotti A, Landschultz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M; Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996;271:518-20.
138. Fielding CJ: Caveolae and signaling. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12:281-7.
139. Fielding CJ, Fielding PE: Caveolae and intracellular trafficking of cholesterol. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;49:251-64.

140. Fidge NH: High density lipoprotein receptors, binding proteins and ligands. *J Lipid Res* 1999;40:187-201.
141. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, et al: Scavenger receptor B1 promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem* 1997;272:20982-5.
142. Francis GA, Knopp RH, Oram JF: Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier disease. *J Clin Invest* 1995;96:78-87.
143. Owen JS, Mulcahy JV: ATP-binding cassette A1 protein and HDL homeostasis. *Atherosclerosis* 2002;(suppl)3:13-22.
144. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebsich G, Luciani MF, Chimini G, et al: Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257(1):29-33.
145. Repa J J, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, et al: Regulation of absorption and ABC1 -mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000;289:1524-9.
146. Vaisman BL, Lambert G, Amar M, Joyce C, Ito T, Shamburek RD, et al: ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest* 2001;108:303-9.
147. Joyce CW, Amar MJA, Lambert G, Vaisman BL Paigan B, Najib- Fruchart J, et al: The ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1) modulates the development of aortic atherosclerosis in C57BL/6 and apoE-knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:407-12.
148. Aiello RJ, Brees D, Bourassa P-A, Royer L, Lindsey S, Coskran T, et al: Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:630.
149. Van Eck M, Bos IS, Kaminski WE, Orso E, Rothe G, Tvvisk J- et al: Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:6298-303.

- a. Gugliucci A, Mehlhaff K, Kinugasa E, et al. Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: Correlation with low molecular AGE adduct clearance. *Clinica Chimica Acta* 2007; 377: 213-220.
- 150.** Cho KH, Park SH, Park JE. The function, composition, and particle size of high-density lipoprotein were severely impaired in an oliguric phase of hemorrhagic fever with renal syndrome patients. *Clinical Biochemistry* 2008; 4: 56-64.
- 151.** Mainar JMA, Navarro MA, Carnicer R, et al. Accelerated atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice fed Western diets containing palm oil compared with extra virgin olive oils: A role for small, dense high-density lipoproteins. *Atherosclerosis* 2007; 194: 372-382.
- 152.** Brites F, Zago V, Verona J, Muzzio ML, Wikinski R, Schreier L. HDL capacity to inhibit LDL oxidation in well-trained triathletes. *Life Sciences* 2006; 78: 3074-3081.
- 153.** Tanimoto N, Kumono Y, Suehiro T. Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life Sciences* 2003; 72: 2877-2885.
- 154.** Negre-Salvayre N, Dousset N, Ferretti G, Bacchetti T, Curatola G, Salvayre R. Antioxidant and cytoprotective properties of high-density lipoproteins in vascular cells. *Free Radical Biology & Medicine* 2006; 41: 1031-1040.
- 155.** Gülcü F, Gürsü MF. Yöntem Bildirisi: Paraoksonaz ve Aril Esteraz Aktivite Ölçümlerinin Standardizasyonu. *Türk Biyokimya Dergisi* 2003; 28(2): 45-49.
- 156.** Ng CJ, Hama SY, Bourquard N, Navab M, Reddy ST. Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Molecular Genetics and Metabolism* 2006; 89: 368-373.
- 157.** Bayrak T, Bayrak A, Demirpençe E, Kılınç K. Yeni bir kardiovasküler belirteç adayı: paraoksonaz. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005; 36: 147-151.
- 158.** Mahley RW, Bersot TP. Low levels of high-density lipoproteins in the Turkish Population: A risk factor for coronary artery disease. *Türk Kardiyoloji Dern Arş* 1999; 27: 37-43.

159. Tokgözoğlu L: Türk erişkinlerinde lipid, şipoprotein ve apolipoproteinler. Onat A(Ed.) TEKHARF: Yüzyıl Dönümünde Türk Erişkinlerinde Koroner Risk Haritası ve Koroner Kalp Hastalığı. Argos iletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret A.Ş., 2001,s:37-49.
160. Sparrovv CP, Baffic J, Lam M-H, Lund EĞ, Adams AD, Fu X, et al: A potent synthetic LXR agonist is more effective than cholesterol loading at inducing ABCA1 mRNA and stimulating cholesterol efflux. J Biol Chem 2002;277:10021-7.
- 161.Berg K. New serum type system in man: the Lp system. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 1963; 59:369-382.
162. MBewu AD, Durrington PN. Lipoprotein (a): Structure, properties and possible involmment in thrombogenesis and atherogenesis. Atherosclerosis.1990;85:1-14.
163. Alridge WN. Serum esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-Esterase of mammalian sera. Biochem J. 1943; 53(1): 117-124.
164. Timchalk C, Poet TS, Kousba AA. Age-dependent pharmacokinetic and pharmacodynamic response in preweanling rats following oral exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. Toxicology 2006; 220:13-25.
165. Erden İ. ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü (Stemi) Hastalarda İnsan Paraoxonase Geni Met-Leu/55 Polimorfizmi. Sağlık Bakanlığı Dr. Siyami Ersek Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Merkezi, Uzmanlık Tezi İstanbul, 2004.
166. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human Serum Paraoxonase, Gen. Pharmac. 1998; 31(3): 329-336.
167. Nug CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST: The paraoxonase gene family and atherosclerosis. Free Radic Biol Med 2005, 38(2):153-163.
168. Juretic D, Motejlkova A, Kunovic B, Rekic B, Flegar-Mestric Z, Vujic L, Mesic R, Lukac-Bajalo J, Simeon-Rudolf V: Paraoxonase/arylesterase in serum of patients with type II diabetes mellitus. Acta Pharm 2006, 56(1):59-68.
169. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ: On the physiological role(s) of the paraoxonases. Chem Biol Interact 1999, 119-120:379-388.

170. Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, Joven J, Camps J: Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radic Biol Med* 2008, 45(2):146-157.
171. Eckerson HW, Romson J, Wyte C, La Du BN: The human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their response to salts. *Am J Hum Genet* 1983, 35(2):214-227.
172. Eckerson HW, Wyte CM, La Du BN: The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet* 1983, 35(6):1126-1138.
173. Başkol G, Köse K. Paraoksonaz: Biyokimyasal Özellikleri, Fonksiyonları ve Klinik Önemi. *Erciyes Tıp Dergisi* 2004; 26(2): 75-80.
174. Ekmekçi ÖB, Donma O, Ekmekçi H. Paraoksonaz. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004; 35 (2): 78-82.
175. Bayrak T, Bayrak A, Demirpençe E, Kılınç K. Yeni bir kardiyovasküler belirteç adayı: paraoksonaz. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2005; 36:147-151.
176. Aviram M, Rosenblat M, Scott B, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CI, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad Biol & Med* 1999; 26: 892-904.
177. Uzun N. Diabetik Hastalarda Eritrosit Membran Enzimi Na⁺, K,ATPazın Aktivitesinin Ölçülmesi Karakterizasyonu. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi Erzurum, 2003.
178. Esparragón FR, Trujillo YH, Reyes AM, et al. Concerning the Significance of Paraoxonase-1 and SR-B1 Genes in Atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol* 2006; 59(2):154-156.
179. Rael LT, Bar-Or R, Aumann RM, Slone DS, Mains CW, Bar-Or D. Oxidation–reduction potential and paraoxonase–arylesterase activity in trauma patients. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2007; 361: 561-565.
180. Fere N, Tous M, Paul A, et al. Paraoxonase Gln-Aln(192) and Leu-Met(55) gene polymorphisms and enzyme activity in a population with a low rate of coronary heart disease. *Clinical Biochemistry* 2002; 35: 197-203.

181. Yılmaz G. Atorvastatin Kullanan Dislipidemi Hastalarında Tedavi Öncesi ve 3 Ay Sonrası Serum Paraoksonaz-1 ve Okside LDL Düzeyleri. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü Uzmanlık Tezi İstanbul, 2008.
182. Khaschsorur GA, Winklhofer-Roob BM, Rabl H. Th.Auer Evaluation of a Sensitive HPLC Method for the Determination of Malondialdehyde, and application of the Method to Different Biological Materials *Chromatographia* 2000;52,181-184.
183. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM: Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21(4):542-547.
184. Yang X, Gao Y, Zhou J, Zhen Y, Yang Y, Wang J, Song L, Liu Y, Xu H, Chen Z et al: Plasma homocysteine thiolactone adducts associated with risk of coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 2006, 364(1-2):230-234.
185. Rothem L, Hartman C, Dahan A, Lachter J, Eliakim R, Shamir R. Paraoxonases are associated with intestinal inflammatory diseases and intracellularly localized to the endoplasmic reticulum. *Free Radical Biology & Medicine* 2007; 43: 730-739.
186. Teiber JF, Billecke SS, La Du BN, Draganov DI. Estrogen esters as substrates for human paraoxonases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2007; 46: 124-129.
187. Esparragón FR, Trujillo YH, Reyes AM, et al. Concerning the Significance of Paraoxonase-1 and SR-B1 Genes in Atherosclerosis. *Rev Esp Cardiol* 2006; 59(2):154-156.
188. Bargota RS, Akhtar M, Biggadike K, Gani D, Allemann RK. Structure-Activity Relation on Human Serum Paraoxonase (PON 1) Using Substrate Analogues and Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13: 1623-1623.

189. Heijmans BT, Westendorp RGJ, Lagaay AM, Knook DL, Kluft C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis*, 2000; 149: 91-7.
190. Aviram M, Rosenblat M, Bisgair CL. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-90.
191. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1067-73.
192. Hennekens C, Buring J, Manson J, Stampfer M, Rosner B, Cook N. Lack of effect of longterm supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasm and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996;334:1145–1159.
193. Catapano A, Maggi F, Tragni E. Low density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol*. 2000;15:355–363.
194. Mackness B, Durrington PN, Abuashia B, Boulton AJ, Mackness MI: Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin Sci (Lond)* 2000, 98(3):355-363.
195. Van Lenten BJ, Hama SY, De Beer FC, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J. Clin. Invest*. 1995;96: 2758–67.
196. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:330-5.
197. Voetsch B, Benke KS, Panhuysen CI, Damasceno BP, Loscalzo J: The combined effect of paraoxonase promoter and coding region polymorphisms on the risk of arterial ischemic stroke among young adults. *Arch Neurol* 2004, 61(3):351-356.
198. Akcay YD, Sagin FG, Sendag F, Oztekin K, Sozmen EY: Effects of estrogen-only therapy on LDL oxidation in women with hysterectomy: does paraoxonase genotype play a role? *Maturitas* 2006, 53(3):325-332.

199. Sarandol E, Safak O, Dirican M, Uncu G: Oxidizability of apolipoprotein B-containing lipoproteins and serum paraoxonase/arylesterase activities in preeclampsia. *Clin Biochem* 2004, 37(11):990-996.
200. Tomas M, Senti M, Elosua R, Vila J, Sala J, Masia R, Marrugat J: Interaction between the Gln-Arg 192 variants of the paraoxonase gene and oleic acid intake as a determinant of high-density lipoprotein cholesterol and paraoxonase activity. *Eur J Pharmacol* 2001, 432(2-3):121-128.
201. Leviev I, James RW: Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000, 20(2):516-521.
202. James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Garin MC: Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000, 49(8):1390-1393.
203. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Jarvik GP, Furlong CE: Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 2001, 11(1):77-84.
204. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE: Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 2001, 68(6):1428-1436.
205. Schmidt H, Schmidt R, Niederkorn K, Gradert A, Schumacher M, Watzinger N, Hartung HP, Kostner GM: Paraoxonase PON1 polymorphism leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian Stroke Prevention Study. *Stroke* 1998, 29(10):2043-2048.
206. Leviev I, Negro F, James RW: Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA. An explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997, 17(11):2935-2939.
207. Akhmedova SN, Yakimovsky AK, Schwartz EI: Paraoxonase 1 Met--Leu 54 polymorphism is associated with Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 2001, 184(2):179-182.

208. Malin R, Jarvinen O, Sisto T, Koivula T, Lehtimäki T: Paraoxonase producing PON1 gene M/L55 polymorphism is related to autopsy-verified artery-wall atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2001, 157(2):301-307.
209. Fortunato G, Rubba P, Panico S, Trono D, Tinto N, Mazzaccara C, De Michele M, Iannuzzi A, Vitale DF, Salvatore F et al: A paraoxonase gene polymorphism, PON 1 (55), as an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women. *Atherosclerosis* 2003, 167(1):141-148.
210. Leveiv I, Deakin S, James RW: Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J Lipid Res* 2001, 42(4):528-535.
211. Furlong CE, Cole TB, Jarvik GP, Costa LG: Pharmacogenomic considerations of the paraoxonase polymorphisms. *Pharmacogenomics* 2002, 3(3):341-348.
212. Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE: The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nat Genet* 1996, 14(3):334-336.
213. Costa LG, Cole TB, Jarvik GP, Furlong CE: Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu Rev Med* 2003, 54:371-392.
214. Hu Y, Tian H, Liu R: Gln-Arg192 polymorphism of paraoxonase 1 is associated with carotid intima-media thickness in patients of type 2 diabetes mellitus of Chinese. *Diabetes Res Clin Pract* 2003, 61(1):21-27.
215. Voetsch B, Benke KS, Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo J: Paraoxonase 192 Gln-->Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. *Stroke* 2002, 33(6):1459-1464.
216. Imai Y, Morita H, Kurihara H, Sugiyama T, Kato N, Ebihara A, Hamada C, Kurihara Y, Shindo T, Oh-hashii Y et al: Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 2000, 149(2):435-442.
217. Kondo I, Yamamoto M: Genetic polymorphism of paraoxonase 1 (PON1) and susceptibility to Parkinson's disease. *Brain Res.* 1998, 806(2):271-273.

218. Odawara M, Tachi Y, Yamashita K: Paraoxonase polymorphism (Gln192-Arg) is associated with coronary heart disease in Japanese noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997, 82(7):2257-2260.
219. Wheeler JG, Keavney BD, Watkins H, Collins R, Danesh J: Four paraoxonase gene polymorphisms in 11212 cases of coronary heart disease and 12786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet*. 2004, 363(9410):689-695.
220. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanche H, Passa P, Froguel P, Ruiz J: Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest* 1997, 99(1):62-66.
221. Mackness M, Durrington P, Mackness B: Paraoxonase 1 activity, concentration and genotype in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2004, 15(4):399-404.
222. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Durrington PN: Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Lett* 1998, 423(1):57-60.
223. Mackness M, Mackness B: Paraoxonase 1 and atherosclerosis: is the gene or the protein more important? *Free Radic Biol Med* 2004, 37(9):1317-1323.
224. Humbert R, Adler DA, Disteche CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE: The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993, 3(1):73-76.
225. Mutch E, Daly AK, Williams FM: The Relationship between PON1 phenotype and PON1-192 genotype in detoxification of three oxons by human liver. *Drug Metab Dispos* 2007, 35(2):315-320.
226. Azizi F, Raiszadeh F, Solati M, Etemadi A, Rahmani M, Arabi M: Serum paraoxonase 1 activity is decreased in thyroid dysfunction. *J Endocrinol Invest* 2003, 26(8):703-709.
227. Senti M, Tomas M, Fito M, Weinbrenner T, Covas MI, Sala J, Masia R, Marrugat J: Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88(11):5422-5426.

228. Biasioli S, Schiavon R, Petrosino L, De Fanti E, Cavalcanti G, Battaglia P, Fasolin A: Paraoxonase activity and paraoxonase 1 gene polymorphism in patients with uremia. *ASAIO J* 2003, 49(3):295-299.
229. Tanimoto N, Kumon Y, Suehiro T, Ohkubo S, Ikeda Y, Nishiya K, Hashimoto K: Serum paraoxonase activity decreases in rheumatoid arthritis. *Life Sci* 2003, 72(25):2877-2885.
230. Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R, Brophy VH, Margolin S, Rieder M, Nickerson D, Schellenberg GD et al: Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23(8):1465-1471.
231. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI: Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001, 21(9):1451-1457.
232. Mackness B, Durrington P, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M: Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 2003, 107(22):2775-2779.
233. Zintzaras E, Hadjigeorgiou GM: Association of paraoxonase 1 gene polymorphisms with risk of Parkinson's disease: a meta-analysis. *J Hum Genet* 2004, 49(9):474-481.
234. Delgado Alves J, Ames PR, Donohue S, Stanyer L, Nourooz-Zadeh J, Ravirajan C, Isenberg DA, Noorouz-Zadeh J. Antibodies to highdensity lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome, *Arthritis Rheum.* 2003 Jan;48(1):284.
235. Steinberg D, Clinical trials of antioxidants in atherosclerosis: are we doing the right thing? *Lancet* 1995, 346:36-38.
236. Barter PJ, Kastelein JP. Targeting Cholesteryl Ester Transfer Protein for the Prevention and Management of Cardiovascular Disease *Journal of the American College of Cardiology* 2006;47(3): 492-499.

237. Özsait B, Kömürcü-Bayrak E, Poda M, Can G, Hergenç G, Onat A. CETP TaqIB polymorphism in Turkish adults: association with dyslipidemia and metabolic syndrome. *Anadolu Kardiyol Derg* 2008; 8: 324-30.
238. Chung BH, Segrest JP, Franklin F. In vitro production of beta-very low density lipoproteins and small, dense low density lipoproteins in mildly hypertriglyceridemic plasma: role of activities of lecithin: cholesterol acyltransferase, cholesteryl ester transfer proteins and lipoprotein lipase. *Atherosclerosis* 1998;141:209–25.
239. Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999;145:227–38.
240. Davidson MH, Maki K, Umporowicz D, Wheeler A, Rittershaus C, Ryan U. The safety and immunogenicity of a CETP vaccine in healthy adults. *Atherosclerosis* 2003;169:113–20.
241. De Grooth GJ, Kuivenhoven JA, Stalenhoef AF, et al. Efficacy and safety of a novel cholesteryl ester transfer protein inhibitor, JTT-705, in humans: a randomized phase II dose-response study. *Circulation* 2002;105:2159–65.
242. Kuivenhoven JA, de Grooth GJ, Kawamura H, Klerkx AH, Wilhelm F, Kastelein JJP. Inhibition of cholesteryl ester transfer protein by JTT-705 in combination with pravastatin in type II dyslipidemia. *Am J Cardiol* 2005;95:1085–8.
243. Clark RW, Sutfin TA, Ruggeri RB, et al. Raising high-density lipoprotein in humans through inhibition of cholesteryl ester transfer protein: an initial multidose study of torcetrapib. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:490–7.
244. Brousseau ME, Schaefer EJ, Wolfe ML, et al. Effects of an inhibitor of cholesteryl ester transfer protein on HDL cholesterol. *N Engl J Med* 2004;350:1505–15.
245. Michael YT , Craig J , Linda Ka W.H., Richey Sharrett A., Arends VL et al. Cholesteryl ester transfer protein genetic polymorphisms, HDL cholesterol, and subclinical cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis *Atherosclerosis* 2008;(200):359–367

246. Boekholdt SM, Sacks FM, Jukema SW, Shepherd S, Freeman DJ, McMahan AD, et al. Cholesteryl ester transfer protein Taq1B variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment individual patient meta-analysis of 13,677 subjects, *Circulation*, 2005;111(3):278-87.
247. Marianne Zeller, David Masson, Michel Farnier, Luc Lorgis, Valérie Deckert et al, High Serum Cholesteryl Ester Transfer Rates and Small High-Density Lipoproteins Are Associated With Young Age in Patients With Acute Myocardial Infarction *JACC* Vol. 50, No. 20, 2007 Zeller et al. 1949 November 13, 2007:1948–55.
248. Hodoglugil U, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW, An interaction between the Taq1B polymorphism of cholesteryl ester transfer protein and smoking is associated with changes in plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in Turks, *Clin Genet* 2005;68,118-27.
249. Corbex M, Poirier O, Fumeron F, et al. Extensive association analysis between the CETP gene and coronary heart disease phenotypes reveals several putative functional polymorphisms and gene-environment interaction. *Genet Epidemiol* 2000;19:64–80.
250. Agerholm-Larsen B, Tybjaerg-Hansen A, Schnohr P, Steffensen R, Nordestgaard BG. Common cholesteryl ester transfer protein mutations, decreased HDL cholesterol, and possible decreased risk of ischemic heart disease: The Copenhagen City Heart Study. *Circulation* 2000;102:2197–203.
251. Kakko S, Tamminen M, Paivansalo M, et al. Cholesteryl ester transfer protein gene polymorphisms are associated with carotid atherosclerosis in men. *Eur J Clin Invest* 2000;30:18–25.
252. Brousseau ME, O'Connor Jr JJ, Ordovas JM, et al. Cholesteryl ester transfer protein TaqI B2B2 genotype is associated with higher HDL cholesterol levels and lower risk of coronary heart disease end points in men with HDL deficiency: Veterans Affairs HDL Cholesterol Intervention Trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1148–54.

253. Klerkx AH, Tanck MW, Kastelein JJ, et al. Haplotype analysis of the CETP gene: not TaqIB, but the closely linked -629C→A polymorphism and a novel promoter variant are independently associated with CETP concentration. *Hum Mol Genet* 2003;12:111-23.
254. Lu H, Inazu A, Moriyama Y, et al. Haplotype analyses of cholesteryl ester transfer protein gene promoter: a clue to an unsolved mystery of TaqIB polymorphism. *J Mol Med* 2003;81:246-55.
255. Schwartz SM, Heimerl RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev* 1990;70:1177-209.
256. Güney E. Doğan Normal LDL Kolesterol Düzeylerine Sahip Bireylerde Apolipoprotein Düzeyleri ve Metabolik Sendrom Varlığının Serum Lipoprotein Düzeyleri ile İlişkisi. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul -2005.
257. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO: Basic Histology, 9th ed. Appleton & Lange, 1998, p: 202-217.
258. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, et al: Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *Circ Res* 2002;91:281.
259. Luster AD: Chemokines: Chemotactic cytokines that mediate the inflammation. *N Engl J Med* 338:436, 1998.
260. Sakaguchi H, Takeya M, Suzuki H, et al: Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* 78:423, 1998.
261. Ball RY, Stower EC, Burton JH, Cary NR. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis* 1995;114:45-54.
262. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Aterosklerozun patogenezi. *Harrison İç Hastalıkları Prensipleri*, 15. edisyon. Çev ed: Sağlık Y. Nobel Tıp Kitapevleri 2004;2:1377-82.
263. Taşkıran P, Çam SF, Şekuri C, Tüzün N, Alioğlu E, Altıntaş N, Berdeli A. The relationship between paraoxanase gene Leu-Met (55) and Gln-Arg (192) polymorphisms and coronary artery disease *Arch Turk Soc Cardiol* 2009;37(7):473-478

264. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, et al. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions: PON1 esterase and peroxidase-like activities. *Circulation* 2000; 101:2510-7.
265. Dilara Kaman, Necip İlhan, Kerem Metin, Mehmet Akbulut and Bilal UstuñdagA preliminary study of human paraoxonase and PON 1 L/M 55–PON 1 Q/R 192 polymorphisms in Turkish patients with coronary artery disease. *Cell Biochem Funct* 2009; 27: 88–92.
266. Aynacıoğlu AS, Kepekci Y. The human paraoxonase Gln-Arg192 (Q/R) polymorphism in Turkish patients with coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2000;74:33-7.
267. Ramakrishnan L, Dilawar A, Ransi AA, Mukta S, Kranthi V. Paraoxonase gene Q192R & L55M polymorphisms in Indians with acute myocardial infarction & association with oxidized low density lipoprotein. *Indian J Med Res* 2010;131:522-529.
268. Tomas M, Senti M, Faria GF Vila J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20: 2113-2119.
269. Paragh G, Torocsik D, Seres I, et al. Effect of short term treatment with simvastatin and atorvastatin on lipids and paraoxonase activity in patients with hyperlipoproteinaemia. *Curr Med Res Opin.* 2004; 20:1321-1327.
270. Mohamed RH. , Karam RA, Abd El-Aziz TA. The relationship between paraoxonase1-192 polymorphism and activity with coronary artery disease *Clinical Biochemistry* 2010;43:553–558.
271. Navab M, Hama SY, Van Lenten BJ, et al. Mildly oxidized LDL induces an increased apolipoprotein J/paraoxonase ratio. *J Clin Invest* 1997;99:2005-20.
272. Bilge Özsaıt, Evrim Kömürcü-Bayrak, Mehvefl Poda, Günay Can1, Gülay Hergenç2, Altan Onat3, Steve E. Humphries4, Nihan Erginel-Ünaltuna CETP TaqIB polymorphism in Turkish adults: association with dyslipidemia and metabolic syndrome *Anadolu Kardiyol Derg* 2008; 8: 324-30.

273. Inazu A, Brown ML, Hesler CB, Agellon LB, Koizumi J, Takata K, et al. Increased high-density lipoprotein levels caused by a common cholesteryl ester transfer protein gene mutation. *N Engl J Med* 1990; 323: 1234-8
274. Hannuksela ML, Liinamaa MJ, Kesaniemi YA, Savolainen MJ. Relation of polymorphisms in the cholesteryl ester transfer protein gene to transfer protein activity and plasma lipoprotein levels in alcohol drinkers. *Atherosclerosis* 1994; 110: 35-44.
275. Mitchell RJ, Earl L, Williams J, Bisucci T, Gasiamis H. Polymorphisms of the gene coding for the cholesteryl ester transfer protein and plasma lipid levels in Italian and Greek migrants to Australia. *Hum Biol* 1994; 66: 13-25.
276. Kauma H, Savolainen MJ, Heikkila R, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, et al. Sex difference in the regulation of plasma high density lipoprotein cholesterol by genetic and environmental factors. *Hum Genet* 1996; 97: 156-62.
277. Hodoglugil U, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW. An interaction between the TaqIB polymorphism of cholesterol ester transfer protein and smoking is associated with changes in plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in Turks. *Clin Genet* 2005; 68: 118-27.
278. Boekholdt SM, Sacks FM, Jukema JW, Shepherd J, Freeman DJ, McMahon AD, et al. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB variant, high-density lipoprotein cholesterol levels, cardiovascular risk, and efficacy of pravastatin treatment: individual patient meta-analysis of 13,677 subjects. *Circulation* 2005; 111: 278-87.
279. De Grooth GJ, Klerkx AHM, Stroes ESG, Stalenhoef AFH, Kastelein JJP, Kuivenhoven JA. A review of CETP and its relation to atherosclerosis. *J Lipid Res* 2004; 45: 1967-74.
280. Bersot TP, Vega GL, Grundy SM, et al. Elevated hepatic lipase activity and low levels of high density lipoprotein in a normotriglyceridemic, nonobese Turkish population. *J Lipid Res* 1999; 40: 432-438.
281. Dogru-Abbasoglu S, Parıldar-Karpuzoglu H, Depboylu B, Naci C, Uysal M and Aykac-Toker G. I405V and TaqIB polymorphisms of the cholesteryl ester transferprotein and their relation to serum lipid and lipoprotein levels in a Turkish population *Cell Biochem Funct* 2009; 27: 76-80.

282. Fumeron F., Betoulle D. and Luc G. et al., Alcohol intake modulates the effect of a polymorphism of the cholesteryl ester transfer protein gene on plasma high-density lipoprotein and the risk of myocardial infarction. *J Clin Invest* 1995;96:1664–1671.
283. Dachet C, Poirier O, Cambien F, Chapman J, Rouis M. New functional promoter polymorphism, CETP/-629, in cholesteryl ester transfer protein (CETP) gene related to CETP mass and high density lipoprotein cholesterol levels: role of Sp1/Sp3 in transcriptional regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:507–15.
284. J Rejeb, A Omezzine, L Rebhi, I Naffeti, Kr Kchok at all. Association of the cholesteryl ester transfer protein Taq1 B2B2 genotype with higher high-density lipoprotein cholesterol concentrations and lower risk of coronary artery disease in a Tunisian population. *Archives of Cardiovascular Disease* (2008) **101**, 629—636.
285. Freeman D.J., Griffin B.A. and Holmes A.P. et al., Regulation of plasma HDL cholesterol and subfraction distribution by genetic and environmental factors. Associations between the TaqI B RFLP in the CETP gene and smoking and obesity. *Arterioscler Thromb* 1994; (14):336–344.
286. Padmaja N., Kumar RM., Balachander J. and Adithan C. Cholesteryl ester transfer protein TaqIB, -629C>A and I405V polymorphisms and risk of coronary heart disease in an Indian population *Clinica Chimica Acta* Volume 402, Issues 1-2, April 2009, Pages 139-145.
288. Lamarche B, Moorjani S, Lupien PJ et al. Apolipoprotein A-1 and B levels and the risk of ischemic heart disease during a five- year follow-up of men in the Que'bec Cardiovascular Study. *Circulation* 1996; 94: 273–8.
288. Pischon T, Girman CJ, Sacks FM, Rifai N, Stampfer MJ, Rimm EB. Non-high-density lipoprotein cholesterol and apolipoprotein B in the prediction of coronary heart disease in men. *Circulation* 2005; 112: 3375–83.
289. Sniderman AD, Barter PJ, Ballantyne CM et al. Report of the thirty person/ten country panel. ApoB versus cholesterol to estimate cardiovascular risk and to guide therapy. *J Intern Med* 2006; 259: 247–58.

290. van Lennep JE, Westerveld HT, van Lennep HWO, Zwinderman AH, Erkelens DW, van der Wall EE. Apolipoprotein concentrations during treatment and recurrent coronary artery disease events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2408–13.
291. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 2004; 364: 937–52.
292. Meisinger C, Loewel H, Mraz W, Koenig W. Prognostic value of apolipoprotein B and A-I in the prediction of myocardial infarction in middle-aged men and women: results from the MONICA/KORA Augsburg cohort study. *Eur Heart J* 2005; 26: 271–8.
293. Cremer P, Nagel D, Mann H et al. Ten-year follow-up results from the Goettingen Risk, Incidence and Prevalence Study (GRIPS): I. Risk factors for myocardial infarction in a cohort of 5790 men. *Atherosclerosis* 1997;129:221–30.
294. Westerveld HT, Roeters van Lennep JE, Roeters van Lennep HWO et al. Apolipoprotein B and coronary artery disease in women: a cross-sectional study in women undergoing their first coronary angiography. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1101–7.
295. Nissen SE et al. High-Intensity Statin Therapy Leads to Regression of Coronary Atherosclerosis. *JAMA* 2006 apr. 5; 295:1556-65.
296. St-Pierre AC, Cantin B, Dagenais GR, et al. Low-density lipoprotein subfractions and the long-term risk of ischemic heart disease in men: 13-year follow-up data from the Québec Cardiovascular Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:553–9.
297. Kulkarni KR, Markovitz JH, Nanda NC, Segrest JP. Increased prevalence of smaller and denser LDL particles in Asian Indians. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2749 –55.
298. Onat A. Risk factors and cardiovascular disease in Turkey. *Atherosclerosis* 2001; 156:1-10.
299. Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Münster Heart Study (PROCAM): Results of follow-up at 8 years. *Eur Heart J* 1998; 19(suppl A):A2-A11.

300. Johnson CL, Rifkind BM, Sempos CT, et al. Declining serum total cholesterol levels among US adults. The national health and nutrition examination surveys. JAMA 1993;269:3002-8.
301. Onat A. Türk halkında koroner kalp hastalığı sıklığının nedenleri ve bu bilginin risk değerlendirilmesi ile korunma açılarından büyük önemi. Türk Kardiyol Dern Arfl 2001; 29; 602-9.
302. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB: Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. J Biochem Mol Toxicol 2003;17: 24-38.
303. Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G: Effect of glycation of highdensity lipoproteins on their physicochemical properties and on paraoxonase activity. Acta Diabetol 2001;38: 163-169.
304. Karabina SA, Lehner AN, Frank E, Parthasarathy S, Santanam N: Oxidative inactivation of paraoxonase-implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. Biochim Biophys Acta 2005;1725: 213-221.
305. Baum L, NG HK, Woo KS, Tomlinson B, Rainer TH, Chen X, Cheung WS, Chan DK, Thomas GN, Tong CS, Wong KS: Paraoxonase 1 gene Q192R polymorphism affects stroke and myocardial infarction risk. Clin Biochem 2006;39: 191-195.
306. Rosenblat M, Karry R, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) is a more potent antioxidant and stimulant of macrophage cholesterol efflux when present in HDL than in lipoprotein-deficient serum: Relevance to diabetes. Atherosclerosis 2006;187:74-81.
307. Rosenblat M, Hayek T, Aviram M. Anti-oxidative effects of pomegranate juice (PJ) consumption by diabetic patients on serum and on macrophages. Atherosclerosis 2006;187:363-371.
308. Pajunen P, Taskinen MR, Nieminen MS, Syvanne M. Angiographic severity and extent of coronary artery disease in patients with type 1 diabetes mellitus. Am J Cardiol 2000;86:1080-1085.
309. Flekač M., Škrha J., Zídková K., Lacínová Z., Hilgertová J. Paraoxonase 1 Gene Polymorphisms and Enzyme Activities in Diabetes Mellitus Physiol. Res. 2008;57: 717-726.

310. Viigimaa M, Abina J, Zemtsovskaya G, Tikhaze A, Konovalova G, Kumskova E, Lankin V. Malondialdehyde-modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis. *Blood Pressure*. 2010;19:164–168.
311. Price JF, Mowbray PI, Lee AJ, Rumley A, et al. Relationship between smoking and cardiovascular risk factors in the development of peripheral arterial disease and coronary artery disease *European Heart Journal*. 1999; 20, 344–353.
312. Craig WY, Palomaki GE, Haddow JE. Cigarette smoking and serum lipid lipoprotein concentrations: an analysis of published data. *Br Med J*. 1989; 298: 784–8.
313. Nishio E., Watanabe Y. Cigarette Smoke Extract Inhibits Plasma Paraoxonase Activity by Modification of the Enzyme's Free Thiols *Biochemical and Biophysical Research Communications* Volume 236, Issue 2, 18 July 1997, Pages 289-293.
314. Jaouad L, De Guise C, Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, Fulop T, Payette H, Khalil A. Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis* Volume 185, Issue 1, March 2006, Pages 191-200.
315. Mercuroa G, Deiddaa M, Pirasa A, et al. Rosanoc Gender determinants of cardiovascular risk factors and diseases *Journal of Cardiovascular Medicine* 2010,11:207–220.
316. Vitale C, Miceli M, Rosano G.M.C. Gender-specific characteristics of atherosclerosis in menopausal women: risk factors, clinical course and strategies for prevention *Climacteric* 2007;10(Suppl 2):16–20.

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MYOKARD İNFARKTÜSLÜ HASTALARDA PON1 VE CETP POLİMORFİZMLERİ
VE PARAOKSONAZ ENZİM AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Vefa YANMAZ

Uzmanlık Eğitimine Başlama Tarihi: 27.07.2006

Uzmanlık Eğitimini Bitirme Tarihi : 18.08.2010

Uzmanlık Sınavı Tarihi : 18.08.2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Nuri BAKAN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Zuhal UMUDUM

Jüri Üyesi : Prof. Dr. Halil YAZGI

Prof. Dr. Ebubekir BAKAN

Tıbbi Biyokimya AD Başkanı

Ağustos-2010

ERZURUM