

TC. SAĞLIK BAKANLIĞI
HAYDARPAŞA NUMUNE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

Şef V. Dr. Sacide ATALAY

**SERUM LDL-C TAYİNİNDE İKİ DİREKT YÖNTEM İLE FRIEDEWALD
FORMÜLÜ KARŞILAŞTIRILMASI
VE KÜÇÜK, YOĞUN LDL-C ÖLÇÜM YÖNTEMİ**

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Ralfi SİNGER

İstanbul – 2006

İÇİNDEKİLER	
ÖNSÖZ	iv
KISALTMALAR	v
TABLolar, ŞEKİLLER, GRAFİKLER	viii
1-GİRİŞ VE AMAÇ	1
2- GENEL BİLGİLER	3
2.1. Plazma Lipidleri ve Lipoproteinler	3
2.1.1. Şilomikronlar	4
2.1.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler (VLDL)	5
2.1.3. Orta Dansiteli Lipoproteinler (IDL)	5
2.1.4. Düşük Dansiteli Lipoproteinler (LDL)	6
2.1.5. Yüksek Dansiteli Lipoproteinler (HDL)	8
2.1.6. Diğer Lipoprotein Fraksiyonları	9
2.1.7. Apolipoproteinler	11
2.2. Ateroskleroz ve LDL	13
2.2.1. Tanım	13
2.2.2. Aterogenezde Rol Oynayan Hücreler	15
2.2.3. Patogenez	16
2.2.4. Küçük, Yoğun LDL'nin Aterosklerozdaki Rolü	20
2.2.5. Aterosklerozda Risk Faktörleri	24
2.3. LDL-C Ölçüm Yöntemleri	25
2.3.1. Kromatografi	25
2.3.2. Elektroforez	25
2.3.3. Ultrasantrifugasyon	26
2.3.4. Friedewald Formülü	27
2.3.5. Direkt LDL-C Ölçüm Yöntemleri	28
2.3.6. Küçük, Yoğun LDL-C Tayin Yöntemleri	30
3- GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Gereç	32
3.2. Yöntem	32

4- BULGULAR VE İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	36
5- TARTIŞMA	58
6- ÖZET	66
7- SUMMARY	68
8- KAYNAKLAR	70

ÖNSÖZ

Biyokimya ve Klinik Biyokimya bölümündeki uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bizlerle aktaran, bütün zor durumlarda her zaman yanımızda olan ve tez çalışmalarımnda desteklerini esirgemeyen değerli hocam Şef Uz.V. Dr. Sacide Atalay'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

İhtisasım boyunca eğitimime gösterdikleri katkılardan dolayı Başasistanlarımız Uz . Dr. Didem Özkazanç'a, Uz. Dr. Saadet Kurçenli'ye, Uz. Dr. M. Murat Yekrek'e özellikle teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca çalışmalarımndaki yardımlarından dolayı Dr. Haluk Özkazanç'a, Dr. Fatma Kumbasar'a, Dr. Adile Aktaş'a, Dr. Nurcan Özyürek'e, Dr. Hilal Sekban'a, Dr. Hülya Gündüz'e ve beraber çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum arkadaşlarım Dr. Kiyanoş Yurttagül'e, Dr. Bülent Turhan'a, As. Düzgün Kılıç'a, As. Dilara Kahraman'a, As. Mehmet Akarsu'ya, As. Nurcan Çetin'e, Dr. Aylin Güzey'e, As. Derya Akbaba'ya, Dr. Sakine Türkmen'e ve laboratuvarında birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

KISALTMALAR

ACAT :	Açıl kolesterol açıl transferaz
ADP:	Adenin difosfat
ALP:	Aterojenik Lipoprotein Profili
APO:	Apolipoprotein
ATP III:	Adult Treatment Panel (Erişkin Tedavi Paneli)
CETP:	Kolesterol Ester Transfer Proteini
COX-2:	Siklooksijenaz-2
CRP:	C reaktif protein
CV:	Coefficient of variation (Varyasyon Katsayısı)
dLDL:	Direkt LDL
dLDL-C:	Direkt LDL Kolesterol
EGF:	Epidermal Growth Factor
FGF:	Fibroblast Derived Growth Factor
HDL:	Yüksek Dansiteli Kolesterol
HDL-C :	HDL Kolesterol
HMG-CoA:	Hidroksi metil glutaril koenzim A
ICAM-1:	İnterselüler Adhezyon Molekülü-1
KKH :	Koroner kalp hastalığı
KB:	Kan basıncı
LCAT :	Lesitin kolesterol açıl transferaz
LDL:	Düşük Dansiteli Kolesterol
LDL-C:	LDL Kolesterol
Lp(a) :	Lipoprotein (a)
LPL :	Lipoprotein Lipaz
MCP-1:	Monosit Kemotaktik Protein-1
NCEP :	National Cholesterol Education Program (Ulusal Kolesterol Eğitim Programı)
NO:	Nitrik Oksit
NMR:	Nükleer manyetik rezonans
PON 1:	Paraoksonaz
PDGF:	Platelet Derived Growth Factor

PAGE:	Poliakrilamid Jel Elektroforezi
PAI-1:	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
sdLDL:	Small dense LDL (küçük, yoğun LDL)
sdLDL-C:	Small dense LDL Kolesterol
ŞM:	Şilomikron
ŞM-C:	Şilomikron-Kolesterol
TMEH:	Tıbben müsaade edilen hata
TG:	Trigliserid
TGF-α:	Transforming Growth Factor- α
TNF-α:	Tümör nekroz faktör- α
VCAM-I:	Vascular Cell Adhesion Molecule-I
VLDL:	Çok Düşük Dansiteli Kolesterol
VLDL-C:	VLDL Kolesterol

TABLolar, ŞEKİLLER, GRAFİKLER

A- TABLolar

Tablo 1. Sentinel LDL-C'ye ait gün içi presizyon bulguları.

Tablo 2. Vitros LDL-C'ye ait gün içi presizyon bulguları.

Tablo 3. Sentinel dLDL-C ve Vitros dLDL-C'ye ait çalışma içi(within run) ve total presizyon değerlendirmesi bulguları.

Tablo 4. Sentinel LDL-C'ye ait linearite çalışmasına ait salt fark ve oransal fark değerleri.

Tablo 5. Vitros LDL-C'ye ait linearite çalışmasına ait salt fark ve oransal fark değerleri.

Tablo 6. Vitros LDL-C, Sentinel LDL-C ve Friedewald LDL-C karşılaştırma çalışmasındaki hastaların lipid parametrelerinin ortalama \pm SD değerleri ve dağılımları.

Tablo 7. Serum ve supernatant total kolesterol, TG, HDL-C, LDL-C, Apo A-I, Apo B değerlerinin karşılaştırması.

Tablo 8. Supernatantta bulunan lipid değerlerinin kadın ve erkeklere göre dağılımı.

Tablo 9. Supernatantlarda Sentinel dLDL ve Vitros dLDL ile bulunan ortalama sdLDL-C \pm SD değerleri ve dağılımları.

Tablo 10. Normolipidemik grubunda bulunan lipid değerleri.

Tablo 11. Hiper LDL-C grubunda bulunan lipid değerleri.

Tablo 12. Hipertrigliseridemi grubunda bulunan lipid değerleri.

Tablo 13. Kombine hiperlipidemi grubunda bulunan lipid değerleri.

Tablo 14. Normolipidemi ve değişik hiperlipidemi türlerinde serumda bulunan lipid parametreleri, Sentinel sdLDL-C, Vitros sdLDL-C ve % sdLDL-C (sdLDL-C'nin serum LDL-C'si içindeki yüzdesi) değerleri.

B- ŞEKİLLER

Şekil 1. LDL partikülünün yapısı. .

Şekil 2. Okside LDL'nin çöpçü reseptörler aracılığı ile kontrolsüz olarak makrofaj içine alınması ve köpük hücre oluşumu.

Şekil 3. sdLDL'nin oluşumu.

C- GRAFİKLER

Grafik 1. Sentinel LDL-C ölçüm sonuçlarının sulandırma oranlarına göre değişimi.

Grafik 2. Vitros LDL-C ölçüm sonuçlarının sulandırma oranlarına göre değişimi.

Grafik 3. Friedewald formülü ile bulunan LDL-C değerlerinin Vitros direkt LDL-C ve Sentinel direkt LDL-C ile karşılaştırılması

Grafik 4. Friedewald formülü ile bulunan LDL-C ile Vitros ile bulunan direkt LDL-C'nin kıyaslanması.

Grafik 5. Friedewald formülü ile bulunan LDL-C ile Sentinel ile bulunan direkt LDL-C'nin kıyaslanması.

Grafik 6. Sentinel LDL-C ile Vitros LDL-C'nin karşılaştırılması.

Grafik 7. Normolipidemi, hiper LDL-C, hipertrigliseridemi ve kombine hiperlipidemi gruplarında Sentinel LDL-C ile bulunan sdLDL-C değerleri.

Grafik 8. Normolipidemi, hiper LDL-C, hipertrigliseridemi ve kombine hiperlipidemi gruplarında Vitros dLDL-C ile bulunan sdLDL-C değerleri.

Grafik 9. Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum total kolesterolü arasındaki korelasyon.

Grafik 10. Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum TG'si arasındaki ilişki.

Grafik 11. Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum HDL-C arasındaki korelasyon.

Grafik 12. Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum LDL-C düzeyi arasındaki korelasyon.

Grafik 13. Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum Apo B arasındaki korelasyon.

Grafik 14. Supernatantta bulunan Vitros sdLDL-C ile serum total kolesterolü arasındaki korelasyon.

Grafik 15. Supernatantta bulunan Vitros sdLDL-C ile serum TG düzeyi arasındaki korelasyon.

Grafik 16. Vitros sdLDL-C ile serum HDL-C arasındaki korelasyon.

Grafik 17. Supernatantta bulunan Vitros sdLDL-C ile serum LDL-C arasındaki korelasyon.

Grafik 18. Supernatantta bulunan Vitros sdLDL-C ile serum Apo B arasındaki korelasyon.

1- GİRİŞ VE AMAÇ

Koroner arter hastalığı, en sık rastlanan kalp hastalığı olup özellikle gelişmiş ülkelerde ölümlerin başta gelen nedenlerindedir(1). Koroner kalp hastalığı (KKH) hemen her zaman ateroskleroz zemininde gelişir(2). Ateroskleroz, arterlerin intima tabakasında lipidler, kompleks karbonhidratlar, fibröz doku, kalsiyum ve bazı kan türevi maddelerin lokal birikimine bağlı ortaya çıkan patolojik bir durumdur.

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar serum total kolesterolü ile KKH insidansı arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur(3). Serum total kolesterolünün yaklaşık üçte ikisini oluşturan düşük dansiteli kolesterol (LDL-C), serumda bulunan kolesterolün major aterojenik bölümünü meydana getirir. Çok sayıda çalışma LDL-C düzeyinin düşürülmesinin KKH insidansını azalttığını ortaya koymuştur. Dolayısıyla KKH'nın önlenmesinde primer hedef LDL-C'nin düşürülmesidir(4,5). Buna paralel olarak, LDL-C'nin doğru ve tutarlı bir şekilde ölçümü büyük önem taşır.

LDL-C ölçümünün taşıdığı öneme karşın, rutinde kullanılan kolay ve güvenilir bir metodoloji mevcut değildir. Referans metod olan β -kantitatif ölçüm zaman alan ve pahalı bir işlemdir(5). Bu nedenle klinik laboratuvarların çoğu LDL-C'yi Friedewald formülüne göre hesaplayarak ölçmektedir(6). Friedewald formülünün β -kantitatif ölçüm ile yüksek oranda korelasyon göstermesine karşın bazı dezavantajları vardır. Toklukta alınmış numunelerde, trigliserid (TG) konsantrasyonunun 400 mg/dL'nin üzerinde olduğu durumlarda ve Tip III hiperlipoproteinemili hastalarda bu formülün kullanılması uygun değildir(6,7,8). Bu formülde üç ayrı parametrenin (total kolesterol, yüksek dansiteli kolesterol (HDL-C) ve TG) ölçümüne dayalı hesaplamanın kullanılması nedeniyle, National Cholesterol Education Program (NCEP) tarafından LDL-C için öngörülen \leq %12 olan tıbben müsaade edilen hatanın (TMEH) aşılması olasılığı vardır(6,9). Ayrıca Friedewald formülü diabetes mellitus, hepatik ve renal hastalıklarda TG konsantrasyonu 200-400 mg/dL arasında olsa bile, dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır (10).

Toplumumuzdaki hiperlipidemi sıklığı göz önüne alındığında, LDL-C'nin doğru ve otomasyona uyarlanabilir yöntemlerle ölçülmesi pratik olacaktır. Bu çalışmanın birinci bölümünde Sentinel direkt LDL-C ve Vitros direkt LDL-C metodlarının analitik performanslarının değerlendirilmesi ve bu metodların birbirleriyle ve Friedewald formülü ile karşılaştırılması amaçlandı.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise, aynı yöntemlerle küçük, yoğun LDL-C (sdLDL-C) ölçümü amaçlandı. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, plazmada sdLDL hakimiyetinin KKH için yeni bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir(11,12). sdLDL-C ölçümünde standart yöntem analitik ultrasantrifügasyondur; ancak bu yöntemin uzun zaman alması ve özel ekipman gerektirmesi nedeniyle rutinde kullanımı uygun değildir(13). Polianyonların divalen katyonlarla kombinasyonunun apo B içeren lipoproteinlerin presipitasyonuna yol açtığı bilinen bir olgudur. Hirano ve ark.larının geliştirdiği metodda heparin sodyum ve magnezyum klorür kombinasyonunun apo B içeren tüm lipoproteinleri çöktürmediği ve LDL'nin bir kısmının supernatantta kaldığı gösterilmiştir. Supernatantta kalan bu fraksiyonun sdLDL olduğu ultrasantrifügasyon ve elektroforez ile doğrulanmıştır(14). Bu çalışmada, çöktürme yöntemi kullanılarak değişik konsantrasyonlarda kolesterol ve TG içeren serumlarda sdLDL-C ölçümü ve sdLDL-C düzeyi ile serum total kolesterol, TG, LDL-C, HDL-C, apo A-I ve apo B konsantrasyonu arasındaki ilişkinin gösterilmesi amaçlandı.

2- GENEL BİLGİLER

2.1. Plazma Lipidleri ve Lipoproteinler

Plazmada bulunan lipidler kolesterol, triaçilgliseroller, fosfolipidler ve serbest yağ asitleridir. Serbest yağ asitleri plazmada albümine bağlı olarak bulunur. Triaçilgliseroller, bir gliserol molekülü ile üç yağ asidi molekülünün ester bağı ile birleşmesi sonucu meydana gelirler. TG'ler depo yağlarının büyük bölümünü meydana getirirler. Fosfolipidler, bir gliserol molekülünün üç hidroksil grubundan ikisinin yağ asitleriyle, üçüncü grubun fosforik asit ile esterleşmesiyle oluşurlar. Kolesterol insan vücudunda bulunan ana steroldür. Organizmada sentezlenen tüm steroidlerin ön maddesidir. Steroidler, steran halkası adı verilen dört halkalı bir yapıdan oluşurlar. Steran halkası üç tane altı karbonlu halkadan meydana gelen fenantren ve bu yapıya bağlı bir siklopentan halkasından oluşmuştur. İlk üç halka fenantrenin doymuş hali olduğundan "perhidro" ekini alır ve yapının tümüne siklopentanoperhidrofenantren halkası adı verilir. Kolesterol, steroid çekirdeğine eklenmiş sekiz karbon atomlu bir hidrokarbon yan zincirine sahiptir ve toplam 27 karbon atomu içerir. Plazmada bulunan kolesterolün üçte ikisi yağ asitleri ile esterleşmiş, üçte biri ise serbest olarak bulunur(15,17,18,20). Kolesterol hücre membranlarının yapısal bir bileşenidir; surrenal korteks hormonları, seks hormonları, 1,25-dihidroksikolekalsiferol ve safra asitlerinin ön maddesidir(1,18).

Lipidler suda çözünmediklerinden plazmada taşınmaları için hidrofilik yapıda protein taşıyıcılara gerek vardır. Apoprotein veya apolipoprotein adı verilen bu proteinler ile lipidlerin oluşturduğu komplekslere lipoproteinler adı verilir. Lipoproteinlerin dış kısmında apolipoproteinler, serbest kolesterol ve fosfolipidler gibi amfipatik lipidler bulunurken, hidrofobik yapıdaki çekirdek bölümünde nonpolar kolesterol esterleri ve triaçilgliseroller bulunur(1,2,15,16,17,20). Lipoproteinlerin çoğu globüler yapıdadır(15).

Apoproteinlerin temel işlevleri, lipoproteinlerin suda çözünürlüğünü sağlamak ve lipoproteinlerin hücrelerdeki reseptörler tarafından tanınmasını sağlamak, bu şekilde lipoproteinlerin reseptöre bağımlı endositoz ile hücre içine alınmasını kolaylaştırmaktır. Ayrıca bazı apoproteinler lipoprotein partikülünün metabolize olması ve yıkımından sorumludur(2,15,17,18).

Lipoprotein molekülünün çekirdeğinde bulunan lipidler apolipoproteine nonkovalent olarak bağlanırlar. Bu bağlar hidrojen bağları ve van der Waals bağlarıdır. Bağlanmanın zayıf olması, serum ve doku lipoproteinleri arasında lipid alışverişi olmasını kolaylaştırır (2).

Lipoprotein partikülünün dansitesi partikülde bulunan lipid ve proteinlerin rölatif miktarları ile ilişkilidir(19). Lipoproteinler, ultrasantrifugasyonda büyük ve hafif olanların üstte, küçük ve ağır lipoproteinlerin altta birikmelerine göre beş sınıfa ayrılırlar. Bunlar şilomikronlar (ŞM), çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL), orta dansiteli lipoproteinler (IDL), LDL, HDL. Ayrıca elektroforetik özelliklerine göre α -, β -, pre- β lipoproteinler olarak ayrılırlar(2,20,22).

2.1.1. Şilomikronlar (ŞM)

Barsak hücreleri tarafından sentezlenip salınan en büyük molekülü lipoproteinlerdir(18). Çapları 80-500 nm arasında olup %98 lipid, %2 proteinden oluşurlar(2,16). Dansiteleri 0.960 gr/ml'nin altındadır ve elektroforezde orijinde kalırlar. Lipid/protein oranı en yüksek olan lipoproteinlerdir. Bu nedenle tüm lipoproteinler içinde en düşük dansiteye sahiptirler(2,20). Besinsel kaynaklı triaçilgliserollerin kas ve yağ dokusuna transportunu sağlarlar, ayrıca diyet ile alınan kolesterolü karaciğere ulaştırırlar(19,22). ŞM'nin yapısında en fazla TG'ler bulunur(%82). Dolaşıma girmeden önce ŞM'nin yapısında bulunan major apolipoproteinler Apo A-I, A-II, A-IV ve Apo B-48 dir. Apo B-48 yalnız ŞM'lerin yapısında bulunur ve apo B-100'ün intestinal formu olarak bilinir(2,20,21).

ŞM'ler, duodenum ve proksimal jejunum epitel hücreleri tarafından sentezlenirler. Triaçilgliserol, fosfolipid ve kolesterol sentezi düz endoplazmik retikulumda, apolipoproteinlerin sentezi ise kaba endoplazmik retikulumda gerçekleşir. Endoplazmik retikulumdan golgi cisimciğine geçişte lipidler ve apoproteinler birleşerek ŞM'leri oluşturur(18). ŞM'ler eksositoz ile veziküller içinde hücre membranının lateralinden dışarı salınırlar(18,21). ŞM'ler barsağı lenfatikler yolu ile terk eder ve duktus torasikus ile sistemik dolaşıma geçerler. Sistemik dolaşımda HDL'den apo C-II, C-III ve apo E'yi alan ŞM'ler kas ve yağ dokusundaki kapillerlerde bulunan lipoprotein lipazın (LPL) etkisiyle triaçilgliserollerinin bir bölümünü kaybederler ve daha küçük olan ŞM kalıntılarına dönüşürler. LPL'nin aktivatörü HDL kaynaklı apo C-II dir. TG'lerin ŞM'lerden uzaklaştırılması sırasında apo A, apo C ve kolesterol esterleri ile

fosfolipidler HDL'ye transfer edilir(15,23). Apo C-II'nin kaybedilmesi ŞM'lerdeki TG'lerin LPL tarafından yıkılmasını inhibe eder(15). TG, kolesterol, apoE ve apo B-48 içeren ŞM kalıntıları karaciğere ulaşırlar ve apo B-48 ile apo E reseptörü aracılığı ile hepatositler tarafından tanınarak hücre içine alınır ve yıkıma uğrarlar(15,18,23).

2.1.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoproteinler (VLDL)

VLDL'nin asıl kaynağı karaciğerdir(18). %15 veya daha azı ise barsakta sentezlenir(21). Çapı 30-80 nm olan partiküller olup dansitesi 0.950-1.006 gr/ml arasındadır(15). Elektroforezde pre- β fraksiyonu içinde göç eder(2,23). VLDL triaçilgliserollere ek olarak kolesterol, kolesterol esterleri ve apolipoproteinler (apo B-100, C-I, C-II, C-III ve E) içerir. Yapısında % 92 lipid ve % 8 protein bulunur(2). ŞM'ler gibi VLDL partikülleri de HDL'den apo C ve E'yi alırlar(15,18,22). Her VLDL partikülünün yapısında bir molekül apo B-100 bulunur(23).

Besinler ile alınan veya lipoliz ile açığa çıkan yağ asitleri ve karbonhidratlar karaciğerde triaçilgliserollere çevrilerek VLDL'nin yapısına katılarak dolaşıma verilirler(15). VLDL kolesterol (VLDL-C) ise, de novo olarak veya lipoprotein katabolizması sırasında karaciğer tarafından kazanılan kolesterolden sentezlenir(23).

VLDL'de bulunan TG'ler, endotelde bulunan LPL tarafından hidrolize uğrar ve açığa çıkan yağ asitleri kas ile yağ dokusu tarafından kullanılırlar(21,22). Yağ asitleri adipositlerde TG'lere re-esterifiye edilirken kas dokusunda oksidasyona uğrarlar. TG'lerin kaybı ve apo C'nin HDL'ye transferi sonucu VLDL IDL'ye dönüşür (21,22,23).

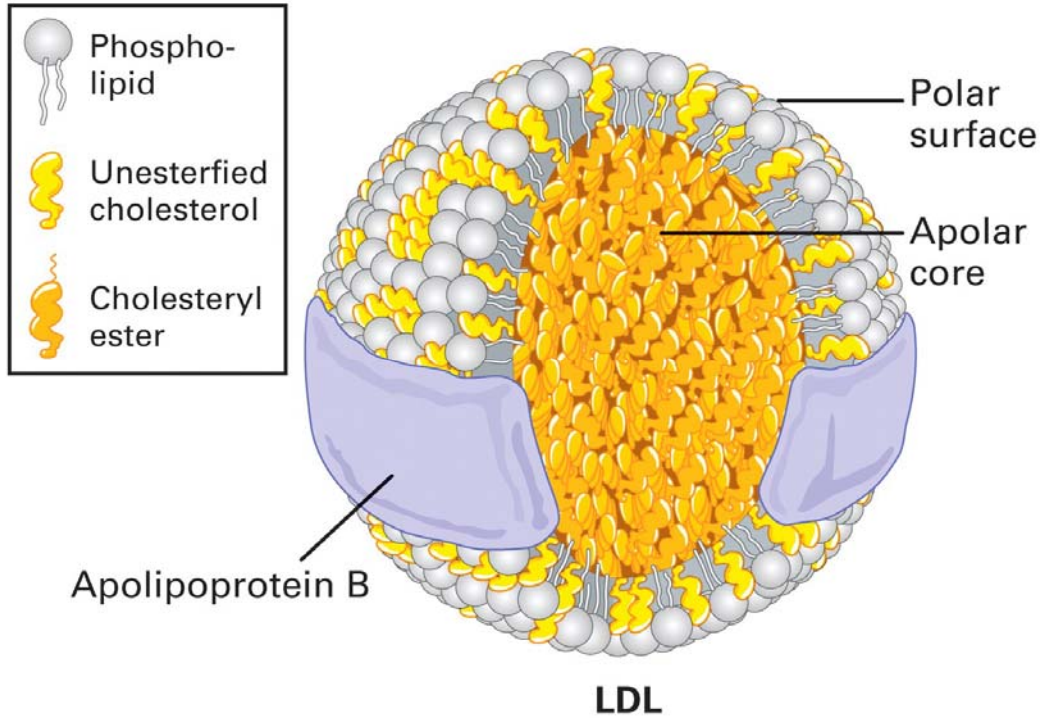
2.1.3. Ara Dansiteli Lipoproteinler (IDL)

VLDL'nin triaçilgliserollerini ve apo C'yi kaybetmesi ile kısa ömürlü IDL partikülleri oluşur. IDL eşit oranda kolesterol ve TG içerir. Çapı 24,5 nm olup dansitesi 1.006-1.019 gr/ml arasındadır. IDL'deki major apoproteinler apo B-100 ve apo E dir(2, 20). IDL iki yol izler. Çoğu hepatik lipaz ve LPL tarafından yıkılır. TG'lerini ve apo E'yi kaybederek LDL'ye dönüşür. Bu dönüşüm sırasında IDL partikülü apo B-100 dışındaki tüm apoproteinlerini kaybeder. Küçük bir bölümü ise karaciğer tarafından alınır(15,21). IDL'nin hepatosit tarafından alınması ise apo B-100 ve apo E apoproteinlerinin LDL reseptörü tarafından tanınması sonucu gerçekleşir(15).

2.1.4. Düşük Dansiteli Lipoproteinler (LDL)

LDL %80 lipid ve %20 proteinden oluşur. Protein içeriğinin artması nedeniyle partikül çapı düşer (22-28.5 nm) ve dansite artar (1.019-1.063 gr/ml) (2,23). Elektroferezde β fraksiyonu içinde geç eder (2,17,20). Lipid içeriğinin %47'sini kolesterol, %23'ünü fosfolipid ve %9'unu TG oluşturur. Kolesterol içeriği en yüksek olan lipoprotein olup major apoproteini apo B-100 dür. LDL apo B-100, total plazma apo B-100'ünün % 90-95'ini oluşturur(2). Her LDL partikülü bir molekül apo B-100 içerir(25). LDL'nin yapısında bulunan apo B-100'ün tümüyle VLDL kaynaklı olduğu gösterilmiştir(2).

LDL partikülleri TG'den zengin lipoprotein partiküllerinden daha küçük olduğu için, serum LDL konsantrasyonu çok yüksek olsa bile ışık saçılması oluşmadığından serumda bulanıklık görülmez(24).



Şekil 1. LDL partikülünün yapısı.

LDL metabolizması

Vücutta bulunan kolesterolün yarısı sentez yolu ile meydana gelirken, kalanı diyetten sağlanır(20). Total sentezin büyük bölümünden karaciğer ve barsaklar sorumludur(2,20). Diyet ile alınan kolesterol, karaciğere ŞM kalıntıları ile ulaşırken karaciğer tarafından sentezlenen kolesterolün ekstrahepatik dokulara transportu için VLDL'nin yapısına katılması gerekir. VLDL, önce IDL'ye, daha sonra LDL'ye dönüşür. Apo C-II ve apo E'nin VLDL kalıntıları ve IDL'den HDL'ye transfer edilmesi sonucu oluşan LDL, hemen hemen tümüyle apo B-100 içerir(22). LDL tüm dokulara kolesterolü taşıyan major lipoproteindir(2,15,18). VLDL'nin önce IDL'ye sonra LDL'ye dönüşmesiyle partikülün plazmada kalma süresi birkaç saatten 2,5 güne çıkar. Uzun ömürlü bir partikül olması LDL'nin dokular için kolesterol kaynağı olarak işlev görmesini sağlar(15). Sağlıklı ve normal kişilerde LDL-C total plazma kolesterolünün yaklaşık 2/3'sini oluşturur. Premenapozal dönemdeki kadınlarda LDL-C konsantrasyonu erkeklere göre biraz daha düşüktür(2).

LDL'nin hücre içine alınması reseptör aracılığı ile gerçekleşen endositoz ile gerçekleşir(15,18). LDL reseptörleri hücre membranının sitozolik kısmında, kltrin adlı proteinle kaplı ceplerde bulunurlar(20). LDL reseptörü, glikoprotein yapısında olup negatif yüklü sisteinden zengin bölgeleri apo B-100'deki pozitif yüklü arginin ve lizin amino asitleri ile etkileşir(15). Endozomlar içine alınan LDL partikülü, lizozomlar ile birleşir; burada partikülün apoprotein fraksiyonu yıkıma uğrar. Açığa çıkan kolesterol esterleri bir asit lipaz tarafından hidroliz edilir. Oluşan serbest kolesterol ya hücre membranı yapısına katılır, steroide gereksinim olan reaksiyonlarda kullanılır veya fazla miktarda ise açıl-CoA-kolesterol açıl transferaz (ACAT) enzimi tarafından re-esterifiye edilerek hücre içinde depolanır. Ayrıca, serbest kolesterol hidroksi metil glutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz enzimini baskılayarak kolesterol sentezini inhibe eder(1,2,15,18). LDL reseptörü yıkıma uğramayıp tekrar hücre membranına döner(20,23). İnsanda plazmada bulunan LDL'nin %35-64'ü yüksek afiniteli LDL reseptör sistemi tarafından, kalanı çöpçü (scavenger) reseptörler tarafından yıkılır. Plazma LDL konsantrasyonunun yükselmesiyle çöpçü reseptörler daha fazla miktarda LDL'yi hücre içine alırlar(17).

LDL vücuttaki tüm dokular tarafından alınır(21). Karaciğer yüksek afiniteli reseptörler aracılığıyla LDL'nin hemen hemen yarısını dolaşımdan alır ve yıkıma

uğrattır(21,55). Surrenal korteks ve gonadlar da steroid hormon sentezlemeleri nedeniyle, LDL alımı yüksek olan dokulardır(21).

NCEP ATP III'de LDL-C için yapılan sınıflama(4)

<100 mg/dL:	Optimal
100-129 mg/dL:	Optimal üzeri
130-159 mg/dL:	Sınırdan yüksek
160-189 mg/dL:	Yüksek
>190 mg/dL:	Çok yüksek

Risk kategorilerine göre serum LDL-C hedefleri(4)

KKH veya KKH eşdeğeri:	LDL-C <100 mg/dL
2 veya daha risk faktörü:	LDL-C < 130 mg/dL
0-1 risk faktörü:	LDL-C < 160 mg/dL

2.1.5. Yüksek Dansiteli Lipoproteinler (HDL)

En küçük boyutlu ve en yüksek oranda protein içeren lipoproteinlerdir. HDL'nin yoğunluğu 1.063-1.210 gr/ml, çapı ise 7.5-12 nm arasındadır(2). HDL kütlesinin yaklaşık %50'si protein, %30'u fosfolipid, %20'si kolesterolden oluşur(2,17). TG içeriği en az olan lipoproteindir(16). HDL'nin major apoproteinleri apo A-I ve A-II dir(2,16,17). Apo A-I %65 oranında bulunur(16). HDL serum protein elektroforezinde α fraksiyonu içinde göç eder(2,15,17,20,23).

HDL, karaciğer ve ince barsakta enterositler tarafından sentezlenir ve ekzositozla dolaşıma verilir. HDL partikülü sentezlendiği zaman disk şeklinde, proteinden zengin bir partiküldür. Bu dönemde HDL'nin apoproteinleri apo A-I ve apo A-II dir(22,23). Diskoid yapıda olan HDL partikülü, ekstrahepatik dokulardan ve damar endotelinden serbest kolesterolü alır. HDL'nin bu özelliği nedeniyle ateroskleroza karşı koruyucu olduğu düşünülmektedir. HDL, kolesterolü esterleştirilen veya transfer eden enzimler içerir. Karaciğerde sentezlenen ve plazmada HDL partikülünde bulunan Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz (LCAT), lesitinden bir yağ asidi transfer eder, bu yağ asidini serbest kolesterol ile esterleştirerek kolesterol esteri haline dönüştürür. Apo A-I, LCAT'nin aktivatörüdür. Esterleşme sonrası, kolesterol esterleri HDL partikülünün

hidrofob yapıda çekirdek kısmına geçer, bu şekilde hücre membranları ile HDL arasında serbest kolesterol için bir konsantrasyon gradyentinin oluşması sağlanır. HDL hücre membranlarından serbest kolesterolü aldıkça küresel yapıda küçük ve yoğun olan HDL₃'e dönüşür(15,23).

HDL₃ partikülleri hücre yüzeyinden serbest kolesterolü alır. Ayrıca ŞM'ler ile VLDL'nin hidrolizi sonucu açığa çıkan serbest kolesterol, fosfolipidler ve apolipoproteinler (apo A-I, A-II, C-I, C-II ve C-III) HDL'ye transfer edilir. Kolesterol esterlerinden daha zengin hale geçen HDL partikülü daha büyük ve daha az yoğun HDL₂'ye (dansite= 1.063-1.125 gr/ml) dönüşür. HDL₂ kolesterol esterlerini Kolesterol Ester Transfer Proteini (CETP) aracılığı ile TG'den zengin lipoproteinlere transfer eder, karşılığında TG alır. HDL₂'nin almış olduğu TG'ler hepatik lipaz tarafından hidroliz edilir ve HDL₂ HDL₃'e dönüşerek periferden kolesterol toplamaya hazır hale gelir(23). HDL₂'nin aterosklerozdan koruyucu etkisinin, HDL₃' e göre daha fazla olduğu düşünülmektedir(2,15).

HDL partikülleri, reseptör aracılığı ile gerçekleşen 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(2,15,18).

HDL'nin işlevleri:

- ✓ HDL partikülleri, apoprotein rezervuarı olarak görev yaparlar. Apo C ve E'yi ŞM'lere ve VLDL'ye transfer edip geri alırlar.
- ✓ Serbest kolesterolü dokulardan alıp esterifiye ederler. Kolesterolün ekstrahepatik dokulardan alınıp karaciğere transportu revers kolesterol transportu olarak bilinir(15,20,23).
- ✓ HDL' de bulunan kolesterol esterleri CETP aracılığı ile TG'den zengin lipoproteinlere transfer edilir(23).

2.1.6. Diğer Lipoprotein Fraksiyonları

Beta-VLDL: Tip III hiperlipidemili (disbetalipoproteinemili) hastalarda rastlanan bir fraksiyondur. β -VLDL'nin dansitesi 1.006 g/ml dir ve bu dansite VLDL (pre- β) için karakteristiktir, ancak elektroforezde β -lipoprotein migrasyon şekli saptanır. Tip III hiperlipidemili hastalardaki anormal lipid bileşimi bu fraksiyonda daha yüksek oranda kolesterol bulunmasına bağlıdır. β -VLDL oldukça aterojenik bir lipoproteindir ve bu

lipid metabolizma bozukluğunun görüldüğü hastalar, 20-30 yaşlarında, KKH nedeniyle kaybedilirler. Bu hastalarda IDL ve ŞM kalıntıları artmıştır ve VLDL-C/VLDL-TG oranı 0.35'den yüksektir(2).

Lipoprotein(a): Lp(a), LDL'nin bir varyantıdır ve dansitesi 1.05-1.10 gr/ml arasındadır(2,25). Karaciğerde sentezlenen Lp(a), lipid bileşimi açısından LDL'ye benzer. Protein komponentinin %65'ini apo B-100, %15'ini albümin oluşturur, kalanı ise apo B'ye disülfid köprüleri ile bağlı apo(a) adlı glikoproteinden meydana gelir. Apo(a)'nın geni 6. kromozomda lokalizedir(2,26,27,28). Lp(a)'nın plazma konsantrasyonu genetik olarak belirlenir ve popülasyondan popülasyona farklılık gösterir(26). Dansitesi HDL'ye yakın olmasına karşın, elektroforezde pre-β bandında (VLDL ile) geç eder(2,24).

Lp(a)'nın fizyolojik işlevi tam olarak anlaşılamamıştır(2). Hem trombojenik, hem aterojenik özellikleri olduğu düşünülmektedir(1,2,28). Apo(a) ve plazminojen arasında amino asit dizilimi açısından büyük benzerlik vardır. Plazminojende 80-114 amino asitten oluşan beş tane sisteinden zengin "krinkle" bulunur(22), apo(a)'da ise plazminojende bulunan dördüncü "krinkle"a benzer yapıda olan 10 bölgenin bulunduğu saptanmıştır(28). Ayrıca, plazminojen ve apo(a)'nın genleri 6. kromozoma lokalizedir(26,28). Bu benzerlik nedeniyle Lp(a)'nın plazminojenle yarışmaya girerek fibrinolizi inhibe ettiği ve trombus oluşumuna katkıda bulunduğu sanılmaktadır(2,15,28). Yapılan çalışmalarda, hem Lp(a), hem rekombinant apo(a)'nın plazminojenin endotel hücresi ve trombositlere bağlanmasını inhibe ettiğini gösterilmiştir. Bunun yanında Lp(a), plazmin oluşumunu yarışmalı olarak inhibe eder ve endotel hücrelerinin Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (PAI-1) sentezini artırır(28). Okside Lp(a)'nın çöpçü reseptörler tarafından alındığı bilinmektedir(26). Ayrıca Lp(a)'nın endotelde adhezyon molekülleri ekspresyonu ile Monosit Kemotaktik Protein-1 (MCP-1) üretimini artırarak, düz kas hücre proliferasyonunu indükleyerek ve Nitrik Oksit (NO) sentezini baskılayarak aterosklerotik sürece katkıda bulunduğu gösterilmiştir(28).

Lp(a)'nın 30 mg/dL'nin üzerinde olmasının KKH riskini artırdığını gösteren çok sayıda çalışma vardır. Lp(a)'nın KKH için bağımsız bir risk faktörü olduğu kabul edilmektedir. LDL-C referans aralığı içinde olsa bile, Lp(a) yüksekliği KKH riskini

artırmaktadır(29). Lp(a) yüksekliğine LDL-C yüksekliğinin eşlik etmesi bu riski belirgin olarak artırır(30).

Lipoprotein X: Lipoprotein X'in dansitesi LDL'ye yakın olsa da elektroforezde göç patterni farklıdır. Yüksek oranda fosfolipid ve esterleşmemiş kolesterol içerir, protein içeriği ise oldukça düşüktür. Sağlıklı kişilerde bulunmayan Lp-X kolestazda ve familial LCAT eksikliği olan hastalarda bulunur(2).

2.1.7. Apolipoproteinler

Lipoproteinlerin yapısında yer alan lipidler, aktif olmayan bileşenleri oluştururken ,apolipoproteinler, bu partiküllerin daha ileri metabolizma ve katabolizmasından sorumludurlar.

Apolipoproteinlerin işlevleri:

- ✓ Sıvı ortamda polar olmayan lipidlerin çözünmesini sağlarlar.
- ✓ Lipoprotein metabolizmasında yer alan enzimler için kofaktör olarak işlev görürler.
- ✓ Lipoproteinler arası lipid transferini sağlarlar.
- ✓ Lipoproteinlerin hücresele reseptörlerine bağlanması için ligand görevi yaparlar(2,16, 18,20,22).

Apolipoproteinler, genellikle protein veya polipeptid yapısındadırlar. Ancak glikoprotein yapısında olan apoproteinler de vardır. ApoB'nin % 5'i karbonhidrat yapısında olup mannoz, fukoz, galaktoz, glukozamin ve sialik asit içerir(20).

Apolipoprotein A (Apo A)

Apo A'lar HDL'de bulunan ana apoproteindir. Aynı zamanda ŞM'lerde de bulunur. HDL'nin %50'si protein yapısında olup, bunun % 90'ını Apo A-I ve A-II oluşturur. Apo A-I/ Apo A-II oranı 3:1 dir(17).

Apo A-I ve A-II'nin sentez yerinin karaciğer ve barsak olduğu sanılmaktadır(24). Apo A-I, LCAT'nin aktivatörüdür. Aktive olan LCAT, serbest kolesterolden kolesterol esterleri oluşturarak ekstrahepatik dokulardan kolesterolün uzaklaştırılmasını sağlar. (2,15,23). Apo A-II, bir disülfid köprüsü ile birleştirilmiş iki idantik monomerden oluşur(20,24). İşlevi tam olarak bilinmemekle birlikte LCAT'yi inhibe ettiği düşünülmektedir(20,23). Ayrıca apo A-II hepatik lipazı aktive edebilir(17).

HDL₂ 'nin yapısında Apo A-I bulunurken, HDL₃'ün yapısında apo A-I ve apo A-II bulunur. Kadınlarda serum apo A-I düzeyi erkeklere göre biraz daha yüksektir(55). Serum apo A-I konsantrasyonu ile ateroskleroz arasında negatif bir ilişki vardır(31,55).

Apolipoprotein B (Apo B)

HDL dışındaki lipoproteinlerin temel apoproteinidir. İki formu mevcuttur:

Apo B-100: Apo B'nin en çok bulunan formudur(17). Karaciğerde sentezlenen VLDL'nin ve VLDL'den oluşan IDL ve LDL'nin en önemli yapısal apoproteinidir. Her VLDL ve LDL partikülü bir apo B-100 molekülü içerir(23). Apo B-100, 4536 amino asit içeren bilinen en uzun polipeptid zinciridir(20). Yapısal işlevi dışında diğer bir görevi, LDL reseptörünün ligandı olmasıdır. Bu şekilde, ekstrahepatik dokulara kolesterolün taşınmasında temel işlev üstlenir. Apo B-100 karaciğer ve periferik dokularda bulunan LDL reseptörü tarafından tanınır ve LDL partikülünün hücre içine alınmasını sağlar(17). LDL reseptörü negatif yüklü bir glikoproteindir ve apo B-100'deki bağlanma bölgesinde bulunan pozitif yüklü arginin ve lizin amino asitleriyle etkileşir(15).

Artmış serum apo B düzeyi bulunan bireylerde fatal miyokard infarktüsü geçirme riski artmıştır(31).

Apo B- 48: İnce barsakta sentezlenir ve ŞM'lerin yapısına katılır. Apo B'nin intestinal formu olarak bilinir. 2153 amino asitten oluşup molekül ağırlığı Apo B-100'ün molekül ağırlığının % 48'ine eşittir. Fiziksel ve immunokimyasal özellikleri apo B-100'e yakındır. Apo B-100'ün karboksi terminal alanını içermediğinden LDL reseptörüne bağlanma özelliği yoktur(15,20,21). Açlık plazmasında saptanmaz ve yarı ömrü apo B 100'e göre daha kısadır(16).

Apolipoprotein C (Apo C)

ŞM'lerin, VLDL ve HDL'nin yapısında bulunan düşük molekül ağırlıklı bir apoproteinidir. Sentez yerinin karaciğer olduğu sanılmaktadır. Açlıkta apo C'nin çoğu VLDL ve HDL'nin yapısında bulunur. Apo C'nin üç formu vardır:

Apo C-I: 57 amino asitten oluşur. İşlevi bilinmemektedir.

Apo C-II: 78 amino asitten oluşur. Ekstrahepatik LPL'nin kofaktörüdür. Ayrıca VLDL ve ŞM'lerin karaciğerde bulunan reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder.

Apo C-III: 79 amino asitten oluşur. Sialik asit içeriğine göre birkaç polimorfik şekil gösterir. Apo C-III, LPL'nin inhibitörüdür(20,22,23,24).

HDL'nin yapısında bulunan apo C yeni sentezlenen ŞM ve VLDL'ye transfer edilir. ŞM ve VLDL hidrolize uğradıktan sonra apo C-II bu lipoproteinlerden HDL'ye transfer edilir(15,17).

Apolipoprotein D (Apo D)

Glikoprotein yapısında olup sentezi ve katabolizması hakkında hemen hemen hiçbir şey bilinmemektedir. HDL'nin yapısında yer alarak CETP'nin kofaktörü olarak görev yaptığı sanılmaktadır(20,23).

Apolipoprotein E (Apo E)

Argininden zengin bir apoproteindir. Karaciğerde sentezlenir ve en az dört tane polimorfik formu vardır. Apo E, plazmaya yeni sentezlenen HDL'nin bir parçası olarak girer ve hızla ŞM ve VLDL'ye transfer edilir. Apo E (primer olarak E-III ve E-IV) hepatositlerdeki spesifik reseptörler aracılığıyla ŞM kalıntıları ile IDL'nin tanınması ve yıkımında rol oynar(17,20). Sadece apo E-II'yi oluşturan bireylerde ŞM ve IDL'nin klerensi bozulmuştur, bu tablo tip III hiperlipoproteinemi olarak bilinir(17).

2.2. Ateroskleroz ve LDL

2.2.1. Tanım

Ateroskleroz, orta büyüklükte ve daha büyük arterlerin kalınlaşması ve sertleşmesi sonucu damar lümeninin aterosklerotik plaklarla daralması olarak tanımlanır. Dejeneratif, ilerleyici ve multifaktöryel bir hastalık olan ateroskleroz çeşitli organlara kan akımının bozulmasına yol açan kompleks bir hastalıktır(33). Ateroskleroz fetal yaşamda başlayan kronik bir hastalık sürecidir. Çocukluk ve ergenlik döneminde yavaş bir ilerleme gösterir. Erişkin yaşamda ise daha hızlı bir progresyona ulaşarak yüksek morbiditeye ve ölümcül olabilen klinik durumlara yol açar(34). Artmış plazma LDL-C konsantrasyonu, ateroskleroz gelişiminde primer bir risk faktörüdür(4,31,35). Ancak aterosklerotik süreçte arter duvarında lipid birikimi ile beraber inflamatuvar bir yanıtın varlığı da söz konusudur(34,35,38,40,41,43,44).

Sağlıklı kan damarlarında üç tabaka bulunur: İntima tabakası, lüminal yüzde bulunan tek sıralı endotel hücreleri ve endoteli media tabakasına bağlayan lamina elastika internadan meydana gelir. Ortada bulunan tunika media, düz kas hücrelerinden ve bu hücrelerin çevresinde bulunan kollajen, elastik lifler ve glikozaminoglikanlardan oluşur. En dışta ise, gevşek bir bağ dokusundan meydana gelen tunika adventisya mevcuttur. Bu tabakada arter duvarını besleyen küçük kan damarları (vasa vasorum) bulunur(2,36).

Aterosklerozun Patogenezi ile İlgili Öne Sürülen Hipotezler

1- Zedelenmeye Karşı Tepki Hipotezi: Mekanik, kimyasal, immunolojik, toksik veya enfeksiyöz ajanlarla oluşan endotel hasarına bağlı olarak trombosit agregasyonu ve endotel permeabilitesinde artış meydana gelir. Böylece endotel hücrelerinin LDL-C alımı artar. Bu durum endotel hücrelerinin yüzey karakteristiklerini değiştirir ve dolaşımdaki makrofajlar ve trombositlerin damar duvarına adhezyonu artar. Oksitlenmiş LDL'yi hücre içine alan makrofajlar köpük hücreleri haline geçerler ve çeşitli büyüme faktörleri salgırlar. Bu dönemde trombositlerden PDGF (platelet derived growth factor) gibi düz kas hücre proliferasyonuna yol açan büyüme faktörleri salınır. Bu faktörlerin etkisiyle arter duvarındaki düz kas hücreleri proliferere olur ve kollajen, elastin, glikozaminoglikanlar gibi bağ dokusu elemanları birikmeye başlar. Endotel hasarı oluşturan etki zayıfsa bu olay geri dönüşümlüdür, bu etki uzun süreli ise hasar bölgesinde kolesterol esterleri birikimi gerçekleşir ve düz kas hücre proliferasyonu artar(2,37).

2- Monoklonal Hipotez: Bu hipoteze göre arterde bulunan düz kas hücrelerinden biri neoplastik hücre büyümesinde olduğu gibi monoklonal olarak çoğalmakta ve her aterosklerotik lezyon farklı bir düz kas hücresinin benign neoplastik proliferasyonu sonucu oluşmaktadır(2).

Ateroskleroz temelde intima tabakasını etkiler. Aterosklerotik plak oluşumu üç aşamada gerçekleşir:

1-Yağlı çizgilenme: Çocukluk döneminde görülmeye başlarlar(31). Patolojik olarak kolesterol esterleri çevresindeki düz kas hücreleri topluluklarından ibarettirler. Tıkanmaya yol açmazlar ve semptom vermezler(2,15). Bu lezyonlar kendiliğinden kaybolabilir veya aterom plaklarına dönüşebilir(31,38).

2- Fibröz plak: İntimada kolesterol esterleriyle yüklü köpük hücreleri ve düz kas hücreleri ile bu hücreleri çevreleyen kollajen, elastik lifler ve proteoglikanlardan oluşur(2).

3- Komplike lezyon: Fibröz plakta kalsifikasyon, ülserasyon, kanama meydana gelir veya trombüs oluşur. Komplike lezyonlar miyokard infarktüsü veya inme gibi klinik tabloların ortaya çıkmasından sorumludurlar(2,15). Çocukluk döneminde ortaya çıkan yağlı çizgilenmelerin komplike lezyonlara dönüşmesi 4-5 dekad içinde gerçekleşir(39).

2.2.2. Aterogeneze Rol Oynayan Hücreler

Ateroskleroz temelde üç hücre türünü etkiler. Bunlar: endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve immün fonksiyondan sorumlu hücrelerdir (monosit/makrofajlar ve T-lenfositleri)(40).

Endotel hücreleri: Endotel hücresi, normal koşullarda homeostatik mekanizmanın aktivasyonunu baskılar, hücre ve lipoproteinlerin dolaşımdan dokuya geçmesini sınırlar ve vazomotor tonusun sağlanmasına katkıda bulunur(40,41). Endotel hücreleri metabolik olarak aktif hücrelerdir ve parakrin veya endokrin hücreler gibi toksik, kimyasal veya oksitleyici maddelere reaksiyon olarak çeşitli maddeleri sentezleyerek yanıt verirler. Bu maddeler; adhezyon molekülleri, koagülasyon faktörleri ve fibrinolitik maddeler, anjiotensin II, endotelin-1 gibi vazokonstriktör ajanlar, NO gibi vazodilatör maddeler, büyüme faktörleri ve prostaglandinlerdir(40).

Makrofajlar: Köpük hücrelerinin intimada toplanması ateroskleroz için karakteristiktir. Köpüksü hücrelerin kökeninin dolaşımdaki makrofajlar olduğu sanılmaktadır(38). Monosit/makrofajlar aterosklerozun hem başlaması hem progresyonunda en önemli rolü oynarlar. Aterosklerozun erken döneminde arter duvarında monositler toplanmaya başlar. İntimada modifiye LDL'yi hücre içine alan monositler, inflamasyonun önemli mediatörleri olan makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar, lokal inflamatuvar yanıtta sitokinler, serbest oksijen radikalleri, proteazlar ve kompleman faktörlerini sentezleyerek katkıda bulunurlar. Makrofajların modifiye LDL'yi hücre içine almasıyla ateroskleroz için karakteristik olan köpük hücreleri meydana gelir. Ayrıca makrofajlar matriks metalloproteinazları sentezleyerek plak rüptürüne yol açabilirler(42).

Düz Kas Hücreleri: Düz kas hücreleri vasküler tonusun sağlanmasına katkıda bulunurlar. NO, epinefrin ve prostasiklin vazodilatasyon oluştururken, norepinefrin, anjiotensin II, endotelin-I, tromboksan A2 ve vazopressin vazokonstrüksiyona yol açarlar. Aterogeneze ve hipertansiyonda ise, düz kas hücreleri aktive olurlar. Aktive düz kas hücreleri çeşitli kemotaktik ajanlar ve büyüme faktörleri salgırlar. Prolifere olan düz kas hücreleri kollajen ve elastin gibi matriks proteinlerini sentezlemeye başlar, böylece fibröz plak meydana gelir ve aterom plağının stabilitesi sağlanır. Öte yandan, boyut olarak genişleyen lezyonlarda özellikle düz kas hücreleri apoptoza uğrar ve

damar duvarı zayıflayarak anevrizmalar oluşur. Yine apoptozun etkisiyle aterom plakları rüptüre olabilir ve trombus oluşumu için zemin hazırlanmış olur(40).

Trombositler: Ateroskleroz gelişiminde trombositlerin makrofajlara göre, daha az etkisi olmasına karşın, trombüs oluşumunda major rolleri vardır. Miyokard infarktüsüne yol açan trombüsler mural veya tıkaçıcı trombüslerdir. Trombositler aktive makrofajlar tarafından salınan büyüme faktörlerini sentezleyebilirler. Böylece kollajenin açığa çıktığı, trombin veya fibrinin oluştuğu veya ADP (adenin difosfat) salınmasının olduğu hasar bölgelerinde trombositler tarafından çeşitli vazoaktif ve proliferatif etkili ajanlar salınır(2). Ayrıca trombositler adhezyon, agregasyon ve degranülasyonu indükleyen maddeler varlığında PDGF, FGF (Fibroblast Derived Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) ve TGF- α (Transforming Growth Factor- α) gibi büyüme faktörlerini salgırlar. PDGF düz kas hücrelerine yüksek afinite ile bağlanarak DNA sentezini indükler ve bu hücrelerin proliferasyonunu stimüle eder(2,15).

2.2.3. Patogenez

Hiperkolesterolemi aterosklerozun patogenezinde rol oynayan en önemli faktördür. Plazma kolesterol düzeyinin düşürülmesiyle ateroskleroz zemininde gelişen klinik tabloların sıklığının azaldığı kanıtlanmış bir olgudur. Hiperkolesterolemide ilk aşamada gerçekleşen olay, endotel hücrelerinde ICAM-1 (intersellüler adhezyon molekülü-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) gibi adhezyon molekülleri ile monosit kemotaksisinde önemli rolü olan MCP-1'in ekspresyonudur. Buna paralel olarak, monositler endoteli geçip subendotelyal alana yerleşirler. Aterosklerozun gelişiminde önemli olan diğer bir etken ise inflamasyondur. Son yirmi yılda yapılan çalışmalar monosit/makrofajlar ve T-lenfositlerinin endotel ve düz kas hücreleri ile etkileşiminin aterosklerotik lezyonların gelişimindeki rolünü göstermiştir(34,35). Arter duvarındaki inflamatuvar süreci başlatan faktörlerin oksitlenmiş LDL, mekanik hasar, immunolojik, toksik veya infeksiyöz etkenler (Chlamydia pneumoniae, herpesviruslar) veya bunların bileşimi olduğu sanılmaktadır(2,15,35). Bu etkenler endotel hücrelerinin yüzey yapısını değiştirir ve endotel hücrelerinin LDL alımı artar. LDL'nin endotelde oksidasyona uğraması aterosklerozun gelişiminde başlatıcı etkendir(34,35,40,69). LDL'nin bu modifikasyonu endotelde adhezyon molekülleri ve MCP-1 ekspresyonunu artırır. Böylece monositlerin endotele adhezyonu ve intimaya migrasyonu gerçekleşir. Köpük hücrelerin gelişimindeki en önemli aşama, oksitlenmiş LDL'nin hücre içine alınmasıdır.

Makrofajlar, modifiye LDL'yi reseptör aracılığı ile gerçekleşen endositoz ile değil, çöpçü reseptörleri ile aldıklarından bu alım işleminin regülasyonu bozuktur(18,31,35). Böylece, LDL hücre içinde birikir ve makrofajlar köpük hücrelerine dönüşürler. Yağlı çizgilenmede, köpük hücreleri ve ekstraselüler lipid birikintileri mevcuttur(2). Köpük hücreleri ve aktive endotel, TNF- α (tümör nekroz faktör), interlökin-1, interlökin-6 ve interferon- γ gibi proinflamatuvar sitokinler ve makrofajlarla düz kas hücrelerinin proliferasyonunu artıran büyüme faktörlerini salgılar. Özellikle interferon- γ proaterojenik ve proinflamatuvar etki gösteren bir sitokindir(34,44). MCP-1'in etkisi ile T-lenfositlerinin bölgeye gelmesi ve proinflamatuvar sitokinler salgılamaları aterosklerozun kronik inflamatuvar komponentine katkıda bulunur(34,43). Prolifere olan düz kas hücreleri kollajen gibi matriks proteinleri sentezlemeye başlarlar ve fibröz plak meydana gelir(40).

Aterosklerozun patogeneğinde inflamasyonun ve immünitinin önemli rolü olduğunu destekleyen başka bulgular da vardır. Aterosklerotik lezyonlarda bulunan monosit/makrofajlar, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerinde inflamasyon olan dokularda bulunan COX-2 (siklooksijenaz-2) ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir. COX-2'nin prostaglandin sentezi üzerinden makrofajları ve kemotaksisi aktive etmesi, vasküler geçirgenliği, sitokin sentezini, düz kas hücresi proliferasyonunu ve göçünü indüklemesi olasıdır(42). Aterogenezde inflamasyonun rolünü destekleyen diğer bulgular ise, KKH bulunan bireylerde akut faz reaktanları olan CRP (C reaktif protein), serum amiloid A ve interlökin-6'nın yüksekliğidir(34). Bazal CRP düzeyi yüksek olan bireylerde akut koroner sendrom, inme ve vasküler hastalık riski artmaktadır(45). Önceleri CRP ve ateroskleroz arasındaki ilişkinin, CRP'nin aterosklerozun inflamatuvar bileşeni için bir belirteç olmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Son çalışmalarda ise CRP'nin aterosklerotik sürece doğrudan etkisi olduğunu gösterilmiştir: CRP, endotelyal NO Sentaz aktivitesini azaltarak NO salınmasını baskılar, endotelin-1, interlökin-6 ve MCP-1 sentezini stimüle eder. Bundan başka, CRP'nin apoptozun gelişimini kolaylaştırıldığı gösterilmiştir(46).

Aterosklerotik plağın kırılması trombozu başlatan en önemli etkidir. Kırılma, fibröz plağın en ince olduğu ve makrofajlar tarafından daha yoğun bir şekilde infiltrate edilmiş olan bölgelerde meydana gelir. Patolojik çalışmalar kırılğan plaklarda düz kas hücreleri ve tip I kollajenin azaldığını göstermiştir. Bu durum fibröz plağın

zayıflamasına yol açar. Düz kas hücrelerinin azalmasının nedeninin apoptoz olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca, fibröz plakta yoğun olarak bulunan makrofajlardan salınan matriks metalloproteinazların fibröz plağı parçalaması olasıdır(41).

Normal koşullarda endotelin antikoagülan özellikleri vardır. Aterosklerotik lezyonlarda ise intimada doku faktörü ekspresyonu artmıştır. Endotel hücrelerinin okside LDL ile karşılaşmaları PAI-1 düzeyini artırır. Sonuçta, plak rüptürü, kanı yüksek düzeyde doku faktörüne maruz bırakır ve tromboz meydana gelir(69).

LDL Oksidasyonunun Mekanizması

Oksidasyon hipotezi, aterosklerozda lezyon oluşumu ve gelişiminden lipid ve protein oksidasyon ürünlerinin sorumlu olduğunu öne sürer. Oksidasyonun asıl hedefi intimada bulunan LDL molekülüdür. Bu hipotez, in vitro şartlarda oksitlenmiş LDL molekülünün proaterojenik özelliklerinin bulunmasıyla desteklenmiştir. Bu özellikler kemotaksisin uyarılması, makrofajlarda kolesterol birikimi, endotel hücrelerinde adhezyon molekülü ekspresyonu ve bazı hücre türlerinin apoptozudur(47). LDL oksidasyonunun aterogenezde dört yolla etkili olduğu sanılmaktadır:

1. Monosit kemotaksisini artırarak, bu hücrelerin subendotelyal alana geçmelerini sağlar.
2. Monositlerin makrofajlara dönüşmesini sağlar.
3. Makrofajların motilitesini inhibe ederek subendotelyal alanda kalmalarını sağlar.
4. Endotel üzerine toksik etki gösterir(2).

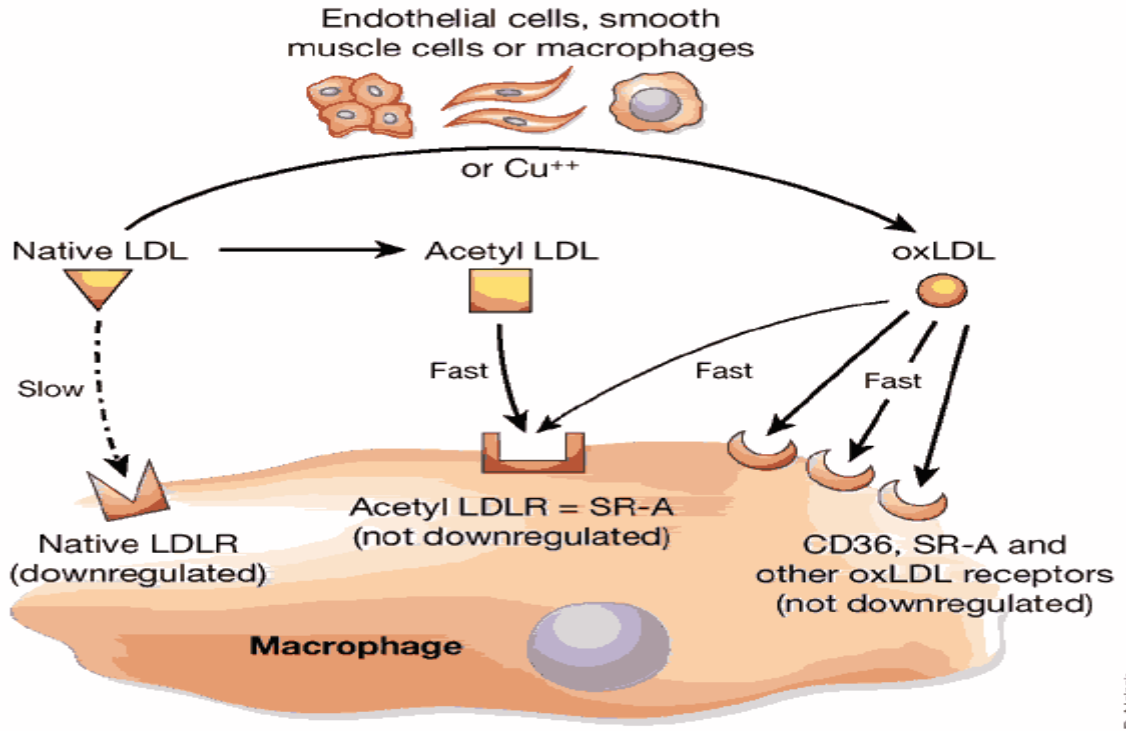
LDL oksidasyonu aterogenezde kilit rol oynar(26). Oksidasyon hipotezinin geçerliliği LDL'nin endotel hücreleri ile inkübasyonu sonrası makrofajlar tarafından alınmasının artmasının gösterilmesiyle kanıtlanmıştır. Oksidasyon düşük konsantrasyonda bakır ve demirin bulunduğu ortamda 24 saat içinde gerçekleşir. Ortalama bir LDL partikülünde bir molekül apolipoprotein-B, 600 molekül serbest kolesterol, 1600 molekül esterleşmiş kolesterol, 700 molekül fosfolipid, 180 molekül triaçilgliserol ve 10 molekül α - tokoferol bulunur. LDL'nin modifikasyonu sırasında tüm bileşenler oksidasyona uğrar. Ester ve serbest kolesterolün oksitlenmesiyle 7-hidroksiperoksikolesterol ve 7-ketokolesterol oluşur. Fosfolipidler ve triaçilgliserollerdeki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksitlenmesiyle önce hidroperoksitler ve daha sonra malondialdehid, heksanal gibi kısa zincirli, reaktif aldehidler meydana gelir. Araşidonik asidin non-enzimatik peroksidasyonu ile

isoprostanlar gibi prostaglandin benzeri bileşikler oluşur. Kısa zincirli aldehydler ve isoprostanlardan kökenini alan isolevuglandinler, apo B ile stabil kompleksler oluşturur ve moleküle pozitif yük getiren lizin residülerinin maskelenmesiyle proteindeki negatif yük artar. Tüm bu değişiklikler lipoprotein partikülünde molekül içi çapraz bağların oluşmasına ve partikülün agregasyonuna yol açar. LDL'de meydana gelen bütün bu yük ve konfigürasyon değişiklikleri partikülün makrofajlar tarafından alınımını kolaylaştırır(47).

Lipid peroksidasyonunda rol oynayan olası maddeler süperoksit anyonu, hidroksil radikali, peroksinitrit, lipoksijenaz, serüloplazmin ve myeloperoksidazdır. LDL oksidasyonunda lipid peroksidasyonunun yanında apo B de modifiye olabilir(48).

Oksitlenmiş LDL'nin hücre içine alınması, çöpçü ve CD36 reseptörleri aracılığı ile olur(31,34,35). Bu reseptörler hücre içindeki kolesterol düzeyi tarafından regüle edilmez ve subendotelyal yerleşimli makrofajlar okside LDL'yi kontsolsüz bir biçimde hücre içine alarak köpük hücreleri meydana getirirler(2,17,18,31,35,49). Scavenger reseptör A ve CD36 reseptörü bulunmayan farelerde aterosklerozun gelişiminin yavaşladığı bildirilmiştir (34).

Okside LDL'nin biyolojik etkileri: Oksitlenmiş LDL endotelde ICAM-1, VCAM-1 gibi adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükler, monositler üzerinde kemotaktik etki gösterir ve vasküler hücrelerin MCP-1 ekspresyonunu artırır ve makrofaj proliferasyonunu stimüle eder(34,46,47). Öte yandan okside LDL, makrofajlar üzerinde kemostatik etki göstererek bu hücrelerin arter duvarını terk edip dolaşıma katılmalarını baskılar ve aterosklerotik süreci hızlandırır(49).



Şekil 2. Okside LDL'nin çöpçü reseptörler aracılığı ile kontrolsüz olarak makrofaj içine alınması ve köpük hücre oluşumu.

Oksitlenmiş LDL, endotelde NO aktivitesini azaltarak vazokonstrüktif etki gösterir(49). Damarda endotele bağımlı olarak gelişen relaksasyonun baskılanmasıyla vasküler hücrelerde apoptoz ve nekroz meydana gelir(47,50). Ayrıca NO endotele lökositlerin adhezyonunu, düz kas hücresi proliferasyonunu ve trombosit agregasyonunu inhibe eder(46). Okside LDL'nin endoteldeki diğer etkileri, prostasiklin sentezini baskılamak ve PAI-1 üretimini indüklemektir(49). Bunun yanında oksitlenmiş LDL'nin immunojenik etki göstererek otoantikor oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir(48).

Ayrıca, LDL oksidasyon dışında başka yollarla da modifiye olabilir. Bunlar; glikasyon, immun kompleks oluşumu, proteoglikan kompleksi oluşumu ve kolesterolden zengin lipozomların meydana gelmesidir(51).

2.2.4. Küçük, yoğun LDL (sdLDL)'nin Aterosklerozdaki Rolü

LDL, heterojen yapıda bir partiküldür. Bu heterojenite, partikülün boyut ve dansite farkı göstermesinden kaynaklanır(52). LDL fraksiyonu kimyasal bileşimleri ve fizikokimyasal özellikleri değişkenlik gösteren benzer yapıda partiküllerden oluşur(5,6).

Analitik ultrasentrifugasyonla yapılan ilk çalışmalar her bireyde farklı LDL altgruplarının bulunduğunu göstermiştir. Dansite gradient ultrasentrifugasyon, gradient jel elektroforezi ve PAGE (poliakrilamid jel elektroforezi) yöntemleri ile yedi ayrı LDL altgrubu saptanmıştır. Bununla beraber, LDL üç grup halinde sınıflandırılmaktadır(32). 22-25.5 nm arasındaki partikül boyutu küçük LDL (LDL-III), 25.6-26.5 nm arasındaki partikül boyutu orta LDL (LDL-II), 26.6-28.5 nm arasındaki boyut ise büyük LDL (LDL-I) LDL boyutunun 25.5 nm ve üstünde olması A patterni, 25.5 nm ve altında olması ise B patterni olarak tanımlanmıştır(25,53,54,55). Çapı 25.5 nm ve altında olan sdLDL'nin dansitesi 1.044-1.063 gr/ml dir(13).

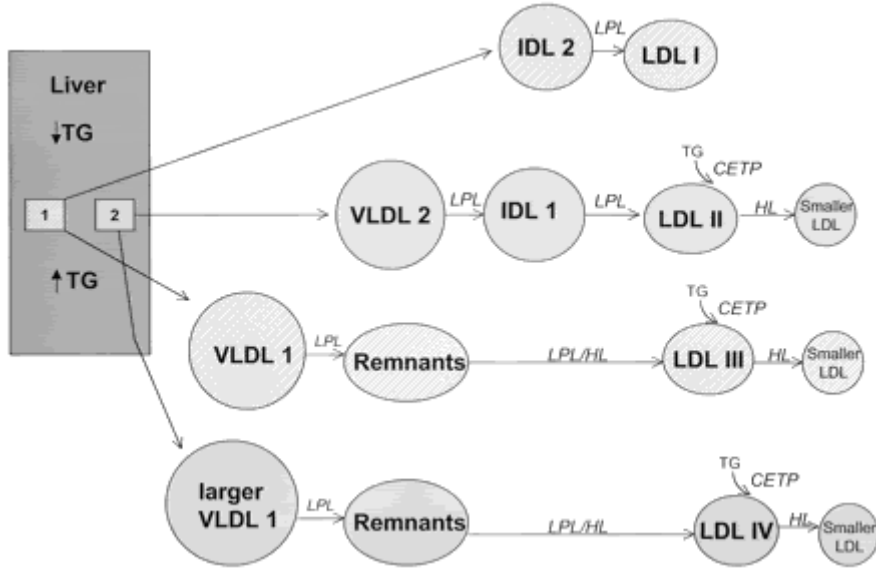
B patterni veya Aterojenik Lipoprotein Profili (ALP) olarak adlandırılan tablo sdLDL partiküllerinin hakimiyeti ile karakterizedir. Bu fenotipin diğer özellikleri artmış IDL ve TG'den zengin lipoprotein kalıntıları, azalmış HDL-C, insülin direnci ve abdominal obezitedir(32,53,55,56,57,58). ALP, son zamanlarda ayrı bir dislipidemi olarak tanımlanmıştır. Bu dislipidemi, insülin direnci, tip 2 diabetes mellitus ve metabolik sendromda rastlanan karakteristik lipoprotein metabolizma bozukluğudur(32). Anjiyografik olarak belirlenmiş KKH olan hastaların % 40-50'sinde ALP bulunduğu bildirilmiştir ve bu fenotipin varlığı KKH riskini 2-7 kat artırır(32,58). sdLDL fenotipi KKH riskini yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, serum LDL-C, HDL-C ve TG konsantrasyonlarından bağımsız olarak artırmaktadır(11,12,55,59,60). KKH olan hastaların yarısından fazlasında, LDL-C'nin normal düzeyde olması LDL partikül boyutu ile açıklanabilir(96). Ayrıca sdLDL'nin karotis arter ateroskleroza ile ilişkili olduğu bildirilmiştir(61).

Yapılan çalışmalarda sdLDL fenotipinin otozomal dominant veya kodominant kalıtım ile geçtiği gösterilmiştir. ALP'nin geni 19. kromozoma lokalizedir. LDL partikül boyutundaki farklılıklarının kalıtsal geçişinin %35-45 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bu da, kalıtım dışı ve çevresel faktörlerin önemini gösterir(32,52,53,56,57). B patterni olarak isimlendirilen bu özelliğin erişkin erkeklerdeki prevalansının % 30-35, 20 yaşın altındaki erkekler ve premenapozal kadınlarda % 5-10, postmenapozal kadınlarda ise % 15-25 olduğu sanılmaktadır(53,56). O halde, bu fenotipin prevalansı premenapozal kadınlar ve genç erkeklerde düşük olup yaş ile birlikte artar. Kadınlarda sdLDL'nin daha az sıklıkta bulunmasının nedeni

estrogenin hepatik lipaz aktivitesini inhibe etmesidir. Hepatik lipazın aktivitesi kadınlarda aynı yaştaki erkeklere göre iki kat azdır(32).

B patternindeki kişilerin plazma TG'leri büyük LDL (A patterni) taşıyan kişilere göre iki kat daha yüksektir. Ayrıca B patterninde apo B, IDL, düzeyi daha yüksek, HDL-C ve apo A-I ise daha düşüktür(53,56,62). sdLDL, insülin direnci, Tip 2 diabetes mellitus, metabolik sendrom, renal hastalık ve preeklampside artmaktadır. Ayrıca yağdan fakir ve karbohidrattan zengin beslenme bu fenotipe yatkınlığı olan kişilerde sdLDL'nin artmasına zemin hazırlar. Yine, familyal kombine hiperlipidemide B fenotipinin sıklığı artar(32,57).

sdLDL oluşumundaki kilit nokta TG yüksekliğidir. Artmış hepatik lipaz ve CETP aktivitesi de sdLDL oluşumunda rol oynar. Hafif veya orta derecede TG yüksekliğinde, büyük VLDL partiküllerinin (VLDL1) oranı artar. VLDL1'in yıkımı ile oluşan LDL'nin apo B-100 konformasyonu değiştiğinden LDL reseptörüne bağlanma özelliği azalmış, dolaşımda kalma süresi uzamıştır. LDL partikülleri, VLDL1'den trigliserid alırlar; karşılığında bu lipoproteinlere kolesterol esterleri ile fosfolipidleri transfer ederler. Bu transfer, CETP aracılığı ile gerçekleşir. CETP düzeyi yüksek olan bireylerde LDL'ye TG transferi hızlanmıştır(32). TG'den zengin hale gelen LDL partikülleri hepatik lipaz için substrat olur. Hepatik lipazın hidrolizi ile yağ asitleri açığa çıkar ve apoprotein/lipid oranı yüksek sdLDL partikülleri oluşur(32,61). VLDL lipoprotein lipaz tarafından hidroliz edilirken, hepatik lipazın IDL ve LDL'ye olan afinitesinin daha yüksek olduğu bilinmektedir(56). Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi ile yapılan çalışmalarda hipertrigliseridemili bireylerde sdLDL alt grubunun artmış olduğu kanıtlanmıştır(63). Ayrıca, TG düzeyi yüksek bireylerde HDL ile TG'den zengin lipoproteinler arasında, kolesterol esteri ve TG alışverişi gerçekleşir; TG'den zengin hale gelen HDL'nin yapısındaki TG'lerin hepatik lipaz tarafından hidrolize uğramasıyla daha küçük ve yoğun HDL partikülleri oluşur(53,64). Meydana gelen bu HDL dolaşımdan hızla uzaklaştırılır. Sonuçta HDL'nin revers kolesterol transportunu sağlaması kısıtlanmış olur(53,65). Artmış hepatik lipaz aktivitesinin plazma HDL düzeyini azaltması, sdLDL ile düşük HDL konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi açıklayabilir(25).



Şekil 3. sdLDL'nin oluşumu.

sdLDL partiküllerinin LDL reseptörüne afiniteleri düşük, oksidasyona olan yatkınlıkları yüksektir. Yarı ömürleri daha uzun olup, dolaşımdan daha güç uzaklaştırılırlar. Plazmada daha uzun süre kalmaları nedeniyle oksidasyona uğrama olasılıkları artar(25,32,53,55). sdLDL partiküllerinin serbest kolesterol içeriğinin düşük, çoklu doymamış yağ asidi içeriğinin ise daha yüksek olması oksidasyona olan yatkınlıklarına katkıda bulunabilir(57). İntimaya daha kolay penetre olup, burada daha uzun süre kalmalarının nötral karbonhidrat içeriklerinin düşük olmasına bağlı olduğu sanılmaktadır(53). sdLDL'nin endoteldeki proteoglikanlara karşı afinitesi yüksektir(25,32,53,61). Bundan başka, aterosklerozun patogenezinde önemli rolü olan Lipoprotein Fosfolipaz A2 adlı enzimi taşırlar. Bu değişiklikler, sdLDL partiküllerinin makrofajlar tarafından alımını ve köpük hücre oluşum hızını artırır(32,52). Öte yandan familial hiperkolesterolemide büyük, kolesterolden zengin LDL'nin arttığı ve bu büyük LDL'nin de prematür aterosklerozdan sorumlu olduğu bilinmektedir. Bu da, her iki LDL altgrubunun aterojenik olduğunu gösterir, ancak hangi LDL'nin daha aterojenik olduğu açıklığa kavuşmamıştır(25).

Ateroskleroz Gelişiminde Rol Oynayan Diğer Etkenler

Hemostatik Faktörler: Ateroskleroz gelişimi ile ilişkili olan çeşitli hemostatik ajanlar mevcuttur. Bunlar; fibrinojen, faktör VII, Faktör VIII, antitrombin III, PAI-1, Lp(a) ve antifosfolipid antikorlarıdır. Tüm bu trombojenik faktörler içinde en belirgin

ilişkiyi plazma fibrinojeni taşımaktadır. Leigh çalışmasında, fibrinojen konsantrasyonu ile iskemik kalp hastalığı arasındaki ilişkinin total kolesterol, kan basıncı ve sigara içiminden daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Fibrinojenin fibrinin prekürsörü olması ve kan viskozitesini artırması nedeniyle tromboz oluşumunu kolaylaştırdığı düşünülmektedir (2).

HDL'nin rolü: HDL, kolesterolün ekstrahepatik dokulardan alınması ve karaciğere transportunda görev alır. Bu işlev “Revers Kolesterol Transportu” olarak bilinir(23). Son yıllarda HDL'nin revers kolesterol transportu dışında başka antiaterojenik özellikleri olduğu anlaşılmıştır. HDL, LDL'yi oksidasyondan koruyabilir(67,68,69). HDL partikülünün yapısında olan paraoksonaz (PON1) ve Platelet Activating Factor(PAF)-asetil hidrolaz adlı iki enzim lipid peroksidasyonu sonucu oluşan okside fosfolipidleri detoksifiye eder; ayrıca bu enzimlerin okside LDL'nin indüklediği transdüksiyon sinyallerini inhibe ettikleri ileri sürülmüştür(68). İnsanda yaşlanma ile, PON1 aktivitesi azalmaktadır(70). Öte yandan, subendotelyal alanda HDL'nin oksidasyonu, aterosklerotik sürecin gelişimine katkıda bulunabilir. Okside HDL'nin aterojenik özelliklerinin, kolesterolü dokulardan alma kapasitesinin düşmesine ve LCAT aktivitesinde oluşan azalmaya bağlı olduğu sanılmaktadır(68).

2.2.5. Ateroskleroz ve Koroner Kalp Hastalığı Gelişiminde Risk Faktörleri

Aterosklerozun gelişiminde genetik ve çevresel faktörlerin rolü vardır. Bu risk faktörleri şunlardır:(2)

Major Pozitif Risk Faktörleri

- ✓ Yaş: Erkeklerde 45 yaş üzeri, kadınlarda 55 yaş üzeri veya estrogen replasman tedavisi yapılmadan erken menapoz girilmesi.
- ✓ Ailede erken koroner kalp hastalığı öyküsü.
- ✓ Sigara içilmesi.
- ✓ Hipertansiyon (KB \geq 140/90 olması) veya antihipertansif kullanımı.
- ✓ Diabetes Mellitus.
- ✓ Düşük HDL-C düzeyi (<40 mg/dL).

Diğer risk faktörleri

- ✓ Obezite.
- ✓ Fiziksel inaktivite.
- ✓ Lp(a) yüksekliği.

- ✓ Homosistein yüksekliği.
- ✓ TG yüksekliği.
- ✓ Remnant (kalıntı) lipoprotein yüksekliği.
- ✓ Metabolik Sendrom.
- ✓ Protrombotik ve proinflamatuvar faktörler.
- ✓ Bozulmuş açlık glukozu.
- ✓ Subklinik aterosklerotik hastalık (Periferik arter hastalığı, abdominal aort anevrizması, karotis arter hastalığı)

Negatif Risk Faktörleri

- ✓ Yüksek HDL-C (60-90 mg/dL).

2.3. LDL-C ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

2.3.1. Kromatografi

LDL-C tayininde çeşitli kromatografik sistemler ve kolonlar kullanılmaktadır. Sık olarak kullanılan agaroz kolon kromatografisidir. LDL-C, agaroz kolonlardan %90-98 oranında elde edilebilir. Agaroz kolon kromatografisinin en önemli dezavantajı, 24 saat gibi uzun bir süre alması ve homojen lipoprotein fraksiyonlarının elde edilmesinin mümkün olmamasıdır. Yüksek basınçlı jel filtrasyon kromatografisi ile lipoproteinlerin nispeten hızlı bir şekilde ve kimyasal yapıları bozulmadan elde edilmesi olasıdır.

Kromatografik yöntemler, lipoproteinlerin izolasyonu, sınıflandırılması, miktar tayini, karakterizasyonu ve saflaştırılmasında yararlı olan metodlardır. Ancak işlemlerin kompleks olması, uzun zaman alması ve deneyimli eleman gerektirmesi nedeniyle araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadırlar(71).

2.3.2. Elektroforez

Elektroforez, lipoproteinlerin net yüklerine ve büyüklüklerine göre ayırımını sağlar. Bu amaçla kağıt, selüloz asetat, agaroz, poliakrilamid gibi değişik taşıyıcı ortamlar ve sudan siyahı gibi lipofilik boyalar kullanılmaktadır(71). Ayrıca apo B'ye karşı antikorların kullanılmasıyla da LDL belirlenebilir(72).

Lipofilik boyalarla lipoproteinlerin asıl boyanan kısımları TG'lerin ester bağları ve esterleşmiş kolesteroldür. Serbest kolesterol ve fosfolipidler boyayı almazlar(73). Lipofilik boyalar belirli bir lipid sınıfı için spesifik olmadıklarından, elektroforez kantitatif bir yöntem olarak kullanılamaz(72).

Elektroforetogramda LDL bölgesinde görülen materyalin dansitometrik olarak saptanmasıyla LDL'nin yüzdesi belirlenebilir, ancak LDL ve VLDL arasındaki rezolusyonun sağlanması her zaman mümkün olmaz. Ayrıca boyanmanın şiddeti, tüm lipoproteinler için aynı değildir. Bu nedenlerle, lipoprotein elektroforezinin miktar tayininde kullanılması için kabul edilebilir bir presizyon ve doğruluğu yoktur. Ayrıca numunelerin çoğunda IDL ve Lp(a), LDL ile beraber göç etmediklerinden elektroforezin Friedewald formülü ve ultrasantrifugasyona olan eşdeğerliği tartışmalıdır(71,72).

2.3.3. Ultrasantrifugasyon

Ultrasantrifugasyonda lipoproteinlerin hidrate olmuş dansitelerine göre ayırımları yapılır. İlk kez 1950'lerde kullanılmaya başlayan ultrasantrifugasyonun değişik çeşitleri vardır(71).

Ardışık (sequential) Ultrasantrifugasyon : Analitik ultrasantrifugasyona göre daha az karmaşık ve nispeten daha ucuz bir yöntemdir. Burada plazma lipoprotein analizi için 1.006 kg/L dansitede tek ultrasantrifugasyon basamağı kullanılır. 109000 x g (39000 rpm)'de 18 saat süre ile yapılan ultrasantrifugasyondan sonra dansitesi 1.006 kg/L'den daha az olan VLDL ve ŞM'ler en üstte yüzerler. IDL, LDL, Lp(a) ve HDL ise infranatanтта kalır. TG'den zengin VLDL ve ŞM'lerin ortamdan uzaklaştırılır. Bu işlemin ardından KBr'ün ortama eklenmesi ve ultrasantrifugasyonun tekrarlanmasıyla, supernatanтта LDL kalır ve kolesterol içeriğinin ölçülmesiyle LDL-C düzeyi saptanır(6).

Ultrasantrifugasyonun en önemli dezavatajı, rutin kullanım için pratik olmamasıdır. Ultrasantrifugasyon uzun süren bir işlem olup özel ekipman ve tecrübeli teknisyen gerektiren pahalı bir yöntemdir. Bu işlem için fazla miktarda seruma gereksinim vardır(6,74). Ayrıca, labil yapıda olan lipoproteinler, yüksek tuz konsantrasyonu ve santrifugal kuvvetlerden etkilenerek değişime uğrayabilir(6). Bu nedenlerle ultrasantrifugasyon özellikle araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır.

β-kantitatif ölçüm

LDL tayininde definitif metod mevcut değildir(5). Ultrasantrifugasyonun presipitasyon ile kombine olarak kullanıldığı β-kantitatif ölçüm LDL-C tayini için "referans metod" olarak kabul edilir(6,17).

β- kantitatif ölçümde serumun 18 saat 105000 x g'de santrifüj edilmesiyle VLDL ve ŞM'ler en üstte yüzer. TG'den zengin bu lipoproteinler ortamdan "tube slicing" ile

uzaklaştırılır. İnfranatantta LDL, IDL ve Lp(a) ve HDL kalır. Apo B içeren LDL, IDL ve Lp(a) heparin-Mn kullanılarak çöktürülür. İnfranatantın total kolesterol ve HDL-C içeriği Abell-Kendall metodu ile ölçülür. Total kolesterol değerinden HDL-C değerinin çıkarılmasıyla LDL-C konsantrasyonu hesaplanır. β -kantitatif ölçüm ile ölçülen LDL-C fraksiyonu içinde IDL ve Lp(a) da yer alır(6,17).

2.3.4. Friedewald Formülü

Friedewald 1972 yılında, ultrasantrifugasyona alternatif olarak kendi adıyla anılan formülü geliştirmiştir(75). İlk önce epidemiyolojik çalışmalar için önerilen formül özellikle ekonomik olması nedeniyle, klinik laboratuvarlar tarafından hemen kullanılmaya başlandı. Halen bütün dünyada en yaygın olarak kullanılan yöntemdir(6).

Friedewald formülünün prensibi VLDL'nin dolaşımdaki TG'lerin çoğunu taşımasına dayanır. VLDL'deki TG/kolesterol oranı yaklaşık olarak beştir ve Friedewald bu gerçekten yola çıkarak VLDL-C'ün total TG'den hesaplanabileceğini düşünmüştür(6).

$VLDL-C = TG/5$ (mg/ dL için), $VLDL = TG/2.22$ (mmol/L için).

$LDL-C = \text{Total kolesterol} - (\text{Ölçülen HDL-C} + TG/5)$ (75).

Friedewald formülü pratikte hastaların çoğunda kullanılabilir. Bunun nedenleri, plazma TG düzeylerinin 95.persantil için 300 mg/dL'nin altında olması, açlık kanında ŞM'lerin bulunmaması ve toplumdaki tip III hiperlipidemi prevalansınının %0.1-0.2 civarında olmasıdır(17). Ayrıca Friedewald formülü ile ölçülen değer IDL ve Lp(a) gibi partikülleri de kapsadığından aterosjenik indeks hakkında fikir verir(74).

Friedewald formülünün bazı koşullarda kullanılmaması gerekir. ŞM'lerde TG'ler çok yüksek oranda bulunduğu için serumda ŞM'lerin olması, VLDL-C'nin gerçek değerinin üzerinde hesaplanmasına, dolayısıyla LDL-C'nin gerçek değerinin altında hesaplanmasına yol açacaktır(5,6). Bu nedenle Friedewald formülü en az 12 saatlik açlık sonrası alınan numunelerde kullanılmalıdır. Friedewald formülünün kullanılmaması gereken ikinci durum, TG düzeyinin 400 mg/dL'nin (4.52 mmol/L) üzerinde olmasıdır(6,17). Bu durumda numunede, ŞM'ler, ŞM ve VLDL kalıntıları gibi TG'den zengin lipoproteinler bulunacağından, TG düzeyininin 5'e bölünmesiyle elde edilen VLDL-C değeri gerçeği yansıtmaz(17). TG konsantrasyonunun artmasıyla formül ile hesaplanan LDL-C'nin güvenilirliği azalır. TG konsantrasyonu 200 mg/dL'nin altında olan numuneler β -kantitatif ölçüm ile en uyumlu sonuçları verir(76).

Bu durumlar dışında, Friedewald formülü, Tip III hiperlipidemili hastalarda da kullanılmamalıdır. Bu hastalarda kalıntı lipoproteinler ve β -VLDL'deki kolesterol/TG oranı artmış olduğu için Friedewald formülü ile hesaplanan LDL-C düzeyi β -kantitatif ölçüme göre hesaplanan değerden daha yüksek bulunacaktır(6,17,24).

2.3.5. LDL Ölçümünde Kullanılan Direkt Yöntemler

Birinci Jenerasyon Yöntemler (Kimyasal presipitasyon metodları)

LDL heparin (pH 5.12'de), polivinil sülfat veya dekstran sülfat ile çöktürülür. LDL-C konsantrasyonu serum total kolesterolü ve supernatanttaki kolesterol farkından yola çıkılarak hesaplanır(6).

Presipitasyon yöntemleri daha pratik olan Friedewald formülünün yerini alamamıştır. Serum TG düzeyinin 400 mg/dL'yi aşması veya serbest yağ asitlerinin ortamda bulunması presipitasyon metodlarında interferansa yol açtıklarından rutin kullanıma girmemişlerdir(6).

İkinci Jenerasyon Yöntemler

1994 yılında immunoseparasyon metodu ile direkt LDL-C ölçümü kullanıma sunulmuştur. Bu methoda kullanılan reaktif insan apolipoprotein A-I ve E'ye karşı geliştirilmiş keçi poliklonal antiserumu ile kaplanmış polistiren lateks boncuklar içerir. Bu antikorlar; ŞM'ler, HDL, VLDL ve IDL'yi ortamdan uzaklaştırarak LDL-C'nin direkt ölçümüne olanak sağlar(6,71).

İmmunoseparasyon LDL için rölatif olarak spesifik olup, β -kantitatif ölçüm ile genel olarak uyum gösterir; ancak TG konsantrasyonu yüksek örneklerde eser miktarda VLDL saptanmıştır. Ayrıca Lp(a)'nın %75'i ölçülebilirken IDL'nin saptanması ise mümkün olmamıştır. Bu özellikler immunoseparasyon yöntemini, β -kantitatif ölçümden farklı kılmaktadır(6).

Üçüncü Jenerasyon Yöntemler (Homojen Yöntemler)

LDL-C ölçümü için homojen assayler 1998'de Japonya'da kullanıma girmiştir(77). Bu yöntemlerde diğer lipoprotein sınıflarını solübilize eden veya bloke eden çeşitli deterjan ve kimyasal ajanlar kullanılır. Burada amaç, LDL-C için spesifitenin artırılmasıdır. Diğer lipoprotein fraksiyonları bloke edildikten sonra, LDL'nin kolesterol içeriği enzimatik olarak ölçülür. Bütün firmalar otoanalizörlere adapte edilebilen iki reaktiften oluşan setler üretmektedirler. Homojen LDL-C ölçüm metodlarının asıl avantajı, otomatizasyona uyarlanabilir olması ve doğruluğun yüksek oluşudur. Diğer bir

avantaj ise, zamanlama ile sıcaklığın iyi bir şekilde kontrol edilmesi ve otomatik pipetleme nedeniyle presizyonun artmasıdır. Ayrıca presipitasyon yöntemleri ile kıyaslandığında, daha az numune hacmine gerek vardır ve otoanalizöre uyarlanabilmesi nedeniyle belirli bir sürede çok sayıda numune analiz edilebildiğinden işgücünden tasarruf sağlar(6,78).

Kullanılan homojen LDL assaylerinin prensipleri şöyle özetlenebilir(6):

Kyowa Medex

- HDL, VLDL ve ŞM'ler surfaktanlar ve karbonhidratlı bileşiklerle bloke edilir.
- LDL enzimler ve surfaktanlar ile solubilize edilir → Kolesterol + H₂O₂
2 H₂O₂ + 4-AA + HSDA + Enzim → renkli ürün

Daichi

- Surfaktan 1 + Enzimler sadece HDL-C, VLDL-C ve ŞM-C ile reaksiyona girerler. LDL dışı kolesterolden oluşan peroksidler, peroksidaz ile reaksiyona girer → renksiz ürün oluşur.
- LDL-C + Surfaktan 2 + coupler + Enzimler → Renkli ürün

Wako

- LDL + Koruyucu reaktif LDL'yi enzimatik reaksiyonlardan korur.
HDL-C, VLDL-C, ŞM-C + Enzimler → H₂O₂ + Katalaz → H₂O
- LDL-koruyucu reaktif + Deproteksiyon Yapan Reaktif → LDL
LDL-C + Enzimler → Kolesterol + H₂O₂
H₂O₂ + 4-AA + HDAOS → Renkli Ürün

Denka Seiken

- LDL dışı lipoprotein fraksiyonları + Surfaktan Kombinasyonu 1 + Enzimler → Kolesterol + H₂O₂
H₂O₂ + Katalaz → H₂O
- LDL-C + Surfaktan kombinasyonu 2 → Kolesterol + H₂O₂
Katalaz + Azid → İnhibisyon
H₂O₂ + 4-AA + HDAOS + Enzimler → Renkli ürün

International Reagents Corporation

- LDL + Calixarene → LDL-Calixarene solubl kompleksi
LDL dışı LP fraksiyonları + Enzimler (CE1) + Hidrazin → Kolesterol hidrazon
- LDL-C + β-NAD + Enzimler (CE2) → Kolesterol hidrazon + β-NADH

- AA: 4-aminoantipirin, CE: Kolesterol Esteraz, HSDA: N-(2-hidroksi-3-sülfopropil)-3,5-dimetoksianilin, sodyum tuzu, HDAOS: N-(2-hidroksi-3-sülfopropil)-3,5-dimetoksianilin.

2.3.6. sdLDL Tayin Metodları

sdLDL tayininde değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; gradient jel elektroforezi, dansite gradient ultrasantrifugasyon, yüksek performanslı jel-filtrasyon kromatografisi, elektron mikroskopisi, NMR spektroskopisi, analitik ultrasantrifugasyon, preparatif ultrasantrifugasyon, HPLC ve analitik kapiler izotakoforezdir(13,25,53,63,79). Tüm bu yöntemler çok pahalı ve özel ekipman gerektiren metodlardır(79). sdLDL'nin kantitatif tayininde altın standart, analitik ve preparatif ultrasantrifugasyondur. Analitik ultrasantrifugasyon ile gravitasyonel alanda LDL'nin flotasyon hızı ölçülür. Flotasyon hızı ne kadar yüksekse LDL lipidden o kadar zengindir. Bu metod sadece birkaç araştırma laboratuvarında mevcuttur. Preparatif ultrasantrifugasyon ise, zahmetli. ve zaman alan bir yöntem olmasına karşın, LDL'nin yedi ayrı fraksiyona ayrılmasını sağlar. Nonequilibrium dansite gradient ultrasantrifugasyonu ise, analitik ultrasantrifugasyondaki prensiplere göre çalışır(25).

Gradient jel elektroforezi semikantitatif bir metoddur. Bu yöntemle belirli boyuttaki LDL'nin kantitatif tayini olası değildir; bize hakim olan LDL altgrupunun boyutu ve ortalama LDL partikül boyutu hakkında bilgi verir(25). Bu metod sdLDL konsantrasyonunun saptanması amacıyla Coomassie blue ile boyama ve lazer dansitometrisi kullanılarak geliştirilmeye çalışılmış, ancak yaygın olarak kabul görmemiştir(79). NMR yöntemi ile hem LDL'nin lipid konsantrasyonu ve partikül çapını ölçülebilir. Bu yöntem belirli bir boyutta olan lipoprotein partiküllerinin spektroskopik farklılıkları ilkesine dayanır ve ultrasantrifugasyonda olduğu gibi fiziksel separasyon gerektirmez(63). Partikül çapı yüzeyde bulunan fosfolipidlerden, konsantrasyon ise, kolesterol esterleri ve TG'lerde bulunan metil gruplarından gelen sinyallere göre belirlenir(25). Tam otomatize bir teknik olan ve bir dakikada sonuç veren NMR, LDL çapı ve altgrup konsantrasyonu hakkında bilgi veren en hızlı yöntemdir(25,63). Dezavantajları, çok yeni bir yöntem olması nedeniyle, geniş popülasyonlarda çalışmalar yapılmamış olması ve kalibrasyon sorunlarıdır(25).

sdLDL-C miktar tayininde son zamanlarda geliştirilen bir metod divalan katyonlar ve polianyonlar ile presipitasyon sonrası supernatantta kalan LDL-C'nin direkt olarak

tain edilmesidir(14). HDL-C tayini için geliştirilmiş olan presipitasyon metodlarında heparin, fosfotungstat, dekstran sülfat, polietilen glikol gibi polianyonlar ve Mg, Mn, Ca gibi divalan katyonlar kullanılır(14,17,24,80,81). Polianyonlar lipoproteinlerdeki pozitif yüklü gruplar ile reaksiyona girerken divalan katyonlar negatif yüklü gruplar ile etkileşime girerler, böylece apo B çöktürülerek supernatantta sadece HDL kalır(17). Presipitasyon reaktif konsantrasyonu, pH, iyonik güç ve diğer serum proteinlerinin varlığı gibi faktörlerden etkilenir(24). Hirano ve ark.ları, heparin-Mg kombinasyonunun tüm apo B içeren lipoproteinleri çöktürmediğini ve LDL'nin daha yoğun olan bölümünün supernatantta kaldığını göstermiştir. sdLDL'nin supernatantta kaldığı gradient jel elektroforez ile doğrulanmıştır. Supernatantta bulunan sdLDL-C homojen yöntem ile tayin edilmiştir. Ayrıca presipitasyon ile elde edilen sdLDL-C değerlerinin ultrasentrifugasyon ile elde edilen değerlere çok yakın olduğu görülmüştür(14).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Presizyon (tekrarlanabilirlik) değerlendirilmesi amacıyla 10 Ağustos 2005 tarihinde Haydarpaşa Numune Hastanesi polikliniklerine başvuran ve lipid paneli istenmiş olan yaklaşık 60 hastaya ait serumlarla farklı LDL-C konsantrasyonu içeren serum havuzları hazırlandı. Vitros direkt LDL-C (dLDL-C) reaktifi için üç düzeyde (düşük, orta ve yüksek), Sentinel dLDL-C reaktifi için iki farklı düzeyde (düşük ve yüksek) LDL-C içeren serum havuzları hazırlandı. Her seviyedeki havuzlar porsiyonlara bölünerek -20°C'de bekletildi. Presizyon çalışması için, NCCLS EP5-A protokolü uygulandı.

Vitros dLDL metodunun linearite (doğrusallık) çalışması için serum havuzu reaktifin dilüenti ile $\frac{3}{4}$, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{5}$ ve $\frac{1}{10}$ oranında dilüe edildi. Sentinel dLDL yönteminin linearitesi için, serum havuzları izotonik NaCl ile aynı oranlarda dilüe edildi.

Her iki metodun karşılaştırılması amacıyla 31 Ağustos - 9 Eylül 2005 tarihleri arasında hastanemize başvuran 122 hastanın serumu alındı. Seçilen serumların farklı düzeyde LDL-C içermesine ve hemolizli, bilirubinli olmamasına dikkat edildi. Alınan serumlar aynı gün içinde her iki direkt LDL-C yöntemi ile çalışıldı. Elde edilen sonuçlar Friedewald formülü ile karşılaştırıldı, ayrıca her iki yöntem arasındaki korelasyon değerlendirildi.

sdLDL-C tayini amacıyla 5 Ekim-17 Ekim 2005 tarihleri arasında Haydarpaşa Numune Hastanesi polikliniklerine başvuran 118 hastanın serumu alındı. Seçilen serumların farklı düzeyde total kolesterol, LDL-C, TG ve HDL-C içermesine dikkat edildi. Uygulanan çöktürme işlemi sonrası elde edilen supernatantlardaki LDL-C konsantrasyonu Sentinel dLDL-C ve Vitros dLDL-C reaktifleri kullanılarak ölçüldü.

3.2. Yöntem

Presizyon değerlendirilmesi: Gün içi presizyonun değerlendirilmesi amacıyla her seviyedeki havuzdan çalışmanın birinci günü sabah ve öğleden sonra on'ar kez okuma yapıldı. Her iki yöntemin günler arası presizyonunu değerlendirmek amacıyla serum havuzları 20 gün boyunca sabah ve öğleden sonra olmak üzere günde iki kez çalışıldı. Aynı günde iki çalışma arasında en az üç saat olmasına dikkat edildi ve her örnek her çalışmada çift çalışıldı. Her çalışmada kalite kontrolü sağlamak amacıyla iki seviyeli kontrol okutuldu. Elde edilen kontrol sonuçları ile Levey-Jenings grafiği çizildi ve

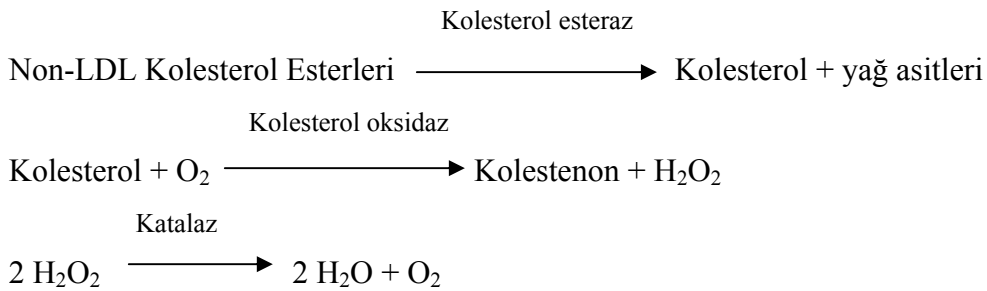
kalite kontrol ölçütlerine uymayan çalışmaların değerlendirme dışında tutulması amaçlandı.

Direkt LDL-C ölçüm prensibi

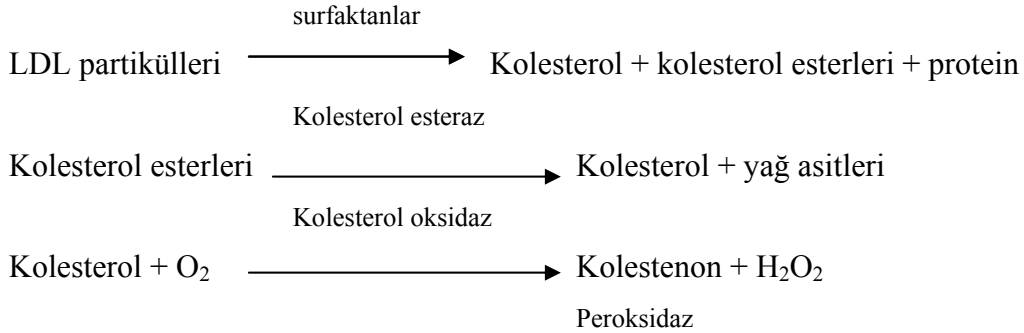
Vitros dLDL-C ölçüm prensibi: Vitros dLDL-C reaktif sistemi, iki reaktiften oluşan sıvı bir sistemdir. Birinci aşamada R1'in eklenmesiyle kolesterol esteraz ve kolesterol oksidazın katıldığı reaksiyonlarla LDL dışı kolesterol, selektif olarak ortamdan uzaklaştırılır. Bu reaksiyonlarda önce kolestenon ve daha sonra hidrojen peroksit oluşur. Ortaya çıkan hidrojen peroksit, katalaz ile su ve oksijene parçalanır. R2'nin eklenmesiyle katalaz sodyum azid tarafından inaktive edilir. Sonraki aşamada, surfaktanlar LDL partiküllerindeki serbest kolesterol ve kolesterol esterlerinin disosiyasyonunu sağlarlar. Kolesterol esteraz ve kolesterol oksidazın katalizlediği reaksiyonlarla oluşan hidrojen peroksit, peroksidazın varlığında TOOS ve 4-aminoantipirin ile reaksiyona girer ve renkli quinon pigmenti oluşur. Oluşan renkli ürünün 600 nm'de absorbansının ölçümüyle serum LDL-C değeri belirlenir. Vitros dLDL-C tayini Vitros 5.1 (Johnson & Johnson) cihazında yapıldı (Ref: 6801728).

Sentinel dLDL-C ölçüm prensibi : Birinci aşamada ŞM, VLDL ve HDL spesifik koşullarda ortamdan uzaklaştırılır. Bu fraksiyonlardan açığa çıkan kolesterol, kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz tarafından kolestenon ve H₂O₂'ye oksitlenir. H₂O₂, katalaz tarafından yıkılır. İkinci aşamada ise, surfaktanlar LDL partiküllerinde bulunan serbest kolesterol ve kolesterol esterlerinin açığa çıkmasını sağlarlar. Kolesterol esteraz ve kolesterol oksidazın katalize ettiği reaksiyonlar sonucu oluşan quinon pigmentinin rengi numunedeki LDL-C konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Sentinel dLDL-C tayini Aeroset (Abbott) otoanalizöründe yapıldı (Ref 17203B, Ref:17203A).

1.aşama: R1'in eklenmesi- ŞM, VLDL ve HDL'deki kolesterolün eliminasyonu



2.aşama: R2'nin eklenmesi- LDL-C'nin spesifik olarak ölçümü.



TOOS: N-Etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil-3-metilanilin)

Reaktifler

Total kolesterol tayini: Enzimatik yöntemle (kolesterol esteraz ve kolesterol oksidaz) Aeroset (Abbott) cihazında yapıldı(List no.7D62-20 30-3059/R2).

TG tayini: Aeroset (Abbott) otoanalizöründe enzimatik metodla (lipaz, gliserol kinaz ve gliserol fosfat oksidaz) yapıldı(List no. 7D74-20 30-3074/R2).

HDL-C tayini : Aeroset (Abbott) otoanalizöründe homojen yöntemle yapıldı(Ref : T10360).

Friedewald Formülü ile LDL-C Hesaplanması

Friedewald formülü ile LDL-C hesaplanması aşağıdaki formüle göre yapılmıştır(75):

$$\text{LDL-C} = \text{Total kolesterol} - (\text{HDL-C} + \text{TG}/5)$$

İki yöntemin birbiri ile ve Friedewald formülü kıyaslanması

122 hastanın serumları Sentinel dLDL-C ve Vitros dLDL-C yöntemleriyle çalışıldı. Numuneler Sentinel dLDL metodu ile Aeroset (Abbott) otoanalizöründe, Vitros dLDL metodu ile Vitros 5.1 (Johnson & Johnson) otoanalizöründe çalışıldı.

sdLDL-C tayini

İlk aşamada değişik konsantrasyonlarda total kolesterol, LDL-C ve TG içeren 118 serum örneğinde apolipoprotein A-I ve apolipoprotein B tayini yapıldı.

sdLDL-C tayini için Hirano ve ark.larının geliştirdiği çöktürme yöntemi uygulandı(14). Apo B içeren lipoproteinleri presipite etmek amacıyla 150 U/ml heparin sodyum tuzu (Sigma H-3393) ve 90 mmol/L MgCl₂ (magnezyum klorür) (Riedel 31413) içeren reaktif kullanıldı. Serum ve reaktifler eppendorflarda karıştırıldı. 0.2 ml'lik her serum örneğine 0.2 ml çöktürücü reaktif eklendi ve her numune 15 saniye

süreyle vorteks ile karıştırıldı. Numuneler benmaride 37 °C 'de 10 dakika süreyle inkübe edildi. Bu işlemi takiben, 15 dakika buz banyosunda bekletilen numuneler, 15 dakika süreyle 10900 rpm de (Abbott,10500 x g) santrifüj edildi. Elde edilen supernatantlar berraktı. Supernatantlardaki total kolesterol, TG, HDL-C, apo A-I ve apo B Aeroset (Abbott) otoanalizöründe tayin edildi. Supernatantta kalan LDL-C ise Sentinel dLDL-C ve Vitros dLDL-C reaktifleri ile tayin edildi. Sentinel dLDL-C Aeroset (Abbott) cihazına, Vitros dLDL-C ise Vitros 5.1 (Johnson & Johnson) cihazına aplike edilmişti.

Apolipoprotein A-I ve apolipoprotein B tayini Aeroset (Abbott) otoanalizöründe immunotürbidimetrik yöntemle yapıldı(Apolipoprotein A-I - List no. 9D92-20 30-3354/R1).

(Apolipoprotein B- List no. 9D93-20 30-3358/R1).

4- BULGULAR VE İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

4.1. Presizyon Çalışması

4.1.1. Presizyon (Sentinel dLDL-C)

1. Gün içi presizyon

Sentinel dLDL-C	Sabah	Öğleden sonra	t, p	Testin %95 Güven Aralığı
Düşük	125.60±0.55 (124,92-126,28)	123.50±0.71 (117,15-129,85)	t=4.305 p=0.008	{0,85}-{3,35}
Yüksek	166.00±1.58 (164,04-167,96)	163.50±0.71 (157,15-169,85)	t=2.062 P=0.094	{-0,62}-{5,62}

Tablo 1. Sentinel LDL'ye ait gün içi presizyon bulguları.

* Parantez içindeki değerler ortalamaların %95 güven aralığı değerleridir.

Düşük ve yüksek LDL-C düzeyleri için sabah ölçümleri normal dağılım gösteriyordu (n:5). (Kolmogorov-Smirnov düşük LDL-C için Z=0.822, P=0.510 ve yüksek LDL-C için Z=0.305, P=1.000). Bu nedenle parametrik testler (varyans analizi ve t testi) uygulandı.

Sabah ve öğleden sonra ölçümlerinin düşük LDL-C düzeyinde (F=0.060, P=0.817) ve yüksek LDL-C düzeyinde (F=1.250, P=0.314) belirlenen varyansları benzer olarak değerlendirildi.

İki ortalama arasındaki fark, düşük LDL-C düzeyinde istatistiksel olarak **anlamli fark gösteriyordu** (P<0.01). Yüksek LDL-C düzeyinde ise iki ortalama benzerdi (P>0.05).

2. Günler arası presizyon

a) Düşük LDL-C düzeyinde presizyon

Sabah Sentinel dLDL-C ölçümleri günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiyordu (Kruskall Wallis Testi, P>0.05).

Öğleden sonra yapılan Sentinel dLDL-C ölçümleri günler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiyordu (Kruskall Wallis Testi, P>0.05).

Gün boyu (sabah+öğleden sonra) yapılan Sentinel LDL-C ölçümleri günler arasında **istatistiksel olarak anlamlı fark gösteriyordu** (Kruskall Wallis Testi, P<0.05).

b) Yüksek LDL-C düzeyinde presizyon

Sabah Sentinel LDL-C ölçümleri günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiyordu (Kruskall Wallis Testi, $P>0.05$).

Öğleden sonra yapılan Sentinel LDL-C ölçümleri günler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiyordu (Kruskall Wallis Testi, $P>0.05$).

Gün boyu (sabah+öğleden sonra) yapılan Sentinel LDL-C ölçümleri günler arasında **istatistiksel olarak anlamlı fark gösteriyordu** (Kruskall Wallis Testi, $P<0.05$).

4.1.2. Presizyon (Vitros dLDL-C)

1. Gün içi presizyon

Vitros dLDL-C	Sabah	Öğleden sonra	t, p	Testin %95 güven aralığı
Düşük	114.17±1.65 (112,12-116,22)	114.98±1.73 (112,83-117,13)	t=-0.759 p=0.470	{-3,28}- {1,65}
Orta	166.71±2.20 (163,99-169,44)	168.20±2.04 (165,67-170,74)	t=-1.111 p=0.299	{-4,58}- {1,60}
Yüksek	203.27±2.82 (199,77-206,78)	203.98±3.41 (199,75-208,21)	t=-0.359 p=0.729	{-5,27}- {3,85}

Tablo 2. Vitros LDL-C'ye ait gün içi presizyon bulguları

* Parantez içindeki değerler ortalamaların %95 güven aralığı değerleridir.

Düşük, orta ve yüksek LDL-C düzeyleri için sabah ölçümleri normal dağılım gösteriyordu(n:5). (Kolmogorov-Smirnov düşük LDL-C için $Z=0.626$, $P=0.829$, orta LDL-C için $Z=0.719$, $P=0.680$ ve yüksek LDL-C için $Z=0.518$, $P=0.951$).

Düşük ve yüksek LDL-C düzeyleri için öğleden sonra ölçümleri de normal dağılım gösteriyordu(n:5). (Kolmogorov-Smirnov düşük LDL-C için $Z=0.611$, $P=0.849$, orta LDL-C için $Z=0.413$, $P=0.996$ ve yüksek LDL-C için $Z=0.649$, $P=0.794$). Bu nedenle parametrik testler (varyans analizi ve t testi) uygulandı.

Sabah ve öğleden sonra ölçümlerinin düşük LDL-C düzeyinde ($F=0.168$, $P=0.692$), orta LDL-C düzeyinde ($F=0.002$, $P=0.964$) ve yüksek LDL-C düzeyinde ($F=0.024$, $P=0.882$) belirlenen varyansları benzer olarak değerlendirildi.

Düşük, orta ve yüksek LDL-C düzeyinde sabah ve akşam ortalamaları (tablo 2) istatistiksel olarak benzer idi ($P>0.05$).

2. Günler arası presizyon

a) Düşük LDL-C düzeyinde presizyon

Sabah Vitros LDL-C ölçümleri günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiyordu (Kruskall Wallis Testi, $P>0.05$).

Öğleden sonra yapılan Vitros LDL-C ölçümleri günler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiyordu (Kruskall Wallis Testi, $P>0.05$).

Gün boyu (sabah+öğleden sonra) yapılan Vitros LDL-C ölçümleri günler arasında **istatistiksel olarak anlamlı fark gösteriyordu** (Kruskall Wallis Testi, $P<0.01$).

b) Orta LDL-C düzeyinde presizyon

Sabah Vitros LDL-C ölçümleri günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiyordu (Kruskall Wallis Testi, $P>0.05$).

Öğleden sonra yapılan Vitros LDL-C ölçümleri günler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiyordu (Kruskall Wallis Testi, $P>0.05$).

Gün boyu (sabah+öğleden sonra) yapılan Vitros LDL-C ölçümleri günler arasında **istatistiksel olarak anlamlı fark gösteriyordu** (Kruskall Wallis Testi, $P<0.01$).

c) Yüksek LDL-C düzeyinde presizyon

Sabah Vitros LDL-C ölçümleri günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiyordu (Kruskall Wallis Testi, $P>0.05$).

Öğleden sonra yapılan Vitros LDL-C ölçümleri günler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiyordu (Kruskall Wallis Testi, $P>0.05$).

Gün boyu (sabah+öğleden sonra) yapılan Vitros LDL-C ölçümleri günler arasında **istatistiksel olarak anlamlı fark gösteriyordu** (Kruskall Wallis Testi, $P<0.01$).

		<i>Sentinel dLDL-C</i>		<i>Vitros dLDL-C</i>		
Presizyon		Serum LDL-C düzeyleri (mg/dL)		Serum LDL-C düzeyleri (mg/dL)		
		130.05	162.85	119.02	174.79	215.57
Within run	SD	1.844	1.717	1.272	1.322	1.502
	%CV	1.42	1.05	1.06	0.76	0.69
Total	SD	2.249	2.124	4.403	8.401	8.837
	%CV	1.73	1.30	3.69	4.80	4.09

Tablo 3. Sentinel LDL-C ve Vitros LDL-C'ye ait çalışma içi(within run) ve total presizyon değerlendirme bulguları.

4.2.1. Linearite (*Sentinel dLDL-C*)

148 mg/dL konsantrasyonunda LDL-C içeren örnek sırasıyla, $\frac{3}{4}$ (0.75), $\frac{1}{2}$ (0.50), $\frac{1}{4}$ (0,25), $\frac{1}{5}$ (0.20) ve $\frac{1}{10}$ (0.10) oranla katılarak, sulandırıldı ve her sulandırma için iki örnek alındı. Her Sentinel dLDL ölçümü için beklenen değerden farkı (salt fark) ve beklenen değere göre yüzde olarak ne kadar sapma gözleendiği (oransal fark) belirlendi. 1. ve 2. ölçüm için fark ortalamaları ve fark yüzdeleri normal dağılım gösteriyordu (Kolmogorov-Smirnov testi, $P>0.05$). Bu gruplar istatistiksel olarak kıyaslandı.

Beklenen değere göre	Ölçüm	Mean±SD	İstatistiksel değerlendirme	Testin %95 güven aralığı
Salt farkı	1	3,48±0,84 (2,43-4,53)	(Levene testi, F=0.717, P=0.422).	{-0,99}- {0,99}
	2	3,48±0,46 (2,90-4,05)	(t=0.000, P=1.000)	
Oransal fark	1	0,11±0,09 (-0,00-0,23)	(Levene testi, F=0.717, P=0.422).	{-0,13}- {0,14}
	2	0,11±0,10 (-0,01-0,22)	(t=0.000, P=1.000)	

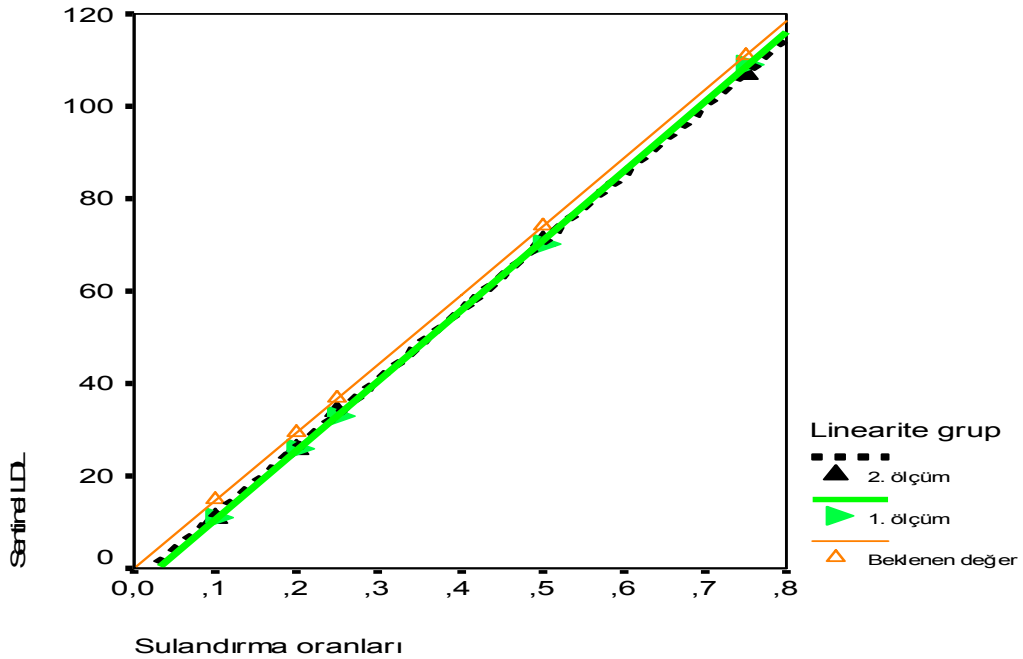
Tablo 4. Sentinel dLDL-C' ait linearite çalışmasına ait salt fark ve oransal fark değerleri.

* Parantez içindeki değerler ortalamaların %95 güvenlik aralığı değerleridir.

Birinci ve ikinci Sentinel dLDL-C ölçüm sonuçlarının beklenen değerden farkları (salt fark), varyansları istatistiksel açıdan benzer olarak değerlendirildi ($P>0.05$). Salt fark ortalamaları da iki grup için istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiyordu ($P>0.05$). Ancak iki ölçüme ait salt farklar birbirleri ile korelasyon göstermiyordu ($r=-0.741$, $P=0.152$).

Beklenen değere göre Sentinel dLDL-C ölçümleri ortalama 3.5 mg/dL'lik negatif bir sapma (sistemik hata) gösteriyordu. Sulandırma oranı arttıkça (LDL-C miktarı azaldıkça), sapma artıyordu.

İki ölçüme ait oransal farklar birbirleri ile korelasyon gösteriyordu ($r=0.158$, $P=0.003$). Beklenen değerden oransal farkların varyansları istatistiksel olarak iki ölçüm için benzerdi ($P>0.05$). Her iki ölçüm sonucu da beklenen değere göre, %11 lik negatif bir sapma (sistemik hata) göstermekteydi. Sulandırma oranı arttıkça (LDL-C miktarı azaldıkça), sapma artıyordu.



Grafik 1. Sentinel dLDL-C ölçüm sonuçlarının sulandırma oranlarına göre değişimi.

4.2.2. Linearite (Vitros dLDL-C)

151.65 mg/dL konsantrasyonunda LDL-C içeren numune sırasıyla, $\frac{3}{4}$ (0.75), $\frac{1}{2}$ (0.50), $\frac{1}{4}$ (0,25), $\frac{1}{5}$ (0.20) ve $\frac{1}{10}$ (0.10) oranla katılarak, sulandırıldı ve her sulandırma için iki örnek alındı. Her Vitros LDL-C ölçümü için beklenen değerden

farkı (salt fark) ve beklenen değere göre yüzde olarak ne kadar sapma gözleendiği (oransal fark) belirlendi. 1. ve 2. ölçüm için fark ortalamaları ve fark yüzdeleri normal dağılım gösteriyordu (Kolmogorov-Smirnov testi, $P>0.05$). Bu gruplar istatistiksel olarak kıyaslandı.

Beklenen değere göre	Ölçüm	Mean±SD	İstatistiksel değerlendirme	Testin %95 güven aralığı
Salt farkı	1	4,65±2,98 (0,95-8,35)	(Levene testi, F=0.008, P=0.932).	{-3,75}-{4,95}
	2	4,05±2,99 (0,34-7,76)	(t=0.318, P=0.759)	
Oransal fark	1	0,18±0,19 (0,01-0,42)	(Levene testi, F=0.156, P=0.704).	{-0,22}-{0,31}
	2	0,17±0,20 (-0,08-0,42)	(t=0.401, P=0.699)	

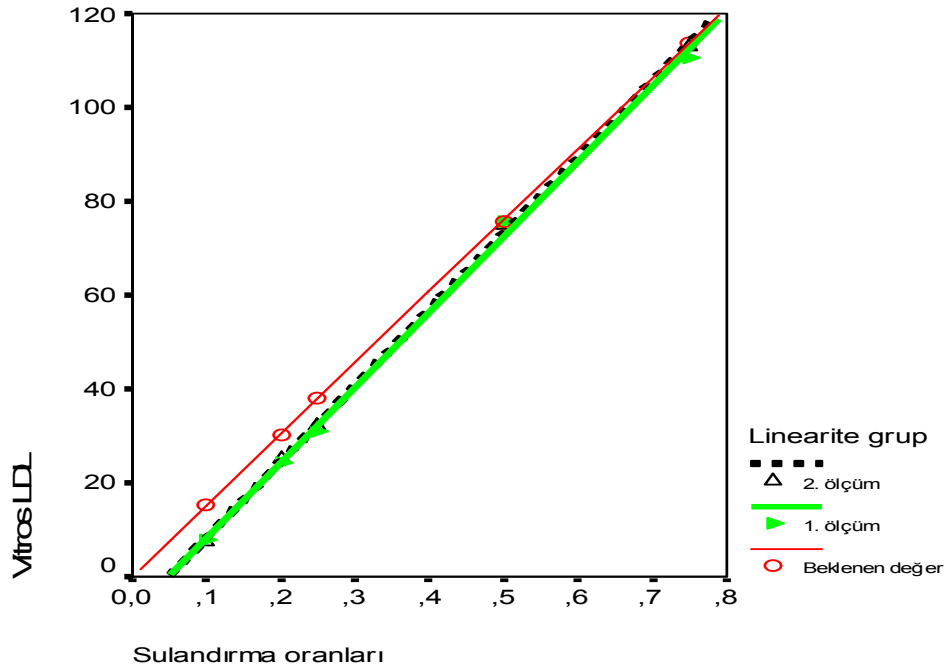
Tablo 5. Vitros dLDL'ye ait linearite çalışmasına ait salt fark ve oransal fark değerleri.

* Parantez içindeki değerler ortalamaların %95 güvenlik aralığı değerleridir.

İki ölçüme ait salt farklar ($r=0.904$, $P=0.035$) ve oransal farklar ($r=0.992$, $P=0.001$) birbirleri ile anlamlı korelasyon gösteriyordu ($P<0.05$).

Birinci ve ikinci Vitros dLDL ölçüm sonuçlarının salt farklarına ait varyansları istatistiksel açıdan benzer olarak değerlendirildi ($P>0.05$). Salt fark ortalamaları da iki grup için istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiyordu ($P>0.001$). Vitros dLDL-C ölçümleri beklenen değere göre ortalama 4-4.5 mg/dL lik negatif bir sapma gösteriyordu. Sulandırma oranı arttıkça (LDL-C miktarı azaldıkça), sapma artıyordu.

Beklenen değerden oransal farkların varyansları istatistiksel olarak iki ölçüm için benzerdi ($P>0.05$). Oransal fark ortalamaları da iki grup için istatistiksel olarak anlamlı fark göstermiyordu ($P>0.001$). Her iki ölçüm sonucu da beklenen değere göre, %17 ile %18 arasında bir negatif sapma göstermekteydi. Sulandırma oranı arttıkça (LDL-C miktarı azaldıkça), sapma artıyordu.



Grafik 2. Vitros LDL-C ölçüm sonuçlarının sulandırma oranlarına göre değişimi.

4.3. Vitros dLDL, Sentinel dLDL, Friedewald LDL ile bulunan LDL-C düzeylerinin karşılaştırması

Hastaların %28.7 (n:35)'i erkek, %71.3 (n:87)'si kadın idi. Yaş ortalaması 51.64 ± 1.24 yıl olarak belirlendi ve normal dağılım gösteriyordu ($Z=0.784$, $P=0.571$). Diğer değişkenlere ait ortalama \pm SD değerleri ve normal dağılıma uygunluğu tablolarda verildi.

Descriptive Statistics

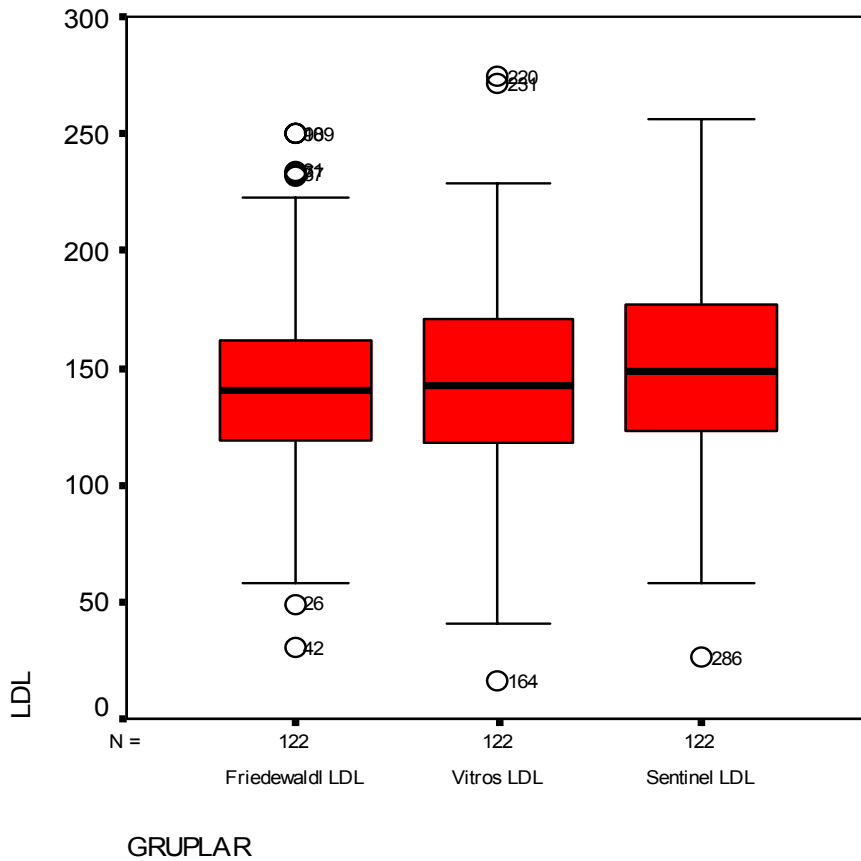
	N	Range	Minimum	Maximum	Mean		Std.	Variance
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic	Statistic
Yaş (Yıl)	122	67	19	86	51,64	1,24	13,704	187,786
Total Kolesterol	122	288,00	79,00	367,00	222,6803	4,5091	49,80462	2480,500
Trigliserid	122	349,00	42,00	391,00	157,2377	8,0582	89,00590	7922,050
VLDL	122	70,00	8,00	78,00	31,4918	1,6138	17,82479	317,723
HDL	122	67,00	29,00	96,00	50,2131	1,0341	11,42147	130,450
LDL (Friedewald)	122	220,00	30,00	250,00	140,8115	3,6861	40,71476	1657,691
LDL (Vitros)	122	258,33	15,95	274,28	145,6790	4,0920	45,19794	2042,854
LDL (Sentinel)	122	230,00	26,00	256,00	152,4426	4,0073	44,26200	1959,125
Valid N (listwise)	122							

Tablo 6. Vitros dLDL-C, Sentinel dLDL-C ve Friedewald LDL-C karşılaştırma çalışmasındaki hastaların lipid parametrelerinin ortalama \pm SD değerleri ve dağılımları.

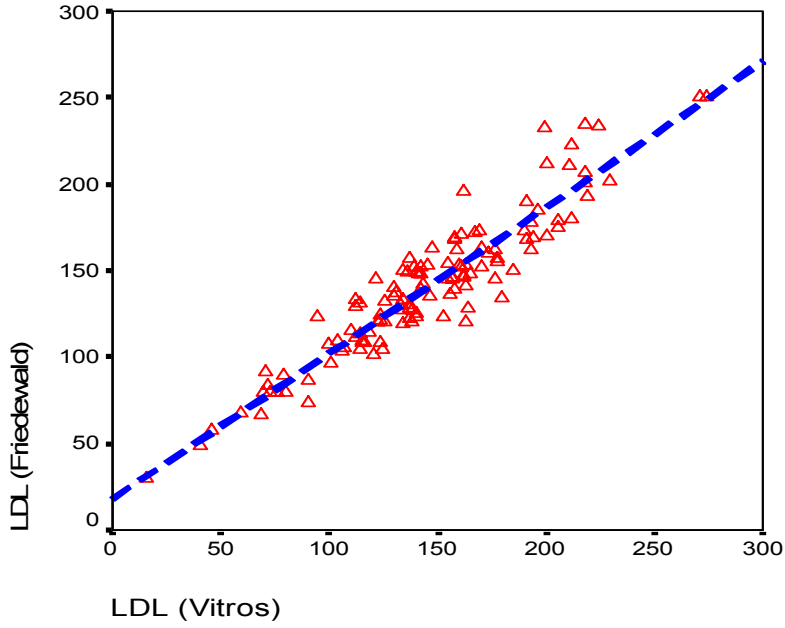
Friedewald LDL-C, Vitros dLDL-C ve Sentinel dLDL-C değerlerine ait ortalamalar kıyaslandı. Üç grup istatistiksel olarak birbirinden anlamlı düzeyde farklı idi (Friedman testi, $\chi^2=45.910$, $P=0.000$).

Yapılan ileri istatistiksel değerlendirmede, ikili gruplar halinde kıyaslama yapıldı. Friedewald LDL-C ile Vitros LDL-C arasında ($t=-3.365$, $P=0.001$), Friedewald LDL-C ile Sentinel LDL-C arasında ($t=-8.122$, $P=0.000$); ve Vitros LDL-C ile Sentinel LDL-C arasında ($t=-4.292$, $P=0.000$) istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi ($P>0.01$).

Vitros LDL-C ile Friedewald LDL-C arasında 4.87 ± 15.98 mg/dL, Sentinel LDL-C ile Friedewald LDL-C arasında 11.63 ± 15.82 mg/dL, Sentinel LDL-C ile Vitros LDL-C arasında 6.76 ± 17.41 mg/dL fark vardı.

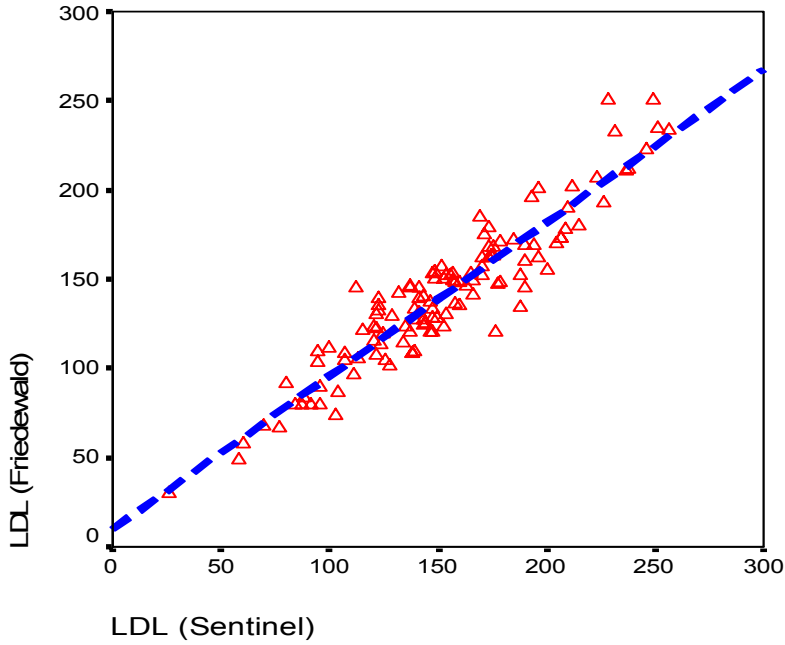


Grafik 3. Friedewald formülü ile bulunan LDL-C değerlerinin Vitros dLDL-C ve Sentinel dLDL-C ile karşılaştırılması.



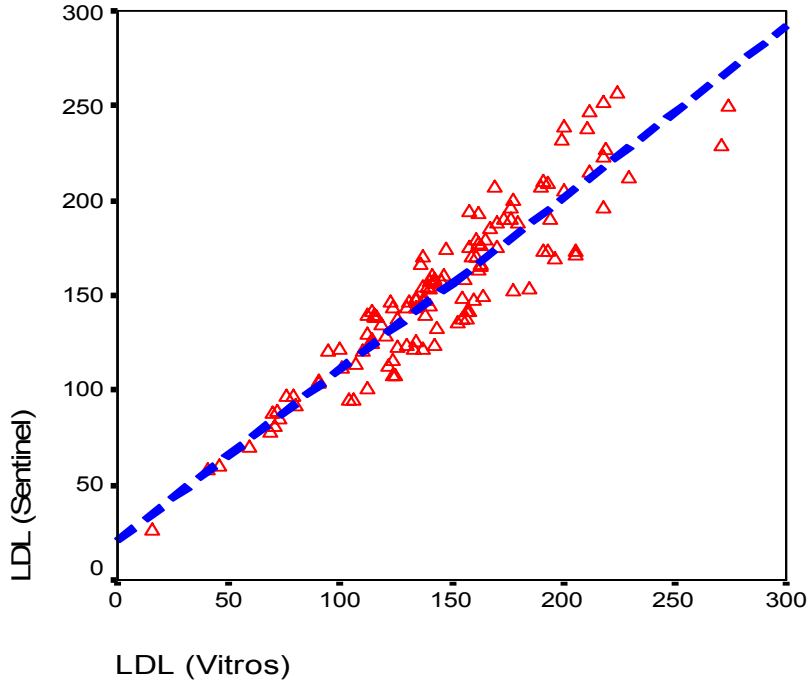
Grafik 4. Friedewald formülü ile bulunan LDL-C ile Vitros ile bulunan direkt LDL-C'nin kıyaslanması.

Friedewald LDL-C ile Vitros dLDL-C arasında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı pozitif yönlü korelasyon vardır ($r=0,936$, $P=0,000$).



Grafik 5. Friedewald formülü ile bulunan LDL-C ile Sentinel ile bulunan direkt LDL-C'nin kıyaslanması.

Friedewald LDL-C ile Sentinel LDL-C arasında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı pozitif yönlü korelasyon vardır ($r=0,934$, $P=0,000$).



Grafik 10. Sentinel LDL-C ile Vitros LDL-C'nin karşılaştırılması.

Sentinel LDL-C ile Vitros LDL-C arasında istatistiksel açıdan ileri düzeyde anlamlı pozitif yönlü korelasyon vardır ($r=0,925$, $P=0,000$).

4.4. sdLDL-C çalışması

Hastaların %33.1 (n:39)'i erkek, %66.9 (n:79)'u kadın idi. Yaş ortalaması 51.86 ± 14.19 yıl olarak belirlendi ve normal dağılım gösteriyordu ($Z=0.756$, $P=0.618$). Serum ve supernatanta ait lipid parameterlerine ait ortalama \pm SD değerleri tablolarda verilmiştir.

	Grup	Mean	Std. Deviation	t (P)
T. Kolesterol	Serum	220,24	45,54	24,059 (0,000)
	Supernatant	104,28	25,84	
TG	Serum	137,08	69,44	12,970 (0,000)
	Supernatant	48,22	26,77	
HDL-C*	Serum	50,03	11,91	-4,462 (0,000)
	Supernatant	44,32	11,27	
VLDL-C*	Serum	27,40	13,88	-11,329 (0,000)
	Supernatant	9,66	5,28	
LDL-C	Serum	142,72	40,47	21,854 (0,000)
	Supernatant	50,24	21,81	
Apo-AI	Serum	161,08	24,11	-3,560 (0,000)
	Supernatant	172,56	25,43	
Apo-B	Serum	101,97	24,12	19,334 (0,000)
	Supernatant	44,76	21,25	

Tablo 7. Serum ve supernatant total kolesterol, TG, HDL-C, LDL-C, Apo A-I, Apo B değerlerinin karşılaştırması.

* Hem serum, hem de supernatant grupları normal dağılım göstermediği için, bu değişkenlerin istatistiksel karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi uygulanmış, diğer değişkenler için student t testi yapılmıştır.

Cinsiyete göre değerlerin istatistiksel karşılaştırması yapılmadan önce supernatant çalışmaları için ayrı ayrı cinsiyet alt gruplarının normal dağılıma uygunluğu test edildi.

Erkekler için ait supernatant değerlerinin tamamı normal dağılım gösteriyordu (Kolmogorov- Smirnov testi, $P>0,05$).

Kadınlara ait supernatant değerlerinden TG ($Z=1.492$, $P=0,023$) ve VLDL-C ($Z=1.831$, $P=0,002$) değerlerinin normal dağılım göstermediği belirlendi (Kolmogorov- Smirnov testi, $P<0.05$).

Supernatant çalışmasında, erkek ve kadınlara ait total kolesterol, TG, LDL-C, HDL-C, VLDL-C düzeyleri, Apo A-I, apo B, Vitros sdLDL-C, Sentinel sdLDL-C değerlerinin aritmetik ortalama ve SD değerleri ile bunların istatistiksel karşılaştırması aşağıdaki tabloda verilmiştir. Görüldüğü gibi, tüm değerlere ait ortalamalar erkek ve kadınlar arasında anlamlı fark göstermemektedir ($P>0.05$).

Supernatant

	Cinsiyet	N	Mean	Std. Deviation	t (P) .
Kolesterol	Erkek	39	98,13	21,87	-1,836 (0,069)
	Kadın	79	107,32	27,20	
TG	Erkek	39	48,62	24,78	0,112 (0,911)
	Kadın	79	48,03	27,86	
HDL-C	Erkek	39	41,54	11,97	-1,905 (0,059)
	Kadın	79	45,70	10,73	
VLDL-C	Erkek	39	9,69	4,91	0,049 (0,961)
	Kadın	78	9,64	5,49	
Apo-AI	Erkek	39	166,51	25,55	-1,833 (0,069)
	Kadın	79	175,54	24,99	
Apo-B	Erkek	39	44,31	20,18	-0,163 (0,871)
	Kadın	79	44,99	21,88	
sdLDL-C Sentinel	Erkek	39	43,08	17,87	-0,946 (0,346)
	Kadın	79	47,34	25,16	
sdLDL-C Vitros	Erkek	39	37,77	20,37	-1,150 (0,252)
	Kadın	79	43,51	27,70	

Tablo 8. Supernatantta bulunan lipid değerlerinin kadın ve erkeklere göre dağılımı.

Supernatantta Vitros sdLDL-C, Sentinel sdLDL-C karşılaştırıldı (tablo 9), iki ölçüm arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Sentinel sdLDL-C değeri daha yüksekti ($P < 0,05$). (Tablo 9).

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Sentinel sdLDL-C	118	14	170	45,93	23,020
Vitros sdLDL-C	118	5,84	169,34	41,61	25,568
Valid N (listwise)	117				

Tablo 9. Supernatantta Sentinel dLDL ve Vitros dLDL ile bulunan ortalama sdLDL-C \pm SD değerleri ve dağılımları.

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Yaş (yıl)	18	11	74	49,39	16,299
Kolesterol	18	103	195	162,67	31,537
TG	18	56	136	84,83	25,801
HDL-C	18	30	73	47,94	12,240
VLDL-C	18	11	27	16,89	5,155
LDL-C	18	48	127	97,83	24,067
Apo-A1	18	124	226	159,39	26,778
Apo-B	18	43	91	72,83	14,565
sdLDL-C Sentinel	18	14	74	30,56	14,630
sdLDL-C Vitros	18	5,84	75,80	24,79	16,935

Tablo 10. Normolipidemi grubunda bulunan serum lipid parametrelerinde düzey dağılımı.

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Yaş (yıl)	57	17	91	53,25	14,388
Kolesterol	57	174	398	232,49	35,668
TG	57	35	142	95,74	28,372
HDL-C	57	32	103	53,35	12,969
VLDL-C	57	7	28	19,18	5,695
LDL-C	57	130	319	159,82	31,140
Apo A-I	57	116	244	164,58	24,264
Apo-B	57	86	231	105,84	21,340
sdLDL-C Sentinel	57	18	170	43,68	23,491
sdLDL-C Vitros	57	7,54	169,34	39,1811	25,934

Tablo 11. Hiper LDL-C grubunda bulunan serum lipid parametrelerinde düzey dağılımı.

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Yaş (yıl)	15	22	70	47,80	11,669
Kolesterol	15	124	239	184,60	32,520
TG	15	156	391	243,73	61,511
HDL-C	15	29	70	42,13	9,501
VLDL-C	15	31	78	48,60	12,322
LDL-C	15	45	128	93,73	25,367
ApoA-I	15	117	212	153,00	23,812
Apo-B	15	56	114	88,60	17,324
sdLDL-C Sentinel	15	18	70	41,47	15,278
sdLDL-C Vitros	15	7,56	69,90	35,149	15,748

Tablo 12. Hipertrigliseridemi grubunda bulunan serum lipid parametrelerinde düzey dağılımı.

	N	Minimu m	Maximum	Mean	Std. Deviation
Yaş (yıl)	28	34	86	52,79	13,680
Kolesterol	28	207	312	251,39	30,552
TG	28	154	259	197,71	35,867
HDL-C	28	36	72	48,82	7,865
VLDL-C	28	31	52	39,54	7,270
LDL-C	28	130	219	163,00	25,817
Apo A-I	28	119	205	159,36	22,026
Apo-B	28	93	159	119,96	15,934
sdLDL-C Sentinel	28	30	118	62,79	20,543
sdLDL-C Vitros	28	21,82	120,64	60,842	22,822

Tablo 13. Kombine Hiperlipidemi grubunda bulunan serum lipid parametrelerinde düzey dağılımı.

İncelenen parametre	Normolipidemik (LDL<130, TG<150)	Hiper-LDL (LDL≥130)	Hipertrigliseridemi (TG≥150)	Kombine hiperlipidemi (LDL≥130, TG≥150)	F (P)
N	18	57	15	28	
Yaş (yıl)	49,39±16,30	53,25±14,39	47,80±11,67	52,79±13,68	1,165 (0,180)
Total Kolesterol (serum)	162,67±31,54	232,49±35,67	184,60±32,52	251,39±30,55	33,934 (0,000)
Trigliserid (serum)	84,83±25,80	95,74±28,37	243,73±61,51	197,71±35,87	110,792 (0,000)
HDL-C (serum)	47,94±12,24	53,35±12,97	42,13±9,50	48,82±7,87	4,293 (0,007)
VLDL-C (serum)	16,89±5,16	19,18±5,70	48,60±12,32	39,54±7,27	109,090 (0,000)
LDL-C (serum)	97,83±24,07	159,82±31,14	93,73±25,37	163,00±25,82	41,877 (0,000)
Apo AI (serum)	159,39±26,78	164,58±24,26	153,00±23,81	159,36±22,03	1,040 (0,378)
Apo B (serum)	72,83±14,57	105,84±21,34	88,60±17,32	119,96±15,93	26,380 (0,000)
sdLDL-C Sentinel	30,56±14,63	43,68±23,49	41,47±15,28	62,79±20,54	10,379 (0,000)
sdLDL-C Vitros	24,79±16,94	39,18±25,93	35,15±15,75	60,84±22,82	10,790 (0,000)
%sd LDL (Vitros ve Sentinel sdLDL-C ortalaması /serum LDL-C x100)	%28,3	%25,9	%40,8	%37,9	

Tablo 14. Normolipidemi ve değişik hiperlipidemi türlerinde serumda bulunan lipid parametreleri, Sentinel sdLDL-C, Vitros sdLDL-C ve % sdLDL-C (sdLDL-C'nin serum LDL-C'si içindeki yüzdesi) değerleri.

Yaş ortalaması lipid grupları için istatistiksel açıdan benzer olarak değerlendirildi ($P>0,05$). Apo A-I dışında tüm parametrelerin lipide mi grupları arasında anlamlı istatistiksel fark gösterdiği belirlendi ($P<0,001$). Karşılaştırma için Anova testi uygulandı.

Lipid gruplarının kıyaslaması için ANOVA testi uygulandı:

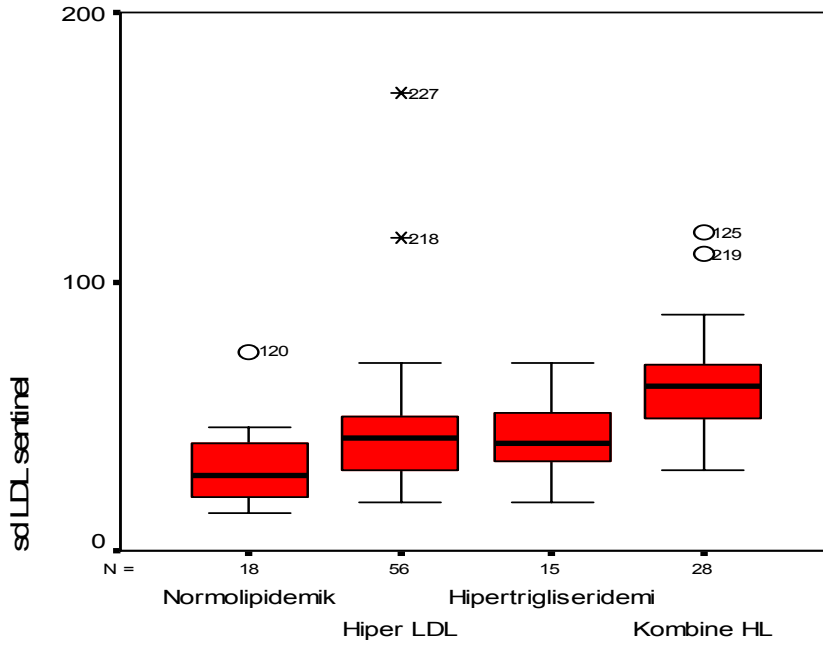
Değişkenlerin varyans homojenliği test edildi (Levene testi). Yaş, HDL-C, Apo A-I, sentinel sdLDL-C ve vitros sdLDL-C değişkenlerinin varyanslarının homojen olduğu ($P>0,05$), diğer değişkenlerin varyanslarının homojen olmadığı ($P<0,05$) belirlendi.

Yaş ($F=1,645$, $P=0,180$) ve Apo A-I ($F=1,963$, $P=0,120$) açısından gruplar arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi.

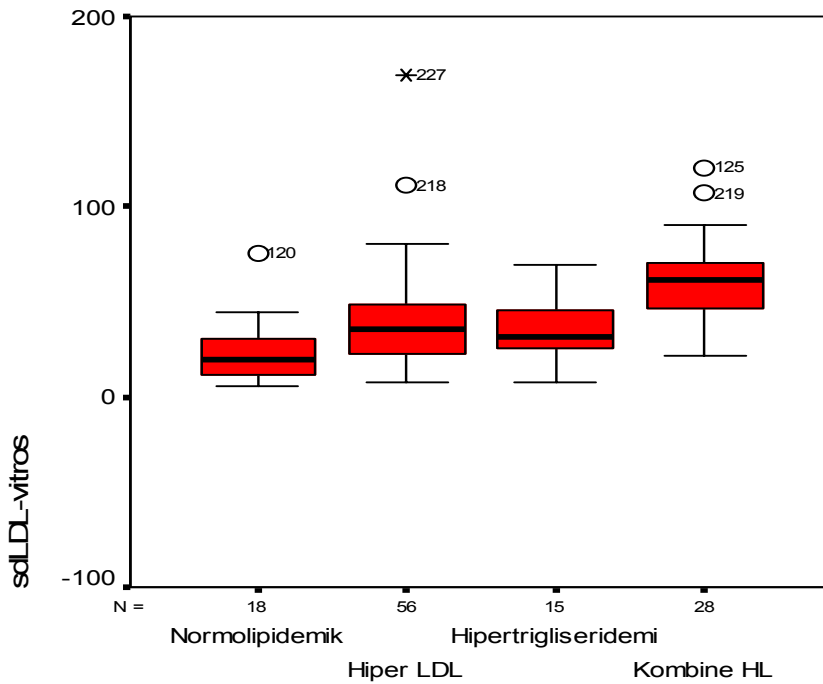
Kolesterol ($F=7,112$, $P=0,000$), **TG** ($F=36,624$, $P=0,000$), **HDL-C** ($F=8,734$, $P=0,000$), **VLDL-C** ($F=35,610$, $P=0,000$), **LDL-C** ($F=8,404$, $P=0,000$), **Apo B** ($F=8,842$, $P=0,000$), **Sentinel sdLDL-C** ($F=10,379$, $P=0,000$), **Vitros sdLDL-C** ($F=10,790$, $P=0,000$), değerlerinin gruplar arasında anlamlı farklılık gösterdiği belirlendi.

Yapılan ileri incelemede: Varyansları homojen gruplar için Bonferroni, varyansları eşit olmayan gruplar için Dunnett T3 testi uygulanarak farklılığın hangi gruplar arasında olduğu belirlendi.

Sentinel sdLDL-C ve Vitros sdLDL-C: Normolipidemik–hiper LDL-C, normolipidemik – kombine HL, kombine HL–hiper LDL, kombine HL–hipertrigliseridemi grupları arasındaki farkların anlamlı olduğu ($P<0,05$) görülmüştür. İncelenen bu grup farklılıkları aşağıdaki grafiklerde görselleştirilmiştir: (Grafik 7 ve 8).



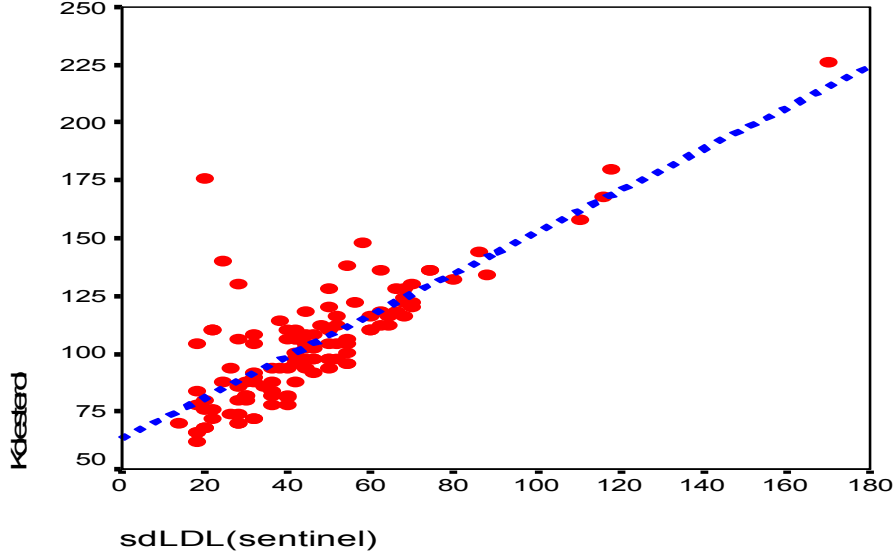
Grafik 7. Normolipidemi, hiper LDL-C, hipertrigliseridemi ve kombine hiperlipidemi gruplarında Sentinel dLDL ile bulunan sdLDL-C değerleri.



Grafik 8. Normolipidemi, hiper LDL-C, hipertrigliseridemi ve kombine hiperlipidemi gruplarında Vitros dLDL ile bulunan sdLDL-C değerleri.

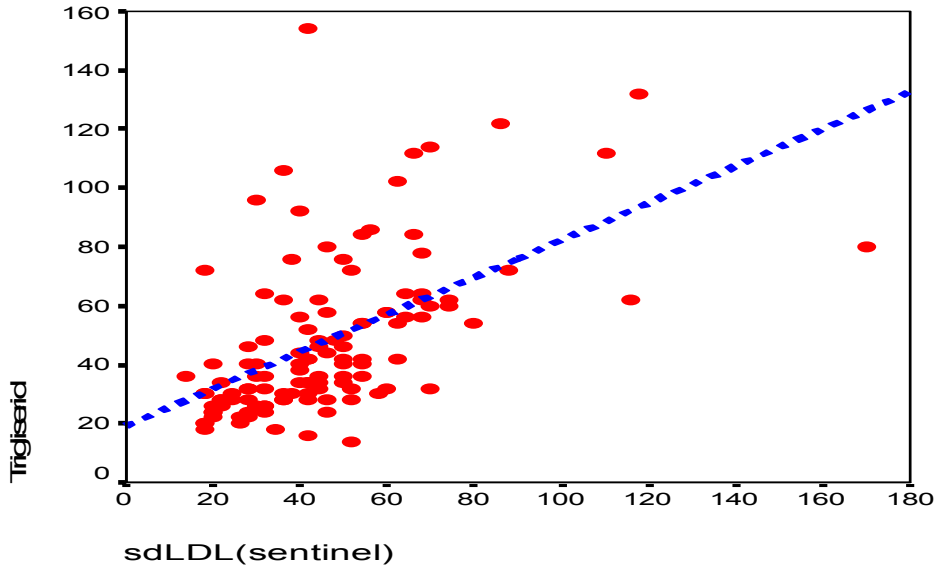
Aşağıdaki grafiklerin altlarında ilişki ile ilgili korelasyon katsayısı, p değeri ve ilişkinin yönü (pozitif/negatif) belirtilmiştir. Yanında açıklama verilmeyen ve “r” işareti

ile gösterilen katsayılar “Pearson korelasyon katsayıları”dır. Spearman korelasyon testi yapılanlar belirtilmiş ve Spearman korelasyon katsayısı “ r_s ” ile gösterilmiştir.

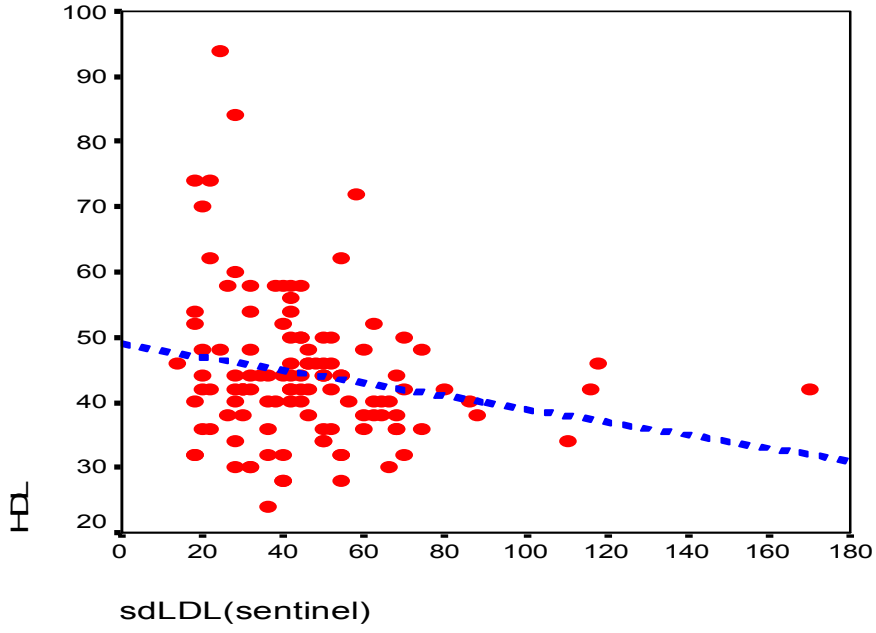


Grafik 9. Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum total kolesterolü arasındaki korelasyon.

Yukarıdaki değişkenler arasında anlamlı pozitif korelasyon vardır ($r=0,798$, $P=0,000$).

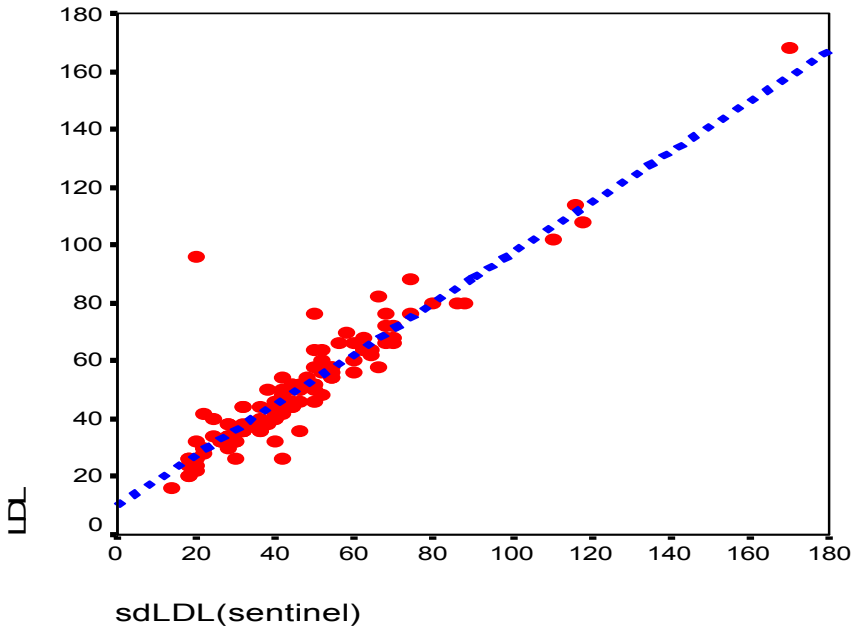


Grafik 10. Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum TG'si arasındaki ilişki. Yukarıdaki değişkenler arasında anlamlı pozitif korelasyon vardır ($r=0,542$, $P=0,000$).



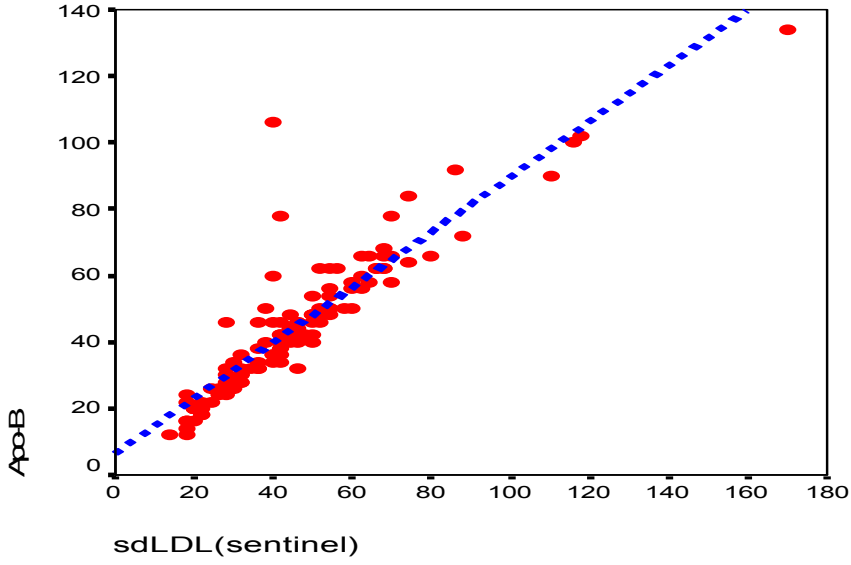
Grafik 11. Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum HDL-C arasındaki korelasyon.

Yukarıdaki değişkenler arasında anlamlı negatif korelasyon vardır (Spearman korelasyon testi, $r_s = -0,187$, $P = 0,043$).



Grafik 12. Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum LDL-C düzeyi arasındaki korelasyon.

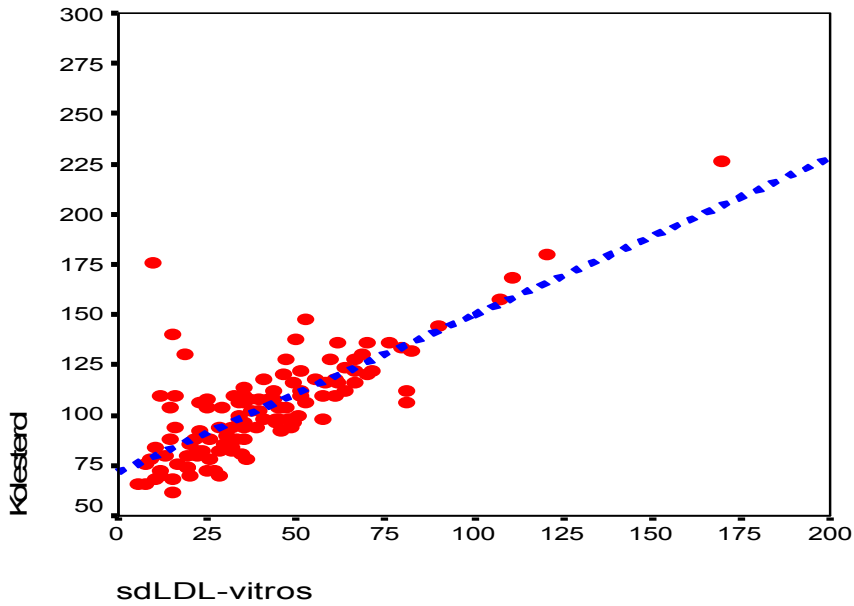
Yukarıdaki değişkenler arasında anlamlı pozitif korelasyon vardır ($r = 0,920$, $P = 0,000$).



Grafik 13. Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum Apo B arasındaki korelasyon.

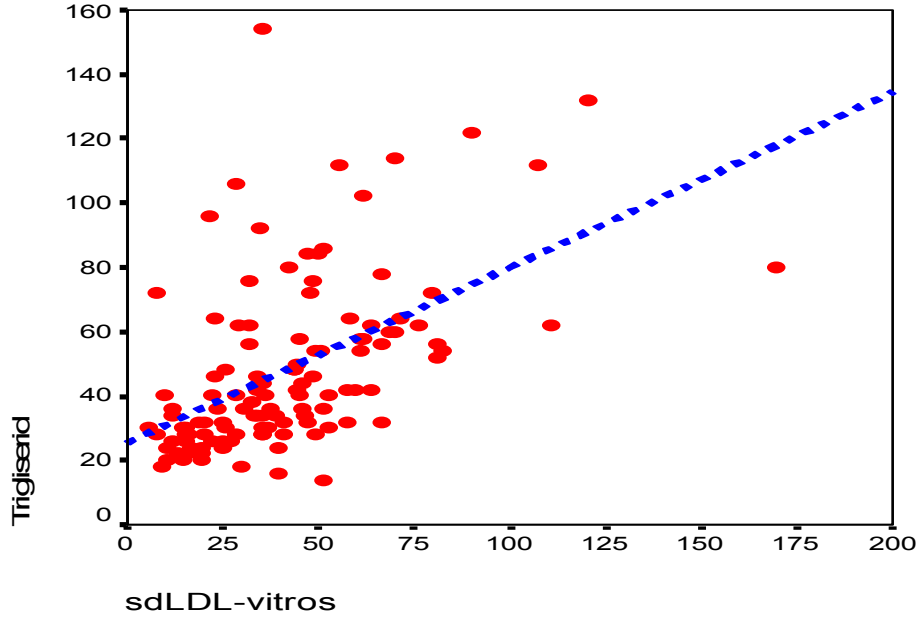
Yukarıdaki değişkenler arasında anlamlı pozitif korelasyon vardır ($r=0,903$, $P=0,000$).

Supernatantta bulunan Sentinel sdLDL-C ile serum Apo A-I düzeyi arasında anlamlı negatif korelasyon vardır ($r= -0,243$, $P=0,008$).



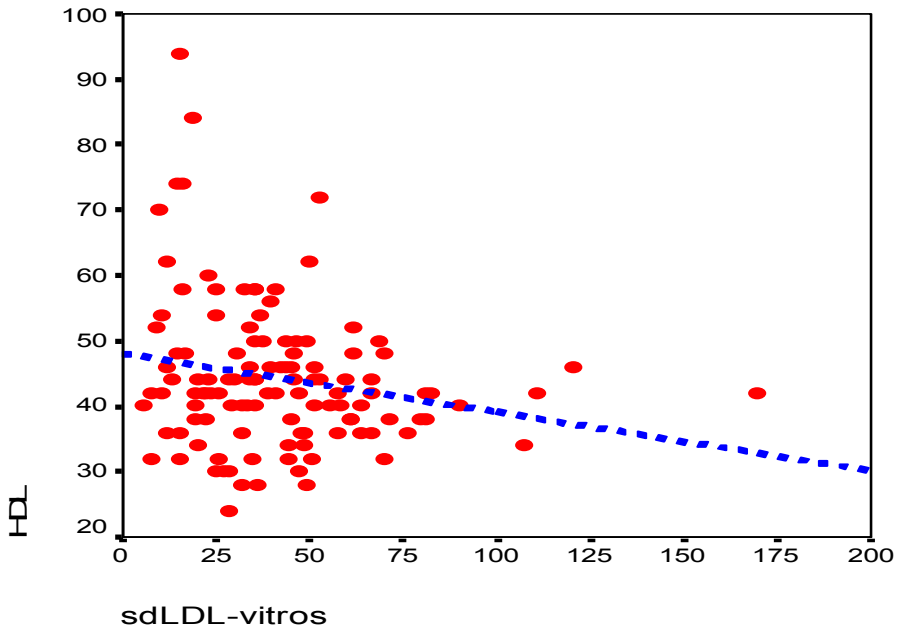
Grafik 14. Supernatantta bulunan Vitros sdLDL-C ile serum total kolesterolü arasındaki korelasyon .

Yukarıdaki değişkenler arasında anlamlı pozitif korelasyon vardır ($r=0,773$, $P=0,000$).



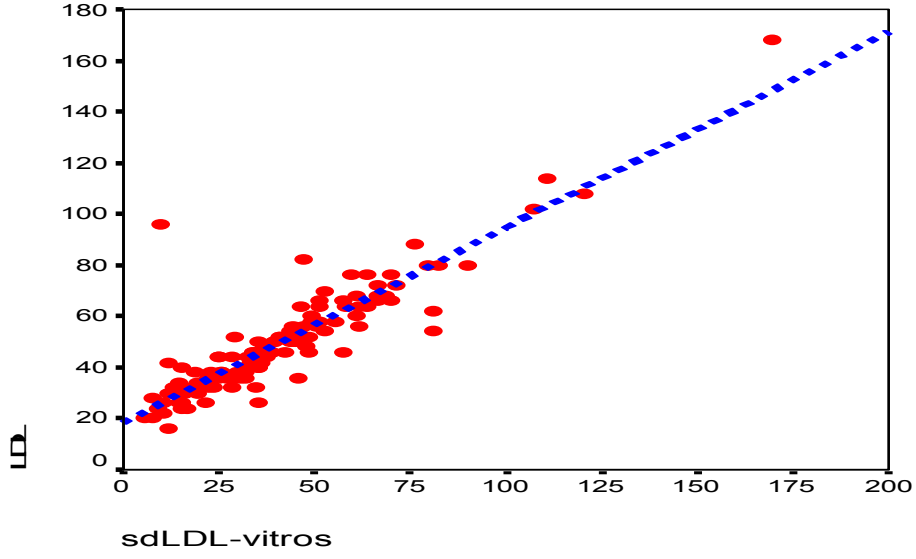
Grafik 15. Supernatantta bulunan Vitros sdLDL-C ile serum TG düzeyi arasındaki korelasyon.

Yukarıdaki değişkenler arasında anlamlı pozitif korelasyon vardır. ($r=0,520$, $P=0,000$).



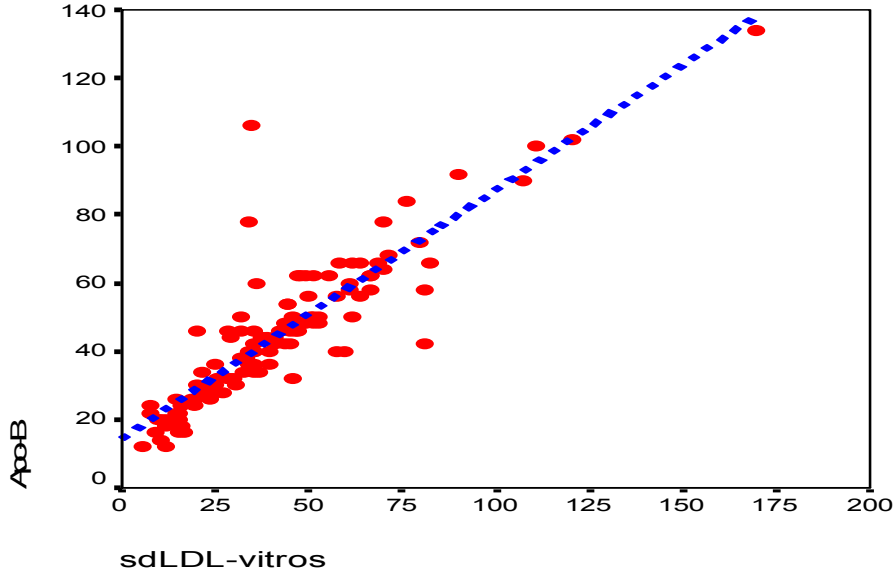
Grafik 16. Vitros sdLDL ile serum HDL-C arasındaki korelasyon.

Yukarıdaki değişkenler arasında korelasyon yoktur. (Spearman korelasyon testi, $r_s = -0,171$, $P=0,064$).



Grafik 17. Supernatantta bulunan Vitros sdLDL-C ile serum LDL-C arasındaki korelasyon.

Yukarıdaki değişkenler arasında anlamlı pozitif korelasyon vardır ($r=0,896$, $P=0,000$).



Grafik 18. Supernatantta bulunan Vitros sdLDL-C ile serum Apo B arasındaki korelasyon.

Yukarıdaki değişkenler arasında anlamlı pozitif korelasyon vardır ($r=0,878$, $P=0,000$).

Supernatantta bulunan Vitros sdLDL-C ile serum Apo A-I arasında anlamlı negatif korelasyon vardır ($r= -0,220$, $P=0,017$)

5- TARTIŞMA

Çok sayıda epidemiyolojik ve klinik çalışma serum LDL-C ile KKH insidansı arasında pozitif bir korelasyon bulunduğunu göstermiştir(3,5). Serum total kolesterolünün yaklaşık 2/3'sini oluşturan LDL-C, serumdaki major aterojenik lipoprotein fraksiyonudur(5). Ayrıca, LDL-C düzeylerinin düşürülmesi ile KKH insidansının ve KKH'ya bağlı mortalitenin azaldığı kanıtlanmıştır(5,8,9). Serum LDL-C düzeyindeki küçük değişikliklerin bile, KKH riskini etkilemesinden dolayı LDL-C'nin doğru ve tutarlı bir şekilde ölçülmesi büyük önem taşır(5).

LDL-C ölçümünde en önemli sorun, definitif metodun bulunmamasıdır. LDL uniform yapıda olmayıp, kimyasal yapıları ve fizyokimyasal özellikleri değişiklik gösteren benzer partiküllerden oluşur. LDL-C ölçümünde referans metod, β -kantitatif ölçümdür. Burada ölçülen LDL'ye, IDL ve Lp(a) dahildir(6,17). Ultrasantrifugasyonun kullanıldığı β -kantitatif ölçüm, özel ekipman gerektiren zahmetli ve pahalı bir yöntemdir. Ayrıca bu metodda fazla miktarda seruma gereksinim vardır. Bu nedenle LDL-C klinik laboratuvarların çoğunda Friedewald formülü kullanılarak hesaplanır(5,6,7,8,9,74,82). Friedewald formülü ile elde edilen sonuçlar β -kantitatif ölçüm ile genel olarak korelasyon gösterse de, bu formül bazı koşullarda uygulanmamalıdır. Gıda alımı sonrası plazmada yüksek oranda TG içeren şilomikronların bulunması, VLDL-C'nin gerçek değerinin üzerinde hesaplanmasına yol açacağından, toklukta kullanılmaması gerekir. Friedewald formülünün kullanılmaması gereken diğer durumlar ise; plazma TG düzeyinin 400 mg/dL'nin (4.52 mmol/L) üstünde olması ve Tip III hiperlipoproteinemidir(5,6,7,8,17,74,82). Ayrıca TG düzeyinin 200-300 mg/dL ve 300-400 mg/dL olması β -kantitatif ölçüm ile olan uyumluluğun sırasıyla % 75 ve % 61'e düşmesine yol açar, 500 mg/dL'nin üzerindeki numunelerde ise uyumluluk % 20'ye kadar düşer(83). Ayrıca, Friedewald formülü diabetes mellitus, hepatik ve renal hastalıklarda TG konsantrasyonu 200-400 mg/dL arasında olsa bile dikkatli bir şekilde kullanılmalıdır(10). Yine, bu formülün üç ayrı parametrenin (total kolesterol, TG ve HDL-C) ölçümüne dayalı hesaplamaya dayanması nedeniyle, NCEP tarafından LDL-C için öngörülen \leq %12 olan TMEH'nin aşılması olasılığı vardır(6,84). Bu nedenle, NCEP Çalışma Grubu LDL-C ölçümünde direkt yöntemlerin geliştirilmesini tavsiye etmektedir(7).

The College of American Pathologists (CAP)'nin 1150 rutin laboratuvarında yaptığı bir araştırma, hesaplanarak bulunan LDL-C'deki CV'nin ortalama %12 olduğunu göstermiştir. Bu CV sadece laboratuvarlar arası impresizyonu değil, total kolesterol, TG ve HDL-C ölçümünde kullanılan farklı metodlar arası biası da yansıtır(6). NCEP tarafından LDL-C ölçümü için belirlenen TMEH \leq %12 dir(84). Bu durumda, impresizyon veya total CV'nin \leq %4 olması gerekir (6).

Toplumumuzda hiperlipideminin yüksek prevalansı göz önüne alındığında, LDL-C'nin ölçümü için doğru ve otomasyona uyarlanabilir yöntemlere gereksinim vardır.

Bu çalışmanın birinci bölümünde, otomasyona uyarlanabilen iki direkt LDL-C kitinin (Vitros dLDL-C ve Sentinel dLDL-C) analitik performansları değerlendirildi ve her iki yöntem Friedewald formülü ile kıyaslandı. Her iki direkt LDL reaktifi ile bulunan çalışma içi (within-run) impresizyon %2'nin altındaydı. Total CV değerleri incelendiğinde, Sentinel LDL-C için düşük ve yüksek havuzlarda bulunan CV değerleri sırasıyla % 1.73 ve % 1.30 idi. Vitros LDL-C için bulunan total CV değerleri ise, düşük, orta ve yüksek havuzlar için sırasıyla %3.69, % 4.80 ve %4.09 olarak hesaplandı. Sentinel LDL-C için bulunan total CV değerleri NCEP tarafından LDL-C için öngörülen % 4 sınırının altında idi. Vitros LDL-C için saptanan total CV değerleri ise, üç serum havuzunun ikisi için % 4 limitinin üstünde bulundu. Bu sonuçlara dayanarak, Sentinel dLDL'nin presizyonunun Vitros dLDL'ye göre daha iyi olduğu ve Vitros dLDL'nin NCEP tarafından belirlenen performans kriterlerini karşılayamadığı sonucuna varıldı. Bu çalışmada, referans metod kullanılarak bias saptanmadığından dolayı TMEH hesaplanamadı.

Linearite çalışması incelendiğinde, Vitros dLDL-C kiti ile yapılan LDL-C ölçümlerinin beklenen değere göre ortalama 4-4.5 mg/dL'lik negatif bir sapma gösterdiği gözlemlendi. Ölçüm sonuçları beklenen değere göre % 17 ile % 18 arasında bir negatif sapma (sistemik hata) göstermekteydi. Sentinel dLDL-C reaktifi ile yapılan LDL-C ölçümleri ise beklenen değere göre ortalama 3.5 mg/dL'lik negatif bir sapma gösteriyordu. Ölçüm sonuçları beklenen değere göre %11'lik negatif bir sapma göstermekteydi. Linearite çalışmasında, Vitros dLDL-C reaktifi ile bulunan sapmanın Sentinel dLDL-C kitine göre daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Farklı düzeylerde LDL-C içeren 122 hasta serumu Vitros dLDL-C ve Sentinel dLDL-C reaktifi ile çalışıldı. Her iki kit birbiri ile ve Friedewald formülü ile kıyaslandı.

Friedewald LDL-C'ye ait ortalama LDL-C değeri 140.81 ± 40.71 mg/dL, Vitros LDL-C'ye ait ortalama değer 145.67 ± 45.19 mg/dL, Sentinel LDL-C'ye ait ortalama değer 152.44 ± 44.26 mg/dL olarak bulundu. Vitros LDL-C ile yapılan ölçümler Friedewald LDL-C ile yapılan ölçümlere göre anlamlı olarak yüksek ($p=0.000$), Sentinel LDL-C ile yapılan ölçümler Friedewald LDL-C'ye göre anlamlı olarak yüksek ($p = 0,000$), ve Sentinel LDL-C ile yapılan ölçümler de Vitros LDL-C'ye göre anlamlı olarak yüksekti($p = 0,000$). Sonuç olarak, her iki homojen dLDL-C yöntemi ile bulunan LDL-C değerleri Friedewald formülü ile hesaplanan ortalama değerden anlamlı olarak yüksekti. Korelasyon katsayıları incelendiğinde ise, hem Vitros LDL-C'nin, hem Sentinel LDL-C'nin Friedewald formülü ile ileri düzeyde anlamlı, pozitif korelasyonu olduğu görüldü. Vitros dLDL-C için r değeri 0.936, Sentinel dLDL-C için r değeri 0,934 olarak bulundu.

Literatüre göre, direkt LDL-C metodları ile Friedewald formülü arasında yüksek düzeyde korelasyon bulunduğu görülmektedir(5,6,9,77,82,86). Buna karşılık, homojen metodlar ile ölçülen LDL-C ile Friedewald formülü ile hesaplanan LDL-C değerlerini karşılaştıran çalışmalarda çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Suguichi ve ark.ları, homojen LDL-C yöntemi ile Friedewald formülü arasında 0,990 gibi yüksek bir korelasyon katsayısı elde etmişlerdir(77). Lindsey ve ark.larının, 19,343 bireyde yaptıkları çalışmada direkt LDL-C ve Friedewald formülüyle hesaplanarak bulunan LDL-C arasında çok iyi bir korelasyon ($r =0.94$) bulunmasına karşın, Friedewald formülü ile hesaplanan LDL-C'nin dLDL-C'ye göre $19,5 \pm 11,8$ mg/dL daha düşük olduğu bulunmuştur(82). Faas ve ark.ları da, 464 hastada yaptıkları çalışmada dLDL-C ve Friedewald formülü arasında iyi bir korelasyon saptamalarına ($r=0,88$) karşın, Friedewald formülü ile hesaplanan LDL-C 100 mg/dL olduğunda, direkt yöntemin % 18'lik pozitif bias gösterdiğini bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, 160 mg/dL baz alındığında her iki yöntem ile elde edilen sonuçların birbirine yakın olduğu görülmüştür(85). Smets ve ark.larının çalışmasında da dLDL-C ve Friedewald formülü arasında güçlü bir korelasyon bulunmuştur ($r=0,97$)(5). Ragland, diyabetik hastaları kapsayan çalışmasında direkt LDL-C yönteminin TG konsantrasyonu 200 mg/dL'nin altında iken Friedewald formülü ile iyi bir korelasyon gösterdiğini bildirmiştir(86). Wang ise, TG düzeyinin 50 mg/dL civarında olması durumunda Friedewald formülü ile düşük sonuçlar elde edildiğini, bu tür hastalarda direkt LDL-C yöntemlerinin

kullanılması gerektiğini bildirmiştir(87). Rifai ve ark.ları da TG <400mg/dL olan 164 hastada direkt LDL-C ve Friedewald formülü arasında yüksek düzeyde bir korelasyon ($r=0,94$) bulmuşlar, ancak direkt yöntemle saptanan LDL-C düzeyinin Friedewald formülü ile hesaplanana göre ortalama 5,2 mg/dL daha düşük olduğunu bildirmişlerdir(9). Sahu ve ark.ları, homojen metod ile Friedewald formülü arasında iyi bir korelasyon ($r=0.88$) saptamalarına rağmen TG düzeyi 200 mg/dL'nin altında olan hastalarda homojen yöntem ile ölçülen LDL-C'nin Friedewald formülü ile hesaplanarak bulunan LDL-C'e göre düşük olduğunu bildirmişlerdir(88). Çalışmamızda, Friedewald formülü ile hesaplanarak ölçülen LDL-C ile iki direkt metod arasında istatistiksel açıdan ileri düzeyde, anlamlı pozitif yönlü korelasyon vardı. Buna karşılık, her iki direkt yöntem ile bulunan ortalama LDL-C düzeyleri, Friedewald formülü ile elde edilen ortalama değerden anlamlı olarak yüksekti. Vitros LDL-C ile Friedewald LDL-C arasında 4.87 ± 15.98 mg/dL, Sentinel LDL-C ile Friedewald LDL-C arasında 11.63 ± 15.82 mg/dL fark vardı.

Homojen metodların rutin kullanımda yerleri olup olmadığı henüz tartışmalı bir konudur. Burada göz önüne alınması gereken iki ölçüt vardır: Analitik performans ve maliyet. Homojen yöntemlerin kullanıma girmesi için analitik performans ve maliyet açısından Friedewald formülüne göre belirgin üstünlüklerinin olması gerekir(6).

Kullanımda olan reaktiflerin analitik performansları incelendiğinde tüm kitlerin toplam imprecizyonunun NCEP tarafından belirlenen < %4 sınırının altında olduğu görülmektedir. Direkt yöntemler presizyon açısından Friedewald formülünden üstündür(6). Metodlar doğruluk açısından değerlendirildiğinde ise bir metod için ortaya konmuş olan doğruluğun o yöntemin her versiyonu (değişik lot numarası, farklı kalibrasyonlar) için geçerli olmadığı söylenebilir. Yöntem karşılaştırma çalışmalarının tümü β - kantitatif ölçüm ile kıyaslanarak yapılmamıştır, bir bölümünde ise modifiye β - kantitatif ölçüm kullanılmıştır(6,89). Miller ve ark.ları, dört homojen yöntemi β - kantitatif ölçüm ile karşılaştırmışlar ve dört metodda da TMEH'nin NCEP tarafından belirlenen %12 sınırının üzerinde olduğunu bildirmişlerdir(89). Direkt LDL-C metodları ile ilgili bir başka sorun geniş popülasyonlarda kullanılarak standardize edilmemiş olmalarıdır. Ayrıca LDL-C düzeyinin düşürülmesi ile KKH insidansının düşürüldüğünü gösteren çalışmaların hemen hemen tümünde Friedewald formülü kullanılmıştır(85).

Homojen yöntemlerin TG düzeyleri ile olan ilişkisi, değişik çalışmalarda incelenmiştir. Bazı çalışmalarda artmış serum TG düzeylerinin LDL-C'de artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bu durum VLDL'nin LDL, IDL ve Lp(a)'dan separasyonunun güç olmasına bağlanmıştır(6,90). VLDL'yi maskelemek için sülfatlı α -siklodekstrinin kullanıldığı çalışmalarda ise LDL-C düzeyinin genellikle daha düşük ölçüldüğü gözlenmiştir(6,7,8,77). Öte yandan, Ragland'ın çalışmasında direkt LDL-C yönteminin 400 mg/dL'nin üstündeki TG konsantrasyonlarından etkilenmediği bildirilmiştir(86). Miller ve ark ları ise, dört homojen yöntemi β - kantitatif ölçüm ile karşılaştırmışlar ve TG <300-400 mg/dL arasında olduğunda direkt metodların Friedewald formülüne bir üstünlükleri olmadığı sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada, direkt LDL-C yöntemlerinin serum TG düzeyi 400 mg/dL'nin üzerinde olduğunda kullanılması önerilmiştir (89).

Direkt LDL-C yöntemlerinin Friedewald formülüne karşı bir üstünlüğü, toklukta LDL-C'nin ölçümünü sağlamak olabilir. Bazı çalışmaların sonuçlarının umut verici olmasına karşın, daha geniş kapsamlı çalışmalar yapılana kadar direkt LDL-C yöntemlerinin açlıkta kullanılması önerilmektedir(6).

Homojen metodlar optimum hale getirilse bile, Friedewald formülü ve direkt yöntemler arasında seçim yapılmasında göz önüne alınması gereken önemli bir faktör maliyet sorunudur(91). Hesaplanarak bulunan LDL-C, total kolesterol, TG, HDL-C ölçümlerine dayandığından ek bir maliyet gerektirmez. Homojen LDL-C reaktiflerinin maliyeti, total kolesterol, TG ve HDL-C'nin maliyetine eşittir. Bir hasta için direkt LDL-C kitinin yaklaşık olarak üç dolara mal olmaktadır, yine bir hasta için total kolesterol, TG ve HDL-C reaktiflerinin maliyeti de üç dolardır. Halen kullanılan lipid paneline ek olarak, direkt LDL-C'nin ölçümü maliyetin iki katına çıkmasına yol açacaktır. Ayrıca otoanalizörde üç yerine dört parametrenin çalışılması cihazın hızını azaltacak; dolayısıyla bu da maliyeti artıran bir etken olacaktır(6). Sonuçta, ekonomiklik açısından dLDL-C reaktiflerinin maliyetleri düşmedikçe hesaplama ile bulunan LDL-C'ye üstünlüklerinin olmadığı söylenebilir.

Lipid analizleri iki temel amaç için yapılır: Bunlar bireyin hiperlipidemi açısından taranması ve hiperlipidemi tedavisi gören hastanın izlenmesidir. LDL-C'nin tarama amacıyla istenmesi yeterli değildir. Bu durumda düşük HDL-C ve yüksek TG düzeyinden kaynaklanan risklerin saptanması mümkün olmayacaktır. Hiperlipidemi

tedavisi takibinde ise hiperkolesterolemisi olup sadece LDL-C'nin izlenmesinin yeterli olduğu hastalar vardır. Öte yandan, klinisyenler lipid düşürücü ilaçların çoğunun LDL-C dışındaki diğer lipid parametrelerini de etkilemesi nedeniyle çoğu kez tüm değerleri bilmek isteyecektir(6). Sonuç olarak, direkt LDL-C ölçümünün total kolesterol, TG ve HDL-C'den oluşan lipid panelinin yerini alıp almayacağına henüz tartışmalı olduğu söylenebilir. Değişik homojen metodların β -kantitatif ölçüm ile kıyaslandığı daha kapsamlı çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır. Bu aşamada, maliyeti daha yüksek olan homojen direkt LDL-C yöntemlerinin serum TG düzeyinin 400 mg/dL'nin (4,52 mmol/L) üzerinde olduğu durumlarda kullanımının uygun olduğu kabul edilebilir.

Küçük Yoğun LDL Çalışması

Son yıllarda yapılan çalışmalar batı toplumlarında sdLDL hakimiyetinin KKH için yeni bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur(32,53,55,57,93,94). Bu bulguların değişik etnik gruplar için de geçerli olduğu dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarla doğrulanmıştır(92,95,96).

sdLDL tayininde standart yöntem, analitik ultrasantrifugasyondur. Özel ekipman gerektiren ve oldukça zahmetli olan bu yöntem rutin klinik kullanım için uygun değildir(13). Polianyonların divalen katyonlarla kombinasyonunun apo B içeren lipoproteinlerin presipitasyonunu sağladığı bilinen bir olgudur. Hirano ve ark.larının geliştirdiği metodda, heparin sodyum ve magnezyum klorür kombinasyonunun apo B içeren tüm lipoproteinleri çöktürmediği ve LDL'nin bir kısmının HDL ile birlikte supernatantta kaldığı gösterilmiştir. Supernatantta kalan bu fraksiyonun sdLDL olduğu gradient jel elektroforezi ve ultrasantrifugasyon ile doğrulanmıştır (14).

Bu çalışmada da, bu çöktürme yöntemi kullanılarak değişik konsantrasyonlarda kolesterol ve TG içeren serumlarda sdLDL-C'nin ölçümü ve sdLDL-C düzeyi ile serum total kolesterol, TG, LDL-C, HDL-C, apo A-I ve apo B konsantrasyonu arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlandı. Ultrasantrifugasyon yapılamaması nedeniyle ölçülen LDL-C komponentinin sdLDL-C olup olmadığı doğrulanamadı. Öte yandan, HDL-C'nin yaklaşık %90'ının supernatantta kaldığı gözlemlendi. 118 hastanın serumlarındaki ortalama HDL-C değeri $50,03 \pm 11,91$ mg/dL iken supernatanttaki ortalama HDL-C değeri $44,32 \pm 11,27$ mg/dL olarak bulundu. Serum ve supernatanttaki Apo A-I düzeyleri de birbirine çok yakındı. Buna dayanarak, apo A içeren lipoproteinlerin büyük ölçüde çöktürülmediği söylenebilir.

Bu çalışmada 118 kişiden oluşan hasta grubundaki ortalama sdLDL-C değerleri Sentinel dLDL-C için 45.93 ± 23.02 mg/dL, Vitros dLDL-C için 41.61 ± 25.56 mg/dL olarak bulundu. Sentinel dLDL-C'ye ait ortalama değer Vitros dLDL-C'ye ait ortalamadan anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.05$). Çalışmanın birinci bölümünde Vitros dLDL-C, Sentinel dLDL-C ve Friedewald LDL-C karşılaştırmasında da Sentinel dLDL-C yöntemi ile bulunan ortalama LDL-C değerinin Vitros dLDL-C'ye göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlenmişti.

39 erkek hasta ve 79 kadın hastanın ortalama sdLDL değerleri arasında her iki dLDL yöntemi ile istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Hirano ve ark. larının 313 normolipidemik bireyi kapsayan çalışmasında ise, sdLDL düzeyleri erkeklerde kadınlara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur(13). Çalışma bu yönden literatür ile uyumlu değildir. Ancak çalışma, kadınların menopozal durumu sorgulanmadan yapılmıştır.

Hastalar normolipidemik, hiper LDL-C ($LDL-C \geq 130$ mg/dL), hipertrigliseridemi ($TG \geq 150$ mg/dl) ve kombine hiperlipidemi ($LDL-C \geq 130$ mg/dL, $TG \geq 150$ mg/dL) olarak dört gruba ayrıldığında sdLDL-C düzeyinin en yüksek düzeyde bulunduğu grubun kombine hiperlipidemi grubu olduğu gözlendi. Hiper LDL-C ve hipertrigliseridemi grubundaki ortalama sdLDL-C değerleri ise birbirine oldukça yakındı. Hirano ve ark. ları da, 462 kişiyi kapsayan çalışmalarında sdLDL-C'nin kombine hiperlipidemili hastalarda en yüksek düzeyde olduğunu bulmuşlardır(13).

Çalışmada, normolipidemik bireylerde ortalama sdLDL-C/serum total LDL-C oranı %28.3 olarak bulundu. Hirano ve ark.ları da benzer bir oran bulmuşlardı (%29). Bu çalışmada, hiper LDL-C grubu için bulunan sdLDL-C/serum total LDL-C oranı %25,9 iken Hirano'nun çalışmasında bu oran %34 idi. Çalışmada hipertrigliseridemi ve kombine hiperlipidemi grubunda sdLDL-C/total LDL-C oranları, sırasıyla %40.8 ve %37,9 iken Hirano'nun çalışmasında bu oranlar sırasıyla %49 ve %51 olarak bulunmuştu(13). Hipertrigliseridemi ve kombine hiperlipidemi grubunda sdLDL-C/serum total LDL-C oranları bu çalışmada ve Hirano'nun çalışmasında belirgin olarak yüksekti.

sdLDL-C'nin serum lipid parametreleri ile korelasyonları incelendiğinde en yüksek korelasyonun serum LDL-C ve apo B düzeyi ile olduğu gözlendi. Vitros dLDL-C ile ölçülen sdLDL-C ile serum LDL-C ve apo B düzeyleri arasındaki korelasyon katsayıları

sırasıyla 0.896 ve 0.878 idi. Sentinel dLDL-C ile ölçülen sdLDL-C ile serum LDL-C ve apo B düzeyleri arasındaki korelasyon katsayıları da sırasıyla 0.920 ve 0.903'dü. Süpernatanttaki sdLDL-C düzeyleri serum apo B ve LDL-C düzeyleri ile ileri derecede korelasyon göstermekteydi. Hirano'nun iki ayrı çalışmasında da sdLDL'nin en yüksek korelasyonunun serum LDL-C düzeyi ve apo B arasında olduğu bulunmuştu. Birinci çalışmada LDL-C için, $r = 0.730$, ikinci çalışmada da LDL-C için $r = 0.761$ olarak bulunmuştu(13,14). Apo B için bulunan r değeri ise 0.810 idi(14). Çalışmada sdLDL ve serum total kolesterolü arasında pozitif bir ilişki mevcuttu. Vitros dLDL ve Sentinel dLDL ile ölçülen sdLDL-C ile total kolesterol arasındaki korelasyon katsayıları sırasıyla 0.773 ve 0.798 idi. Çalışmada sdLDL-C ve serum TG konsantrasyonu arasındaki korelasyon incelendiğinde, sdLDL-C düzeyinin serum TG düzeyi ile de pozitif korelasyonunun bulunduğu gözlemlendi. Vitros dLDL ve Sentinel dLDL ile ölçülen sdLDL-C ile TG arasındaki korelasyon katsayıları sırasıyla 0.520 ve 0.542 idi. Hirano'nun iki çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmişti: Bulunan r değerleri 0.662 (13) ve 0.550 idi(14). Çalışmamızda sdLDL-C düzeyleri ile serum HDL-C ve apoA-I düzeyleri arasında negatif bir korelasyon mevcuttu. Hem Vitros sdLDL-C, hem Sentinel sdLDL-C ile serum HDL-C ve apo A-I düzeyleri arasında negatif bir korelasyon vardı. Hirano ve ark.larının çalışmasında da sdLDL-C ve HDL-C arasında negatif bir korelasyon saptanmıştı(13). sdLDL-C ve serum lipid parametreleri arasındaki korelasyonlara ilişkin bulgular Hirano'nun sonuçları ile uyumluydu.

Sonuç olarak, sdLDL-C ve serum LDL-C ve apo B düzeyleri arasında ileri derecede bir korelasyon varken, sdLDL-C ile HDL-C ve apo A-I arasında ise negatif bir korelasyon bulunmaktadır. sdLDL-C ile serum TG düzeyi arasında da LDL-C ve apo B kadar güçlü olmamakla beraber pozitif bir korelasyon vardı.

ALP son yıllarda ayrı bir dislipidemi olarak tanımlanmıştır. ALP, sdLDL hakimiyeti, orta derecede artmış plazma TG'leri ve düşük HDL-C ile karakterize olup; KKH için en güçlü risk faktörlerinden biridir(32,53,55,57,93). Bu çalışmada da sdLDL-C ile serum LDL-C, apo B, TG düzeyleri arasında doğrusal bir ilişki bulunurken, HDL-C ve apoA-I arasında negatif bir korelasyon vardı. Bulgular ALP'nin temel özelliklerinin sdLDL hakimiyeti, TG yüksekliği ve düşük HDL-C düzeyleri olduğunu doğrulamaktadır.

6- ÖZET

Bu çalışmanın ilk bölümünde, iki farklı direkt LDL kitinin analitik performansları değerlendirildi ve her iki yöntem Friedewald formülü ile kıyaslandı. Vitros dLDL-C ve Sentinel dLDL-C kitleri için farklı seviyelerde plazma havuzları hazırlandı ve NCCLS EP5-A protokolü uygulanarak çalışma içi ve total presizyon değerlendirmesi yapıldı. Her iki direkt LDL-C reaktifi ile bulunan çalışma içi (within-run) impresizyon % 2'nin altındaydı. Sentinel dLDL-C için bulunan total CV % 2'nin altında iken Vitros dLDL-C için bulunan total CV iki düzeyde % 4'ün üzerinde idi. Bu sonuçlara göre, Vitros dLDL-C'nin NCEP performans kriterlerini ($CV < 4\%$) karşılamadığı görüldü.

Linearite çalışmasında serum havuzu $\frac{3}{4}, \frac{1}{2}, \frac{1}{4}, \frac{1}{5}$ ve $\frac{1}{10}$ oranlarında sulandırıldı. Vitros dLDL-C %17-18 sapma gösterirken, bu değer Sentinel dLDL-C için % 11 olarak bulundu.

Farklı seviyelerde LDL-C içeren 122 hasta serumu Sentinel dLDL-C ve Vitros dLDL-C reaktifleri ile çalışıldı ve elde edilen sonuçlar Friedewald formülü ile karşılaştırıldı. Friedewald LDL-C'ye ait ortalama LDL-C değeri 140.81 ± 40.71 mg/dL, Vitros-LDL'ye ait ortalama değer 145.67 ± 45.20 mg/dL, Sentinel dLDL-C 'ye ait ortalama değer 152.44 ± 44.26 mg/dL olarak bulundu. Vitros dLDL-C ($r=0.936$) ve Sentinel dLDL-C ($r=0.934$) ile Friedewald formülü arasında ileri derecede korelasyon mevcut olmasına karşın her iki kit ile bulunan ortalama LDL-C değerleri Friedewald formülü ile bulunan ortalama değere göre anlamlı olarak yüksekti ($p = 0,000$).

Çalışmanın ikinci bölümünde heparin ve $MgCl_2$ kombinasyonu kullanımı ile apo B içeren lipoproteinlerin çöktürülerek sdLDL-C tayin edildi. 118 kişiden oluşan hasta grubundaki ortalama sdLDL-C değerleri Sentinel dLDL-C için 45.93 ± 23.02 mg/dL, Vitros dLDL-C için 41.61 ± 25.56 mg/dL olarak bulundu. Sentinel dLDL-C ile bulunan ortalama sdLDL-C değeri Vitros dLDL-C'ye ait ortalamadan anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.05$). 39 erkek hasta ve 79 kadın hastanın ortalama sdLDL-C değerleri arasında her iki dLDL-C yöntemi ile istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Hastalar normolipidemik, hiper LDL-C ($LDL \geq 130$ mg/dL), hipertrigliseridemi ($TG \geq 150$ mg/dl) ve kombine hiperlipidemi ($LDL-C \geq 130$ mg/dL, $TG \geq 150$ mg/dL) olarak dört gruba ayrıldığında, sdLDL-C düzeyinin en yüksek düzeyde bulunduğu grubun kombine hiperlipidemi grubu olduğu gözlemlendi.

sdLDL-C düzeyleri ile serum total kolesterol, LDL-C, apo B ve TG seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon, sdLDL-C ile HDL-C ve apo A-I arasında ise negatif bir korelasyon bulunduğu gözlendi. sdLDL en yüksek korelasyonu serum LDL-C ve apo B ile göstermekteydi. Bulgular, Aterojenik Lipoprotein Profilinin artmış sdLDL ve TG düzeyleri ile azalmış HDL-C ile karakterize olduğu yönündeki literatür bilgisi ile uyumludur.

7- SUMMARY

In this study, the analytical performance of two direct homogenous LDL-C assays (Vitros dLDL-C and Sentinel dLDL-C) were evaluated and the LDL-C values obtained from these assays were compared to the Friedewald formula. Within-run coefficient of variation (CV) (NCCLS EP5-A) was less than %2 for both homogenous assays. The total CVs for all serum pools was less than %2 for the Sentinel assay; the total CVs for two serum pools was greater than %4 for the Vitros dLDL-C assay. Vitros dLDL-C assay has not met the NCEP requirements for LDL-C testing for precision (<%4).

In order to investigate linearity, a serum pool was serially diluted to attain different concentrations ($3/4$, $1/2$, $1/4$, $1/5$, $1/10$). Vitros dLDL-C assay showed a deviation of %17-18, whereas Sentinel dLDL-C assay demonstrated a deviation of %11.

122 fresh serum samples were evaluated with two direct homogenous LDL assays and the results were compared to the Friedewald formula. The mean LDL-C value for the Sentinel dLDL-C assay and Vitros dLDL-C assay were 152.44 ± 44.26 mg/dL and 146.67 ± 45.20 mg/dL, respectively. The mean LDL-C value was 140.81 ± 40.71 mg/dL for the Friedewald formula. The Sentinel dLDL-C method ($r = 0,934$) and the Vitros dLDL-C method ($r = 0,936$) correlated highly with the Friedewald formula, but there was a statistically significant overestimation of LDL-C values with both homogenous assays ($p=0,000$).

In the second part of the study, sdLDL-C levels of 118 patients were measured by the two homogeneous assays. Heparin and magnesium chloride was used to precipitate lipoproteins of density <1.044 g/mL and the LDL-C content of the supernatant was determined by the two homogenous methods. The mean sdLDL-C value for the Sentinel and Vitros assays were 45.93 ± 23.02 mg/dL and 41.61 ± 25.56 mg/dL, respectively. The mean for Sentinel sdLDL-C assay was significantly higher than that of Vitros sdLDL-C ($p<0.05$). The difference between male and female patients was not statistically significant for both assays.

Samples were categorized into four groups: Normolipidemia, hyper LDL-C (LDL-C ≥ 130 mg/dL), hypertriglyceridemia (TG ≥ 150 mg/dl) and combined hyperlipidemia (LDL-C ≥ 130 mg/dL, TG ≥ 150 mg/dL). Combined hyperlipidemia showed the highest small dense LDL level-C.

sdLDL-C levels were positively correlated with serum total cholesterol, LDL-C, apo B and triglyceride, whereas there was an inverse correlation with HDL-C and apoA-I.. sdLDL was most significantly correlated with serum LDL-C and apo B.

8. KAYNAKLAR

- 1- Kingsburry KJ, Bondy G: Understanding the Essentials of Lipid Metabolism. Prog Cardiovasc Nurs, 2003; 18(1):13-18 .
- 2- Naito HK : Coronary Artery Disease and Disorders of Lipid Metabolism. Clinical Chemistry, Editörler: Lawrence Kaplan , Amadeo J.Pesce , Steven C.Kazmierczak, Mosby, 4.baskı, pp.603-638,2003.
- 3- Gordon T, Kannel WB, Castelli WP, Dawber TR: Lipoproteins, Cardiovascular Disease and Death. The Framingham Study. Arch Intern Med 1981;141:1128-1130.
- 4- Executive summary of the third report of the National Cholesterol Education Program(NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 2001;285:2486-2497.
- 5- Smets EML, Pequeriaux NCV, Blaton V, Goldschmidt HMJ: Analytical Performance of a Direct Assay for LDL-Cholesterol. Clin Chem Lab Med 2001;39(3):270-280.
- 6- Nauck M, Warnick GR, Rifai N: Methods for Measurement of LDL-Cholesterol: A Critical Assessment of Direct Measurement by Homogeneous Assays versus Calculation. Clin Chem 2002; 48(2):236-254.
- 7- Nauck M, Graziani MS, Bruton D, Cobbaert C, Cole TG et al: Analytical and Clinical Performance of a Detergent-based Homogeneous LDL-Cholesterol Assay: A Multicenter Evaluation. Clin Chem 2000;46:506-514.
- 8- Esteban-Salan M, Guimon-Bardesi A, De La Vuida-Unzueta J, Azcarate-Ania MN et al: Analytical and Clinical Evaluation of Two Homogenous Assays for LDL-cholesterol in Hyperlipidemic Patients. Clin Chem 2000;46:1121-1131.
- 9- Rifai N, Ianotti E, DeAngelis K, Law T: Analytical and clinical performance of a homogeneous enzymatic LDL-cholesterol assay compared with ultracentrifugation-dextran sulfate-Mg method. Clin Chem 1998;44:1242-1250.
- 10- Rubies-Prat J, Reveré RJ, Senti M, Pedro-Bodet J et al: Calculated low density lipoprotein cholesterol should not be used for lipoprotein abnormalities for in patients with diabetes mellitus. Diabetes Care 1993;16:1081-6.
- 11- Austin MA, Breslow JL, Hennekens GH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM: Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. JAMA 1988;260(13):1917-1921.
- 12- Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM: Small low density lipoprotein particles are associated with the incidence of coronary artery disease in men and women. JAMA 1996;276:876-881.
- 13- Hirano T, Ito Y, Koba S, Toyoda M, Ikejiri A, Saegusa H, Yamazaki J, Yoshino G: Clinical Significance of Small Dense Lipoprotein Cholesterol Levels Determined by the the Simple Precipitation Method. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2004;24:558-563.
- 14- Hirano T, Ito Y, Saegusa H, Yoshino G : A novel and simple method for quantification of small, dense LDL. J Lipid Res 2003;44: 2193-2201.

- 15- Bhagavan NV: Plasma Lipoproteins. Medical Biochemistry. 4th edition, Harcourt Academic Press, pp.429-452, 2002.
- 16- Lehmann CJ: Lipids and Lipoproteins. Saunders Manual of Clinical Laboratory Science. WB Saunders Company, 1.baskı, pp.59-76, 1998.
- 17- Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ: Lipids, lipoproteins and apolipoproteins. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, Editörler: Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, WB Saunders Company, Philadelphia, 3.baskı, 809-861, 1999.
- 18- Champe PC, Harvey RA: Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 2.baskı, Lippincott Williams&Wilkins, pp.213-222. 1994.
- 19- Biggerstaff KD, Wooten JS : Understanding lipoproteins as transporters of cholesterol and other lipids. Adv Physiol Educ 2004;28:105-106.
- 20- Mayes PA: Lipid Taşınması ve Depolanması. Harper'ın Biyokimyası, Editörler: Robert K. Murray, Peter A.Mayes, Daryl K. Granner, Victor W. Rodwell, Appleton & Lange, Çevirenler:Gülriiz Menteş, Biltan Ersöz, 22.baskı , Barış Kitabevi, pp.292-326,1993.
- 21- West JB: Regulation of Lipid and Lipoprotein Metabolism. Best and Taylor's Physiological Basis of Medical Practice. Editör: John B. West, Williams and Wilkins, Baltimore, 11. baskı, pp. 805-817, 1985.
- 22- Brewer HB, Gregg RE, Hoeg JM, Fojo SS: Apoproteins and Lipoproteins in Human Plasma: an Overview. Clin Chem 1988;34/8 (B),B4-B8.
- 23- Fortmann SP, Maron DJ: Disorders of Lipid Metabolism. Scientific American Medicine 1993;9:II:1-24.
- 24- Bachorik PS, Denke MS, Stein EA, Rifkind B: Lipids and Dyslipoproteinemia, Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, Editör: John Bernard Henry, WB Saunders Company, Philadelphia, 20.baskı, pp. 223-248, 2001.
- 25- Sacks FM, Campos H: Low Density Lipoprotein Size: A Reappraisal. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2003; 88(10): 4525-4532.
- 26- Jialal I: Evolving Lipoprotein Risk Factors: Lipoprotein(a) and oxidized low-density lipoproteins. Clin Chem 1998;44(8B):1827-1832.
- 27- Salehi R, Rahbari-Nobar M, Rashtchizadeh N: Lipoprotein(a), Apo(a) Phenotypes and Dyslipidemia in Acute Coronary Syndromes. Medical Journal of Islamic Academy of Sciences,2001; 14(4):139-143.
- 28- Deb A, Caplice N: Lipoprotein(a): New Insights into Mechanisms of Atherogenesis and Thrombosis. Clin Cardiol 2004;27:258-264.
- 29- Rosengreen A, Wilhelmsen L, Eriksson E, et al: Lipoprotein(a) and coronary heart disease: a prospective case-controlled study in a general population sample of middle aged men. Br Med J 1990;301:1248.

- 30- Rifai N, Ma J, Sacks FM, Ridker PM, Hernandez WJL et al.: Apolipoprotein(a) Size and Lipoprotein (a) concentration and future risk of angina pectoris with evidence of severe coronary atherosclerosis in men: The Physicians' Health Study. *Clin Chem* 2004; 50:1364-1371.
- 31- Mc Gill HC: The Pathogenesis of Atherosclerosis. *Clin Chem* 1988; 34-8 (B): B33-B39.
- 32- Packard CJ: Triacylglycerol- rich lipoproteins and the generation of small, dense low - density lipoprotein. *Biochemical Society Transactions* 2003;31(5):1066-1069.
- 33- Ross R: The Pathogenesis of Atherosclerosis. *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 5th edition, WB Saunders Company, editör: E.Braunwald 1997, pp.1105-1125.
- 34- 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.
- 35- Steinberg D: Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medicine* 2002; Vol 8 Number 11:1211-1217.
- 36- Krause WJ, Cutts JH: *Concise Text of Histology*, Williams & Wilkins, Baltimore, 1.baskı, pp.202-204.1981.
- 37- Munro JM, Cetron RS: *Biology of Disease: The Pathogenesis of Atherosclerosis. Atherosclerosis and Inflammation Lab Invest* 1988;58(3)249-261.
- 38- Hansson GK: *Medical Biology: Inflammation and Coronary Disease*. *New Engl J Med* 2005;352:1685.
- 39- Strong JP: Natural history and risk factors for early human atherogenesis, *Clin Chem* 1995;41:143.
- 40- Osiecki H: The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients. *Alternative Medicine Review* 2004; 9(1):32-53.
- 41- Worthley SG, Osende JI, Helft G, Badimon JJ, Fuster V: *Coronary Artery Disease: Pathogenesis and Acute Coronary Syndromes*. *The Mount Sinai Journal of Medicine* 2001;68:167-181.
- 42- Linton MF, Fazio S: Macrophages, inflammation and atherosclerosis. *International Journal of Obesity* 2003;27: S35-S40.
- 43- Hansson G: Immune Mechanisms in Atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2001;21:1876.
- 44- Getz GS: Thematic Review Series: The Immune System and Atherogenesis. *Journal of Lipid Research* 2005; 46:1-10.
- 45- Ridker P, Cook N: Clinical Usefulness of Very High and Very Low CRP across the Range of Full Framingham Scores. *Circulation* 2004;109:1955-1959.
- 46- Szmítko PE, Wang CH, Wiesel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S: New Markers of Inflammation and Endothelial Cell Activation. *Circulation*, 2003.1917-1923.

- 47- Jessup W, Kritharides L, Stocker R: Lipid oxidation in atherogenesis: An overview. *Biochemical Society Transactions*, 2004; Vol ,32, part 1:134-138.
- 48- Yla-Herttuala S, Pakkanen T, Leppanen P, Hakkiken T: Oxidized Low- Density Lipoproteins and Atherosclerosis. *J Clin Basic Cardiol* 2000;3:87-88.
- 49- Karabinos IK, Koulouris S, Melpidou A, Makris G, Kranidis A et al.: increased Serum Titers of Autoantibodies Against Oxidized LDL in Young Healthy Adults: An evidence of Protective Effect of These Antibodies? *Hellenic J Cardiol*, 2003;44:374-384.
- 50- Viera O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, Negre- Salvayre A: Oxidized LDL alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL induced apoptosis. *The FASEB Journal* 2000;14:532-542.
- 51- Tabas I: Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annual Review of Nutrition* 1999;19: 123-139.
- 52- Superko HR, Nejedly M, Garrett B: Small LDL and its Clinical Importance as a New CAD Risk Factor: A Female Case Study. *Prog Cardiovasc Nurse* 2002;17(4) 167-173.
- 53- Deric M: Pathophysiology and Clinical Significance of Atherogenic Lipoprotein Phenotype and Small Dense LDL Particles. *Jugoslav Med Biochem* 2003;22:101-107.
- 54- Chapman MJ: Atherogenesis and coronary risk. *The World of Lipids*, 1995;1:4-7.
- 55- Roheim PS, Asztalos BF: Clinical significance of lipoprotein size and risk for coronary atherosclerosis. *Clin Chem* 1995;41:147-152.
- 56- Berneis K, Krauss RM: Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. *Journal of Lipid Research* 2002;43:1363-1379.
- 57- Berneis K, Rizzo M: LDL size: does it matter? *Swiss Med Wkly* 2004;134:720-724.
- 58- Krauss RM : Dense Low density lipoproteins and coronary artery disease. *American Journal of Cardiology* 1995;23;75(6):53B-57B.
- 59- 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.
- 60- Superko HR: Beyond LDL cholesterol reduction. *Circulation* 1996;94:2351-2354.
- 61- 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.
- 62- Li J, Kondo A, Maekawa M et al.: Hypertriglyceridemia characterised by low- density lipoprotein phenotype and lipoprotein lipase gene mutation. *Clin Chem Lab Med* 2000;38(12):1263-1270.
- 63- Otvos J: Measurement of Triglyceride-Rich Lipoproteins by Nuclear Magnetic Spectroscopy. *Clin Cardiol* 1999;22: Suppl 2: 21-27.

- 64- Musliner TA, Krauss RM: Lipoprotein Subspecies and Risk of Coronary Disease. *Clin Chem* 1988;34/8(B): B78-B83.
- 65- Pacqard C, Caslake M: Mixed hyperlipidemia and lipid turnover. *The World of Lipids* 1997;3:1-7.
- 66- Patsch W, Ostlund R, Kuisk L, Levy R, Schoenfeld G: Characterization of lipoprotein in a kindred with familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 1982;23:1196-1205.
- 67- Kontush A, Chantepie S, Chapman MJ: Small dense HDL particles exert potent protection of atherogenic LDL against oxidative stress. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 2003;23: 1881.
- 68- Bonnefont-Rousselot D, Therond P, Beaudeau JP, Peynet J, Legrande A, Dellatre J: High Density Lipoproteins (HDL) and the Oxidative Hypothesis of Atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(10): 939-948.
- 69- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL et al.: Atherosclerosis: Basic Mechanisms, Oxidation, Inflammation and Genetics. *Circulation* 1995;91:2488-2496.
- 70- Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop T, Khalil A: Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with ageing. *Experimental Gerontology* 2004;39 (1):59-66.
- 71- Çil Z: Serum LDL-Colesterol Tayininde Direkt İmmunoseparasyon Yöntemiyle Friedewald Formülünün Karşılaştırılması. *Uzmanlık Tezi, İstanbul*, 1995, sayfa 30-35.
- 72- NCEP National Cholesterol Education Programme (NCEP) Recommendations on Lipoprotein Measurement From the Working Group on Lipoprotein Measurement, NIH Publication No. 95-3044, pp.35-36. September 1995.
- 73- Muniz: Measurement of lipoproteins by electrophoresis on polyacrilamide gel. *Clin Chem* 1977;23:1826-1833.
- 74- Wieringa G: The laboratory investigation of hyperlipidemias. *CPD Clinical Biochemistry* 2001;3(3): 77-81.
- 75- Friedewald WT, Levy RI, Frederickson DS: Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge, *Clin Chem*, 1972;18:499-502.
- 76- Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L: Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem* 1990;36: 15-19.
- 77- Suguichi H, Irie T, Uji Y, Ueno T, Chaen T, Uekama K, Okabe H: Homogenous assay for measuring low-density lipoprotein cholesterol in serum with triblock copolymer and α -cyclodextrin sulfate. *Clin Chem* 1998;44:522-531.
- 78- Suguichi H: History of development and technical details of the homogenous assays for HDL and LDL cholesterol. *The Fats of Life* 2005;9(1): 4-12.

- 79- Menys VM, Liu Y, Mackness MI, Kwok S et al.: Isolation of plasma small-density low-density lipoprotein using a simple air-driven ultracentrifuge and quantification using immunoassay of apolipoprotein B. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(1) 30-36.
- 80- Warnick GR, Nguyen T, Albers A: Comparison of improved precipitation methods for quantification of high-density lipoprotein cholesterol. *Clin Chem* 1985;31(2):217-222.
81. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA: Cholesterol Determination in High Density Lipoproteins Separated by Three Different Methods. *Clin Chem* 1977;23:882-884.
- 82- Lindsey CC, Graham MK , Johnston TP, Kiroff CG, Freshley A: A Clinical Comparison of Calculated Versus Direct Measurement of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Level. *Pharmacotherapy* 2004;24(2):167-172.
- 83- Mc Namara JR, Cohn JS, Wilson PW, Schaeffer EJ: Calculated values for low-density lipoprotein cholesterol in the assessment of lipid abnormalities and coronary artery disease risk. *Clin Chem* 1990;36:36-42.
- 84- Bachorik PS, Ross JW: National Cholesterol Education Programme (NCEP). Recommendations for Low-Density Lipoprotein Cholesterol: Executive Summary. 1995;41:1414-1420.
- 85- Faas FH, Earleywine A, Smith WG, Simmons DL: How should low-density lipoprotein cholesterol concentration be determined ? *J Fam Pract* 2002;51(11):972-975.
- 86- Ragland BD, Konrad RJ, Chaffin C et al.: Evaluation of a homogenous direct LDL-Cholesterol assay in diabetic patients: Effect of glycemic control. *Clin Chem* 2000;46:1848-1851.
- 87- Wang TH, Haddad M, Wang TS : Low triglyceride levels affect calculation of low density cholesterol values . *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 2000;125(3):404-405.
- 88- Sahu S, Chawla R ,Uppal B: Comparison of two methods of estimation of low density lipoprotein cholesterol, the direct versus Friedewald estimation. *Indian Journal of Biochemistry* 2005;20(2):54-6
- 89- Miller GM, Waymack PP, Anderson P, Ethridge SF, Jayne EC: Performance of Four Homogeneous Direct Methods for LDL-Cholesterol. *Clin Chem* 2002;48:489-498.
- 90- Nauck M, Rifai N: Analytical performance and clinical efficacy of three routine procedures for LDL-C measurement with the ultracentrifugation-dextran sulfate-Mg method. *Clin Chim Acta* 2000;294:77-92.
- 91- Warnick GR, Myers GL, Cooper GL, Rifai N: Impact of the Third Cholesterol Report from the Adult Treatment Panel of the National Cholesterol Education Program on the Clinical Laboratory. *Clin Chem* 2002;48:11-17.
- 92- Koba S, Hirano T, Yoshino G, Sakkai K et al.: Remarkably high prevalence of small dense low-density lipoprotein in Japanese men with coronary artery disease , irrespective of the presence of diabetes. *Atherosclerosis* 2002;160:249-256.

93- Stan S, Levy E, Delvin EA, Hanley JA, Lamarche B et al.: Distribution of LDL particle size in a population-based sample of children and adolescents and relationship with other cardiovascular risk factors. Clin Chem 2005;51:1192-1200.

94- Sowers JR: Obesity and Cardiovascular disease. Clin Chem 1998;44:1821-1825.

95- Benton JI, Blumenthal RS, Becker DM, Yanek LR et al. : Predictors of low density lipoprotein size in a high risk African-American population. American J Cardiology 2005;96:11:1320-1323.

96- 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 Physicians India 2005;53:95-100.