

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ATEROSKLEROTİK OLGULARDA OKSİDE LDL'İN HOMOSİSTEİN
TİYOLAKTONAZ ENZİM AKTİVİTESİYLE İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Aylin ALTINAY

Tez Danışmanı
Doç.Dr. Yeşim ÖZKAN

ANKARA
Eylül- 2009

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ATEROSKLEROTİK OLGULARDA OKSİDE LDL'İN HOMOSİSTEİN
TİYOLAKTONAZ ENZİM AKTİVİTESİYLE İLİŞKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Aylin ALTINAY

Tez Danışmanı
Doç.Dr. Yeşim ÖZKAN

ANKARA
Eylül- 2009

**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütölmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 02/10/2009



**İmza
Prof. Dr. Bolkan Şimşek
Gazi Üniversitesi
Jüri Başkanı**



**İmza
Doç. Dr. Yeşim Özkan
Gazi Üniversitesi**



**İmza
Doç. Dr. Üçler Kısa
Kırıkkale Üniversitesi**

Yüksek lisans çalışmam boyunca değerli görüş ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmama yön veren değerli hocam Doç Dr. Yeşim ÖZKAN'A, maddi ve manevi desteğini esirgemeyerek her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Şekiller ve Grafikler	iv
Tablolar	v
Kısaltmalar	vii

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ateroskleroz	5
2.1.1. Ateroskleroz Patojenezi	6
2.1.2. Aterosklerotik Risk Faktörleri	8
2.2. Lipoprotein Metabolizması	11
2.2.1. Şilomikron (ŞM)	12
2.2.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein (VLDL)	13
2.2.3. Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)	14
2.2.3.1. LDL Oksidasyonu	15
2.2.4. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)	17
2.2.5. Paraoksonaz Enzimleri (PON1, PON2 ve PON3)	20
2.2.6. Paraoksonaz Enzimleri ve Aterosklerozdaki Koruyucu Roller	21
2.3. Homosistein Metabolizması	23
2.3.1. Homosisteinin Remetilasyon Yolağı	24
2.3.2. Homosisteinin Transsülfürasyon Yolağı	24
2.3.3. Homosisteinin Metabolik Regülasyonu	24
2.3.4. Homosistein Tiyolaktan Oluşumu	25

2.3.5. Protein N –Homosisteinilasyonu	27
2.3.6. Homosistein Tiyolaktonun Eliminasyonu	29
2.3.7. Ekstrasellüler Homosistein Tiyolaktonaz	30
2.3.8. İntrasellüler Homosistein Tiyolaktonaz	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	32
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler	32
3.3. Çalışmaya Katılan Hasta ve Kontrol Grupları	33
3.4. Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması	33
3.5. Serum Homosistein Tiyolaktonaz Aktivite Tayini	35
3.5.1. Kullanılan Çözeltiler	35
3.5.2. Serum Homosistein Tiyolaktonaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	36
3.5.3. Serum Homosistein Tiyolaktonaz Enzim Aktivitesinin Hesaplanması	36
3.6. Serum Paraoksonaz Aktivite Tayini	36
3.6.1. Kullanılan Çözeltiler	37
3.6.2. Serum Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi	37
3.6.3. Serum Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Hesaplanması	38
3.7. Serum Okside-LDL Tayini	38
3.8. Rutin Klinik Parametrelerin Tayini	39
3.9. İstatistiksel Değerlendirme	39
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
6. ÖZET	58
7. SUMMARY	60
8. KAYNAKLAR	62
9. ETİK KURUL KARARI	81
10. ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER

<u>Şekil No :</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1 : Damar Yapısı	5
Şekil 2 : LDL Oksidasyonu	16
Şekil 3 : Paraoksonaz-1(PON 1)'in Aterojenezdeki Koruyucu Rolü	22
Şekil 4 : Homosistein Tiyolakton Oluşumu	26
Şekil 5 : Protein N-homosisteinilasyonu	27
Şekil 6: Homosistein Tiyolaktonun Vasküler Sistemdeki Muhtemel Patofizyolojik Rolü	29
Şekil 7 : γ-Tiyobutirolaktonun Homosistein Tiyolaktonaz ile Hidrolizi	35
Şekil 8 : Paraoksonun Paraoksonaz ile Hidrolizi	37
Şekil 9 : Okside-LDL Standart Grafiği	39
Şekil 10: Hasta ve Kontrol Grubunda Ox-LDL, Paraoksonaz, Homosistein Tiyolaktonaz ve Ox-LDL/Total Kolesterol Oranının Ortalama Düzeyleri	42
Şekil 11: Yaş İle Homosistein Tiyolaktonaz Arasındaki Korelasyon	43
Şekil 12: Hasta ve Kontrol Grubunda Serum Homosistein Tiyolaktonaz ve Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Arasındaki Korelasyon	43

TABLÖLAR

Tablo No :

Sayfa No:

Tablo 1 : Aterosklerotik Risk Faktörleri	9
Tablo 2 : Apolipoprotein Alt Fraksiyonları	12
Tablo 3 : Hasta ve Kontrol Grubuna Uygulanan Anket Formu	34
Tablo 4 : Okside- LDL Standart Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Optik Dansite (OD) Değerleri	38
Tablo 5 : Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik Özellikleri	40
Tablo 6: Hasta ve Kontrol Gruplarının Klinik Verileri	41
Tablo 7 : Hasta ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Parametrelerin Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması.....	42
Tablo 8 : Hasta ve Kontrol Grubunda Parametreler Arasındaki Korelasyonlar	44
Tablo 9: Hasta ve Kontrol Gruplarında Parametrelerin Ortalama Değerlerinin Cinsiyete Göre Karşılaştırılması	45
Tablo 10 : Hasta ve Kontrol Gruplarında Parametrelerin Ortalama Değerlerinin Sigara Kullanımına Göre Karşılaştırılması.....	46
Tablo 11 : Hasta ve Kontrol Gruplarında Parametrelerin Ortalama Değerlerinin Hiperlipidemi Varlığına Göre Karşılaştırılması ...	47

Tablo12: : Hasta ve Kontrol Gruplarında Parametrelerin Ortalama
Değerlerinin Diyabet Varlığına Göre Karşılaştırılması.....48

Tablo 13 : Gensini Skorlamasına Göre Oluşturulan Kontrol Grubu,
Hafif KAH ve Şiddetli KAH Gruplarının Karşılaştırılması49

KISALTMALAR

KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
Ox-LDL	: Okside LDL
PON	: Paraoksonaz
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
ICAM-1	: İntrasellüler Adezyon Molekülü
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme faktörü
IDL	: Ara Dansiteli Lipoprotein
VLDL	: Çok Düşük Dansiteli Lipoproetin
Lp (a)	: Lipoproetin (a)
LCAT	: Lesitin : kolesterol açıltransferaz
LPL	: Lipoprotein Lipaz
TG	: Trigliserid
CETP	: Kolesterol Ester Transfer Protein
ABCA1	: Adenozin Trifosfat Bağlayıcı Kaset Protein A1
Apo	: Apolipoprotein
LRP1	: LDL Reseptörüyle İlişkili Protein 1

MTP	: Mikrozomal Triglicerid Transfer Protein
ŞM	: Şilomikron
PUFA	: Poliansatüre Yağ Asitleri
LOX1	: Okside LDL Reseptörü
ABCG-1	: Adenozin trifosfat Bağlayıcı Kaset Protein G1
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein 1
Hcy	: Homosistein
AdoMet	: S-adenozil Metiyonin
SAH	: S-adenozil Homosistein
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
MS	: Metiyonin Sentetaz
BHMT	: Betain : homosistein metiltransferaz
CBS	: Sistatyonin β -Sentaz
MetRS	: Metiyonil- tRNA Sentetaz
BLH	: Bileomisin Hidrolaz
THF	: Tetrahidrofolat
SR-A	: A sınıfı Çöpçü Reseptör
HsCRP	: Yüksek Duyarlıklı C Reaktif Protein
Hcy-Tiyolaktonaz	: Homosistein Tiyolaktonaz

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklar 21.y.y.'ın en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biridir. Dünya sağlık örgütünün 2009 yılında yayınladığı uluslararası kardiyovasküler hastalık (KVH) istatistiklerine göre; 2005 yılında 17.5 milyon insan KVH nedeniyle ölmüş ve bu dünya genelindeki ölümlerin %30'unu oluşturmuştur¹.

Ateroskleroz kardiyovasküler hastalıkların majör belirtisidir. Ateroskleroz, arterlerin intimal bölgelerinde kalınlaşma, daralma ve elastikiyetlerini yitirmesiyle sonuçlanan patofizyolojik bir durumdur. Bu durum arteriyel duvarı etkilemekte ve anjino pektoris, miyokardial infarktüs ve serebral infarktüse yol açabilmektedir. Seven Countries ve Framingham çalışması gibi yapılan epidemiyolojik çalışmalar çok sayıda çevresel ve genetik risk faktörlerinin aterosklerozla ilişkili olduğunu göstermiştir²⁻⁴. Endotel hasara veya disfonksiyonuna yol açan faktörler olarak genellikle hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon, iskemi/reperfüzyon ve hiperhomosisteinemi gibi nedenler öne çıkmaktadır. Artan serum total kolesterol düzeyleri, yüksek kan basıncı (sistolik ve diyastolik) ve sigara kullanımı kadın ve erkeklerde koroner kalp hastalığı gelişimini destekleyen klasik risk faktörleri olarak değerlendirilmekle birlikte, kadınlarda hastalık gelişiminin erkeklerden ortalama 10 yıl sonra başladığı, bunun da erkeklere kıyasla kadınlarda koroner kalp hastalığı riskini azalttığı bildirilmektedir. 35-44 yaşları arasında erkeklerde koroner kalp hastalığı ölümle sonuçlanabilirken, kadınlarda bu yaş aralığında henüz hastalık gelişimi devam etmektedir⁵.

Ateroskleroz gelişiminde lipoproteinlerin rolü 50 yıldan beri ilgi çekici bir konu olmuştur. Düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) yüksek düzeyleri ve yüksek dansiteli lipoproteinlerin (HDL) düşük düzeylerinin kardiyovasküler hastalık gelişimine ve ilerlemesine önemli derecede katkıda bulunduğu yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır⁶⁻⁹. Tek başına LDL'nin oksidatif

modifikasyonu, makrofaj kökenli köpük hücre oluşumu vasıtasıyla erken aterosklerotik lezyonların gelişimine yol açmaktadır. Köpük hücreleri, sitoplazmalarında çok sayıda köpüksü görünümlü lipid damlacıkları içeren tipik aterosklerotik lezyonlardır. Daniel Steinberg ve arkadaşları oksidatif modifiye LDL'nin alımından sonra köpük hücrelerin makrofajlardan indüklendiğini ileri sürmüşlerdir¹⁰. Ox-LDL makrofajlarca eksprese edilen ve çöpçü reseptörler olarak adlandırılan reseptörler aracılığıyla bağlanmakta ve makrofajlara alınmaktadır⁴.

1980'li yıllarda yağlı çizgilenme lezyonlarının oluşumuyla ilgili olarak LDL oksidasyon hipotezi ileri sürülmüş ve çalışmalar bu yönde hızlanmıştır. İntima ve plazmada LDL'nin artması, LDL ile ilişkili lipidlerin oksidasyonu, monositlerin göçü ve makrofajlara dönüşümü, apolipoprotein B100'ün lipid peroksidasyon ürünleri tarafından negatif yüklü forma modifikasyonu ve oksidatif olarak modifiye olmuş LDL'nin (Ox-LDL) makrofajlar tarafından alımı ve lipid yüklü makrofajların intimada tutulması, yağlı çizgilenme lezyonunun oluşumuna sebep olmaktadır. LDL ayrıca , karotenoid, ubiquinol-10 ve α -tokoferol gibi LDL'yi oksidasyondan koruyan ve oksidasyonu inhibe eden çeşitli antioksidanlar içermektedir⁶.

Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar HDL kolesterol düzeyleri ile koroner kalp hastalığı riski arasında ters ilişki olduğunu göstermektedir. İn vitro farklı oksidasyon modelleri kullanılarak yapılan çalışmalar HDL'nin de oksidasyona uğrayabildiğini göstermiştir. HDL'nin kimyasal veya fiziksel modifikasyonu fonksiyonlarını etkileyerek aterojenezi kolaylaştıran 'disfonksiyonel HDL'ye dönüşümüne yol açabilmektedir¹¹. Oksidasyonun HDL'nin bazı koruyucu özelliklerini bozduğuna yönelik in vitro kanıt gösterilmiş olmakla birlikte, HDL indüklediği diğer mekanizmalar aracılığıyla arter duvarında kolesterol birikimini önleyici özelliğe sahiptir¹². HDL fosfolipid oksidasyonunu inhibe etme ve minimal modifiye LDL aktivitesini azaltma yoluyla antioksidan olarak önemli bir rol oynamaktadır. HDL, onun bu antioksidan etkisine katkı sağlayan paraoksonaz-1 (PON 1), lesitin: kolesterol

açıltransferaz (LCAT) ve kolesterol ester transferaz protein gibi birçok komponente sahiptir¹³.

Watson ve arkadaşları PON1'in lipid peroksidasyonuna karşı HDL ve LDL'yi koruduğunu göstermişlerdir¹³. HDL oksidasyonunun PON1 tarafından inhibisyonu HDL'nin geri kolesterol dönüşümünde antiaterojenik etkilerini sürdürmesine katkı sağlamaktadır¹⁴. PON1; Ca^{+2} bağımlı, HDL ile ilişkili bir glikoproteindir. PON1 55. ve 192. aminoasitlerinin değişimiyle iki genetik polimorfizm gösterirken, 192. pozisyonadaki değişim PON aktivitesini değiştiren temel polimorfizmdir. PON1 polimorfizmi HDL'nin, in vitroda LDL'yi oksidatif modifikasyona karşı koruma kapasitesini belirlemede rol oynamakta ve PON1 allelleri ile koroner kalp hastalığı arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır¹⁵.

Homosistein, metiyonin metabolizması sırasında üretilen sülfür içeren bir aminoasittir. Mc. Cully, yaptığı çalışmayla doğuştan metiyonin metabolizmasında bozukluk olan çocuklarda arteriyel lezyonların ilerlediğini gözlemlemiş ve homosisteinin insanlarda vasküler hastalıklara yol açtığı hipotezini ileri sürmüştür¹⁶. Homosistein, oksidasyona uğrayarak oluşturduğu radikalik ürünlerle oksidatif stresi arttırırken homosistein tiyolakton üzerinden de lipoprotein tiyolasyonuna neden olmaktadır. Son yıllarda Jakubowski ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda, homosisteinin toksik ve hasar oluşturucu etkilerine aracılık eden bileşiğin homosistein tiyolakton olduğu gösterilmiştir¹⁷. Homosistein tiyolakton, proteinlerdeki lizinin ϵ - amino gruplarıyla amid bağı oluşturmak suretiyle N-homosisteinilasyona sebep olup protein yapı ve fonksiyonunu bozan reaktif bir bileşiktir¹⁸. HDL'nin bir komponenti olan homosistein tiyolaktonaz, tiyolaktonu homosisteine hidroliz etmektedir. Homosistein tiyolaktonaz polimorfik PON1 geninin bir ürünü olup yüksek homosistein tiyolaktonaz aktivitesinin, düşük homosistein tiyolaktonaz aktivitesine göre protein homosisteinilasyonuna karşı daha iyi koruma sağladığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar homosistein tiyolaktonun homosistein ilişkili kardiyovasküler hastalıklarda rol oynayabildiğini göstermektedir¹⁹.

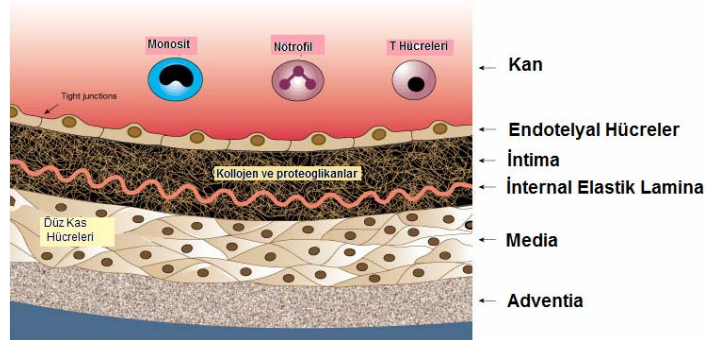
Aterosklerozun gelişimine neden olarak kardiyovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olması nedeniyle çalışmamızda aterosklerotik olgularda, okside LDL düzeyleri, homosistein tiyolaktonaz enzim aktivitesi ve paraoksonaz enzim aktivitesi ile bu parametrelerin birbirleriyle olan korelasyonları incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

İlk Antik Yunanda kistik bir alanı tanımlamada kullanılan ve “bulamaç” anlamına gelen “athero” ile “sertleşme” anlamına gelen “sclerosis” kelimelerinden köken alan ateroskleroz, damarların intima tabakasında lezyon veya plak oluşumuna bağlı olarak arter duvarının kalınlaşıp esnekliğini kaybettiği birçok kardiyovasküler hastalığın nedenidir²⁰.

Şekil 1’de görüldüğü gibi intima, media ve adventia olmak üzere başlıca üç tabakadan meydana gelen arter duvarında, aterosklerotik lezyonlar aortun, karotid arterler ve alt ekstremiteleri besleyen arterler gibi büyük elastik arterlerin ve koroner arterler gibi orta büyüklükteki müsküler arterlerin tunika intima tabakasında gelişmektedir. Tipik olarak olgunlaşmış bir lezyon, luminal tarafta düz kas hücreleri içeren, kollajence zengin fibröz bir doku ile kaplı ve media tabakasından düz kas hücreleriyle ayrılmış lipidle dolu makrofajlarla çevrili nekrotik debris ve bir ekstrasellüler lipid çekirdeğinden oluşmaktadır. İnsanlarda intimal kalınlaşma bazı arterlerde doğumdan itibaren başlamakta ve zamanla artmaktadır. Bu spontan olarak gelişen intimal kalınlaşma, aterojenik bir uyarının etkisi altında yaşamın ileri dönemlerinde aterosklerozun gelişimine işaret etmektedir^{4,20-22}.



Şekil 1: Damar yapısı

Erken aterosklerotik lezyonlar, depolanmış lipidler ve intimada gözlenen makrofaj ve T-lenfositlerle karakterizedir. Makrofajlar endotel hücreleri altında lipid biriktirirken köpüksü bir görünüm oluşturmaktadırlar. Lipid yüklü köpük hücre kümeleri; 'yağlı çizgilenme' biçiminde makroskopik olarak görülebilir hale gelmektedir. Derece derece bu düz yağ lezyonları, intimal düz kas hücrelerinin çoğalmasıyla ve başlıca kollajenden oluşan matrikse birikmesiyle kabarık fibrolipid plaklara dönüşmektedir. Bir sonraki aşamada lezyonun karakteristik yapısı olan, mediadan düz kas hücreleriyle ayrılmış ekstrasellüler lipid çekirdek ve luminer tarafta kalın fibröz tabakayla kaplanmış yapı oluşmaktadır. Lipid çekirdeğini lipidle dolu köpük hücreleri çevrelemektedir. Nekrotik çekirdekteki iskemi anjiogenezi tetiklemektedir. Eksternal damar çapını arttıran kompanzatuvar vasküler mekanizma yeterli gelmemeye başladığı zaman oluşan plak lümeninde daralmaya neden olmakta, aterosklerotik lezyonlar anjiografik olarak görünür hale gelmektedir. Arterler bu plaklar yoluyla darlaştığı zaman hücreler oksijenden yoksun kalmakta ve metabolik artık maddelerin birikimi meydana gelmektedir. Böylece kan akımı türbüle olmakta ve direnç artmaktadır. Son aşama olan komplike plak, fibröz tabakanın yırtılmasından sonra veya plak içi kanamadan sonra meydana gelmektedir. Plak yırtılmasını takiben meydana gelen tromboembolik olaylar klinik olarak bulgu veren akut iskemik sendromların temel sebebidir. Eğer trombus tıkayıcı değilse, plakla bütünleşmekte ve makrofaj ve düz kas hücrelerinin birikimiyle organize olmaktadır. Buna bağlı olarak da damar lümenini bozmaya devam etmekte ve bu olaylar dizisi tekrarlayabilmektedir.^{4,20-22}.

2.1. 1. Ateroskleroz Patojenezi

Ateroskleroz, önceleri arteryal lipid birikiminin olduğu basit bir hastalık olarak düşünülse de günümüzde inflamatuvar süreçlerin yer aldığı komplike bir durum olarak kabul edilmektedir. Uzun süreden beri kabul edilen

ve ilk olarak Ross ve Glomset tarafından ortaya atılan “Hasara Yanıt Hipotezi”ne göre aterosklerotik lezyonların gelişimindeki başlangıç basamağı, vasküler fonksiyonların asıl regülatörü olan, endotelin hasarudur ve ateroskleroz, birçok risk faktörüne bağlı olarak hasarın kronik ve aralıksız olması ve tamir mekanizmalarının kısmen yetersiz kalması nedeniyle inflamatuvar fibroproliferatif bir süreç olarak kabul edilmektedir²³.

Sağlıklı kişilerde ve kardiyovasküler hastalıkların erken başlangıç döneminde endotelyum, vasküler tonüsün ve kan akışının sürdürülmesinde homeostatik rol oynamaktadır²⁴. Aterosklerozun erken aşamasında endotelial disfonksiyonun ilerlemesi damar duvarındaki kronik inflamatuvar süreçleri tetiklemektedir. Uyarılan endotelial hücrelerde, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), intrasellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi adezyon moleküllerinin ve kemokinlerin indüksiyonu monositik lökositlerin ve T lenfositlerin endotele tutulmasını, intimaya geçişini ve doku makrofajlarına dönüşümünü hızlandırmaktadır. Aterosklerotik lezyon oluşumu aşamalarında T lenfositlerin görülmesi önemli bir immunolojik komponente de işaret etmektedir^{4,25,26}. Monosit/makrofajlar reaktif oksijen türleri oluşturarak da lezyonun ilerlemesinde ve inflamasyonda rol oynamaktadır, ayrıca LDL’lerin oksidatif modifikasyonuna da neden olmaktadır. Oksidatif olarak modifiye olmuş lipidlerin makrofajlarca alınması bu hücrelerin köpük hücrelerine dönüşümüne neden olmaktadır. Plateletlerden salınan platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi uyarılara bağlı olarak düz kas hücrelerinin media tabakasından intimaya göçü ve proliferasyonu artmaktadır. Prolifere olan düz kas hücreleri matriks proteinleri sentezleyerek fibröz plağı oluşturmakta ve lezyonun büyümesine neden olmaktadır. Hasarlı intimal tabakada kimyasal atraktant moleküllere maruziyet nedeniyle plateletler aterosklerotik lezyona tutunmaktadır. Antitrombotik faktörlerin kaybı ve protrombotik faktörlerdeki artış nedeniyle pıhtı oluşumuna eğilim artmakta ateroskleroz oluşumuna ve hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmaktadır^{4,20,24,25,27}.

2.1.2. Aterosklerotik Risk Faktörleri

Dünya genelinde gelişmiş ve gelişmekte olan ülke ayrımı gözetmeksizin en yaygın ölüm nedenlerinden biri olan aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklar için kabul edilen risk faktörleri; yaş, cinsiyet, genetik gibi değiştirilemeyen risk faktörleri olabileceği gibi değiştirilebilir çevresel ve yaşam tarzına bağlı faktörler de olabilmektedir.

Amerika Ulusal Sağlık Merkezi tarafından kardiyovasküler ölümlerde rol oynayan biyolojik ve çevresel faktörleri belirlemek için başlatılan "Framingham Çalışması"nın başlangıcında ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler hastalıkların riskini arttıran birçok faktör belirlenmiştir. Bu risk faktörleri, yükselmiş plazma LDL düzeyi, azalmış HDL düzeyi, yüksek kan basıncı, sigara içme, obezite, yüksek yağ içeren diyet, hareketsizlik, diabetes ve bulaşıcı hastalıkları içermektedir²⁸.

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar, birçok faktörün yanı sıra bozulmuş lipid profili, hipertansiyon ve sigara kullanımının kardiyovasküler hastalıklarda en önemli risk faktörleri olduğunu göstermekle birlikte aterosklerozun etiyolojisini, hücresel ve moleküler düzeyde meydana gelen olayları açıklamaya yönelik çalışmalar devam etmektedir (Tablo 1).

Ateroskleroza ve kalp hastalıklarına ailesel yatkınlık, bazen diğer risk faktörlerinin ailesel yoğunlaşmasıyla ilgiliyken bazen de ileri derecede yüksek kan lipid düzeylerine neden olan lipoprotein metabolizmasının iyi bilinen herediter genetik bozukluklarıyla ilgilidir. Bunların en iyi bilinen örneği ailesel hiperkolesterolemidir ancak çoğu defektif apolipoprotein oluşmasına yol açan mutasyonlarla karakterli giderek sayıları artan ailesel dislipoproteinemiler tanımlanmaktadır. Aterosklerozun erken lezyonları çocuklukta oluşuyor olsa da, iskemik kalp hastalığından ölüm hızlarıyla değerlendirilebilen, hastalığın klinik olarak belirginleşmesi ileri yaşlar da dahil yaş dekatlarıyla paralellik göstermektedir^{3,29}.

Tablo 1: Aterosklerotik risk faktörleri

Değiştirilemeyen Faktörler	Değiştirilebilir Faktörler
Yaş	Sigara içme
Cinsiyetin erkek olması	Hipertansiyon
Ailesel yatkınlık	Obezite
Diyabet	Hiperlipidemi
	Hiperglisemi
	Düşük HDL Düzeyleri
	Yüksek LDL Kolesterol Düzeyleri
	Fiziksel inaktivite

Diğer faktörlerin eşit olması halinde erkekler ateroskleroza kadınlardan daha çok yatkındır. Aynı yaş grubundaki erkeklerde kardiyovasküler insidansın ve menapoz dönemi kardiyovasküler hastalık riskinin kadınlarda daha yüksek olması cinsiyete bağlı seks hormonlarındaki farklılıkların kardiyovasküler hastalık gelişiminde anahtar rol oynadığını gösterirken, elde edilen veriler vasküler biyolojideki cinsiyete bağlı farklılıkların sadece seks steroidlerinin düzeyindeki farklılıktan değil aynı zamanda cinsiyete bağlı doku ve hücrel farklılıklardan da kaynaklandığını göstermektedir^{30,31}.

Ateroskleroza temel risk faktörlerinden biri de sigaradır. Sigara kalp hızında, sistemik ve koroner vasküler dirençte, miyokardial kontraktilitede ve miyokardial oksijen ihtiyacında artış gibi hemodinamik değişikliklere neden olmaktadır. Bu kısa süreli etkiler sigara içenlerde iskemik eşiği düşürerek akut kardiyovasküler olayların riskini artırmaktadır. Uzun süreli sigara kullanımı endotel hücrelerine direkt toksik etki yapmaktadır. Sigara nitrik oksit inaktivasyonunu ve LDL oksidasyonunu ve sistemik inflamatuvar cevabı artırmaktadır. Serbest radikal oluşturarak ve eksojen ve endojen antioksidanları down regüle ederek endotelial hücrelerde,

monositlerde ve vasküler düz kas hücrelerinde disfonksiyona yol açmaktadır ve sigaranın bırakılması artmış riski zaman içinde dramatik olarak düşürmektedir³²⁻³⁴.

Ateroskleroz için her yaşta temel bir risk faktörü olan hipertansiyon, 45 yaş sonrasında hiperkolesterolemiden bile daha önemli olabilmektedir. Framingham çalışmasında 45-62 yaşlar arasında kan basıncı 160/95 mmHg üzeri erkeklerin kan basıncı 140/90 ve daha altında olanlara göre 5 kez artmış riske sahip oldukları gösterilmiştir. Diyastolik düzey, sistolik düzeyden daha önemli gibi görünmektedir. Fiziksel aktivitenin serum HDL düzeyini arttırarak iskemik kalp hastalığından koruduğu, tersine fizik aktivite sınırlılığının ateroskleroz gelişimine katkısı olduğu yönünde somut veriler bulunmaktadır. Benzer şekilde şişmanlık da aterosklerotik risk faktörü olarak ortaya çıkmaktadır. Framingham çalışması %30'u aşan kilo fazlasının iskemik kalp hastalığı mortalite hızını arttırdığını göstermektedir. Obezite yüksek kolesterol seviyesiyle birlikte olmadığı ve bunu arttırmadığı sürece tek başına spesifik risk faktörü değildir^{3,35}.

Ateroskleroz için temel bir risk faktörü olduğu, evrensel bir veri olarak kabul edilen dislipidemilerde, çoğu verinin spesifik olarak hiperkolesterolemiyi işaret etmesine karşılık, hipertrigliseriminin de hiperkolesterolemi kadar önemli olmasa da aterosklerozda rolü bulunmaktadır¹⁸. Klinik çalışmalar yüksek LDL düzeylerinin ateroskleroz için risk faktörü olduğunu ve LDL kolesterolünün düşürülmesinin aterosklerotik plakları stabilize edebileceğini ve aterosklerotik ilerlemeyi engelleyebileceğini göstermektedir^{37,38}.

Yapılan çalışmalar Lipoprotein (a), LDL ve HDL'nin alt fraksiyonları ve modifiye LDL'nin yanı sıra oksidatif stres, apo E feno/genotipi fibrinojen ve homosistein gibi faktörlerin de aterosklerotik süreçte rol oynadığını göstermektedir^{4,39-42}.

2.2. Lipoprotein Metabolizması

Suda çözünmeyen kolesterol ve kolesterol esterleri, triaçilgliserol ve fosfolipidler, kullanılacakları ya da depolanacakları dokulara, apolipoprotein adı verilen özgül taşıyıcı proteinlerin fosfolipidler, kolesterol esterleri ve triaçilgliserollerin birleşimleriyle oluşan plazma lipoproteinleri şeklinde taşınmaktadırlar. Lipoproteinlerin her bir sınıfı sentez noktasıyla, lipid bileşimiyle ve apolipoprotein içeriğiyle birbirinden farklılaşan bir işleve sahiptir. Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL)2 ve 3, düşük dansiteli lipoprotein (LDL), ara dansiteli lipoprotein (IDL), çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) 1 ve 2 olarak adlandırılan insan plazmasındaki lipoproteinlerde farklı birçok apolipoprotein tanımlanmıştır (Tablo 2). Bunlar büyüklüklerine, özgül antikolarla tepkimelerine ve lipoprotein sınıflarındaki karakteristik dağılımlarına göre ayırdedilebilir. Bu protein bileşenleri sinyal olarak davranarak lipoproteinleri özgül dokulara yönlendirmede veya lipoprotein üzerinde görev yapan enzimleri aktifleştirmede görev yapmaktadırlar⁴³⁻⁴⁵.

Tablo 2: Apolipoprotein alt fraksiyonları. Lp(a); Lipoprotein a, Apo; apolipoprotein, LCAT; lesitin:kolesterol açıltransferaz, LPL; lipoprotein lipaz, TG; trigliserid, CETP; kolesterol ester transfer proteini, ABCA1; adenosin trifosfat bağlayıcı kaset protein A1.

Apo(a)	Lp(a)'nın yapısal proteini; plazminojen aktivasyonunun inhibitörü
Apo AI	HDL'nin yapısal proteini; lesitin kolesterol açışl transferazı (LCAT) aktive eder.
Apo AII	HDL'nin yapısal proteini; hepatik lipazı aktive eder
Apo AIV	Lipoprotein lipaz (LPL) ve LCAT'nin aktivatörü
Apo B-100	VLDL, IDL, LDL ve Lp(a)'nın yapısal proteini; LDL reseptörü için ligand görevindedir ve VLDL'nin karaciğerde toplanması ve sekresyonu için gereklidir
Apo B- 48	Apo B-100'ün yarısını içermektedir ve şilomikronların toplanması ve sekresyonu için gereklidir.
Apo C-I	LCAT'nin aktivatörü
Apo C-II	LPL'nin aktivasyonu ve aktivitesi için gerekli kofaktördür
Apo C-III	Trigliseritçe zengin olmayan lipoproteinlerin apo E klirensini bloke eder ve LPL ve hepatik lipaz tarafından TG yıkılımı inhibe eder.
Apo D	CETP için kofaktördür.
Apo E izoformları	VLDL kalıntılarının ve şilomikronların sirkülasyondan uzaklaştırılması için hem hepatosit hem de LDL reseptörü için ligandır.
Apo E-2	LDL reseptörüne olan afiniteyi azaltır; disbetalipoproteinemi ile alakalıdır.
Apo E-4	LDL reseptörüne olan afiniteyi artırır ve hepatik lipazla ilişkilidir.

2.2.1. Şilomikron (SM)

Diyetsel lipidlerin ince barsaklardan karaciğere ve periferel dokulara taşınmasında, dansitesi en düşük lipoprotein olan şilomikronlar görev yapmaktadır. Enterositlerce sentezlenen olgunlaşmamış şilomikronlar, en yüksek trigliserit/kolesterol oranına sahip olup primer olarak Apo B-48 ve Apo A-II taşımakta ve diyetel lipid miktarına bağılı olarak çapı 75-3000 nm arasında değışiklik göstermektedir. Şilomikronlar intestinal lenfatik kapillerlere

salınırlar ve mezenterik lenfatik damarlar yoluyla torasik lenfatik kanala geçip Apo C-II ve Apo E'yi aldıktan sonra genel kan dolaşımına katılırlar. Doku kapillerlerinde şilomikronların Apo C-II ile aktive olan lipoprotein lipaza bağlanmasıyla şilomikronlardaki trigliseridler hidroliz olmaktadır. Trigliseridlerin, Apo C-II ve Apo A'nın uzaklaştırılmasıyla çapı küçülen yapı şilomikron remnantı olarak adlandırılmaktadır. Şilomikron remnantı Apo B-48, Apo E ve kolesterol esterlerince zengin olup kan dolaşımından karaciğere alınır. Hepatositler karaciğerde şilomikron remnantını reseptör aracılı mekanizmayla alan hücrelerdir. Apo E ligandını tanıyan LDL reseptör yolağı ŞM alımında majör yolken, LDL reseptörüyle ilişkili protein (LRP) 1 de düşük oranda da olsa ŞM alımına katkıda bulunmaktadır⁴⁶⁻⁴⁸.

2.2.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein (VLDL)

VLDL, endojen trigliseridlere ek olarak serbest kolesterol, kolesterol esterleri, fosfolipid, Apo B-100, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo E apolipoproteinlerini de içeren trigliseridce zengin, başlıca karaciğerden salınan lipoproteindir. VLDL sentezi sırasında Apo B-100 endoplazmik retikulumun lümenine hareket ederek pre-VLDL'yi oluşturmak üzere mikrozomal trigliserit transfer proteini (MTP) aracılığıyla lipidlerle birleşmektedir. Pre-VLDL daha sonra lipid almaya devam ederek VLDL₂'yi oluşturmaktadır. Oluşan VLDL₂ golgiye transfer edildikten sonra ya dolaşıma salınmakta ya da trigliserid yönünden daha zengin VLDL₁'e dönüşmektedir^{45,46}. Salgılanan VLDL partikülünün tipi plazma lipoproteinlerinin aterosklerozde önemlidir. VLDL₁'in salınmasının küçük yoğun LDL'nin düzeyini artırıp HDL düzeyini azalttığı, bunun da ateroskleroz gelişimini ilerlettiği gösterilmiştir⁴⁹. Apo C-II, endotelede bulunan lipoprotein lipazı aktive ederek VLDL' deki trigliseridlerin hidrolizini sağlamakta bunu sonucunda daha küçük partikül büyüklüğüne sahip VLDL remnantı ve

sonrasında eşit oranda kolesterol ve trigliserid içeren ara dansiteli lipoprotein (IDL) oluşmaktadır^{45,46}.

2.2.3. Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)

1600 kolesterol esteri molekülü ve 170 trigliserid molekülünden oluşan LDL partiküllerinin çekirdeği, başlıca lesitin, küçük miktarlarda sfingomiyelin ve lizolesitin gibi 700 molekül fosfolipid ve 600 molekül kolesterol içeren polar tek tabakalı bir yapıyla çevrilidir⁵⁰. Dış tabakada gömülü olan bir Apo B-100 molekülü bulunmakta ve lipoprotein yüzeyini stabilize etmektedir. Karaciğerde sentezlenen Apo B-100 LDL partikülünün toplam hacminin %20'sini oluşturmaktadır. LDL molekülündeki yağ asitlerinin yaklaşık yarısı başlıca linoleik asit ve az miktarlarda araşidonik asit ve dokosahekzaenoik asit olmak üzere poliansatüre yağ asitlerinden (PUFA) oluşmaktadır. PUFA'lar serbest radikal atağına ve oksidasyona karşı antioksidanlar tarafından korunmaktadır. Bunların başta geleni α -tokoferoldür ve her bir LDL partikülünde 6-12 molekül α -tokoferol bulunmaktadır. Daha az miktarlarla mevcut olan antioksidanlar ise γ -tokoferol, karotenoidler, kriptoksantin ve ubikinol-10'dur⁵¹. PUFA ve antioksidanların miktarı bireyler arasında farklılık göstermekte ve LDL'nin oksidasyona duyarlılığına etki etmektedir⁵². LDL partiküllerinin ana işlevi periferik dokulara kolesterol sağlamaktır. Karaciğer tarafından sentezlenen kolesterolün ekstrahepatik dokulara transportu için, kolesterol VLDL'nin yapısına katılmakta, VLDL önce IDL'ye, daha sonra LDL'ye dönüşmektedir. 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 içermektedir⁵³.

Dolaşımdaki LDL'nin büyük bir kısmı karaciğerdeki Apo B-100 ve Apo E ligandını tanıyan LDL reseptörleriyle endositoz yoluyla hücrelere alınmaktadır. LDL reseptör aktivitesi intrasellüler serbest kolesterol miktarı ile

negatif olarak düzenlenmektedir. Bu, hücrelerin aşırı miktarda kolesterol ile dolmasını önleyen bir mekanizmadır⁵⁴.

2.2.3.1. LDL Oksidasyonu

Monosit/makrofajlar LDL'yi okside edebildiğinden ve oluşan okside-LDL, kolesterol ihtiyacı olan hücrelerin yüzeyindeki LDL reseptörleriyle alınamadığından kan dolaşımındaki kolesterol düzeyleri artmaktadır. Makrofajlar üzerinde bulunan reseptörün oksidatif olarak modifiye LDL'ye karşı yüksek bir afiniteye sahip olması⁵⁵, makrofajların doğal LDL için sınırlı sayıda reseptöre sahip olduğunun gözlenmesi, Brown ve Goldstein'in LDL'nin makrofajlardaki 'çöpçü reseptörler' olarak adlandırdıkları reseptörler tarafından alınmadan önce modifiye olması gerektiği görüşü üzerinde birleşmesine neden olmuştur. Brown ve Goldstein, in vitro olarak asetile LDL'nin makrofajlarda bulunan çöpçü reseptörler tarafından hızla alındığını göstermelerinden sonra³⁹, araştırmalar LDL'yi in vivo değiştirebilecek mekanizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır. Endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri ve monosit/makrofajlar kullanılarak yapılan birçok çalışma LDL'nin fizikokimyasal olarak okside olduğunu göstermiştir⁵⁷⁻⁵⁹.

Reaktif oksijen türlerinin poliansatüre yağ asitlerine atağıyla başlayan LDL oksidasyonunda, okside olan poliansatüre yağ asitleri reaktif aldehit bileşiklerine yıkılmakta, oluşan bu bileşikler Apo B-100'ün lizin gruplarıyla reaksiyona girerek LDL partikülünün yükünü değiştirmektedir⁶⁰(Şekil 2).

arttırarak monosit ve lenfositlerin intimaya göçünü ve inflamatuvar reaksiyonları artırmakta, antitrombotik yüzeyin kaybına neden olurken düz kas mitojenik faktörlerinin üretimine neden olmaktadır⁶⁴⁻⁶⁷.

Subendotelyal alanda bulunan okside LDL'nin küçük bir fraksiyonu dolaşıma katılmaktadır ve dolaşımdaki total LDL havuzunun %0.5'ini oluşturmaktadır⁶⁸. Hiperlipidemik hastalarda okside LDL düzeylerinin artışına dair kesin kanıt bulunmamaktadır. Okside LDL'nin LDL miktarına oranı gösterildiği zaman bile, hiperlipidemik hastalar ve normolipidemik bireyler arasında farklılıkların gözlenmediği bildirilmiş olmakla birlikte yapılan çalışmalardan bazıları plazma okside LDL düzeylerinin vasküler hastalıklarda önemli derecede arttığını göstermektedir.

Okside LDL klirensine asıl önemli katkı yapan retikula endotel sistem olarak görülmektedir. Kupfer hücrelerinin, SR-A çöpçü reseptörlerini taşıdığı ve okside LDL'nin dolaşımdan hızla uzaklaştırılmasını sağladığı gösterilmiştir^{69,70}. Kupfer hücreleri, enzimler ve immünolojik sistemler okside LDL'nin sirkülasyondan uzaklaşması için birlikte çalışmaktadır. Bu fonksiyonlarından dolayı insan plazma okside LDL düzeyleri dar bir konsantrasyon aralığında sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir.

2.2.4. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)

Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), karaciğer ve ince barsakta sentezlenen, %70'i fosfolipid ve proteinden, %5 oranında trigliserid ve %25 oranında kolesterolden oluşan heterojen bir lipoproteindir. HDL partikülleri yüzeyinde serbest kolesterol, fosfolipid ve birçok apolipoprotein içeren (Apo AI, Apo AII, Apo C, Apo E, Apo 4, Apo J ve Apo D) amfipatik dış tabaka ile trigliserid ve kolesterol ester bakımından zengin hidrofobik çekirdekten oluşmaktadır^{71,72}. HDL partikülleri paraoksonaz, platelet aktive edici faktör-

asetilhidrolaz, lesitin-kolesterol aıl transferaz (LCAT) ve kolesterol ester transfer protein (CETP) gibi enzimleri de tařımaktadır⁷².

HDL partikülleri boyutlarına ve lipid içeriklerine göre HDL1, HDL2, HDL3 ve HDL4 olmak üzere alt sınıflara ayrılmaktadır. Bunlardan insan plazmasında baskın olan iki alt sınıf; lipidce daha zengin ve büyük olan HDL2 ile daha küçük ve yoğun olan HDL3 lipoproteinleridir⁷¹.

HDL metabolizması başlıca beş ana süreçten oluşmaktadır. 1- Apo AI'in sentezi ve olgunlaşmamış HDL olarak plazmaya salınması, 2- periferden serbest kolesterolün alınması, 3- kolesterolün esterleşmesiyle büyük sferik partiküllere olgunlaşması, 4- kolesterol esterlerinin karaciğer, steroidojenik organlar ve Apo B içeren lipoproteinlere taşınması, 5- Apo AI'in yıkımı.

Apo AI, karaciğer ve barsaklardan lipidce fakir olarak sentezlenip salınmaktadır. Olgunlaşmamış HDL fosfolipidi ve serbest kolesterolü, dokulardan ve makrofajlardan ABCA1, ABCG1 veya pasif difüzyonla alarak diskoidal HDL'ye dönüşmektedir. LCAT, Apo AI ile aktive olup kolesterolle etkileşime girerek diskoidal HDL'ye bağlı kolesterolün esterleşmesini sağlamaktadır. Esterleşen kolesterol HDL partikülünün çekirdeğine g  eder, HDL sferik olgun HDL'ye dönüşmektedir. HDL'deki esterleşmiş kolesterol karaciğere, SR-B1 reseptörleriyle ve eğer HDL Apo E içeriyorsa çok az oranda LDL reseptörleriyle alınmaktadır. CETP, karaciğerden salınıp HDL'ye bağlanarak kolesterol esterlerinin ve trigliseridlerin Apo B içeren lipoproteinler ile HDL arasında değişimini sağlamaktadır. Bu değişim HDL'den kolesterol esterlerinin VLDL ve LDL'ye, trigliseridlerin de VLDL'den HDL ve LDL'ye transferini sağlamaktadır. Trigliseridlerin hepatik lipazla hidrolizi ve kolesterol esterlerinin uzaklaştırılması sonucu daha küçük yoğun HDL oluşmaktadır^{11,43,44,72}.

HDL'nin antiaterojenik fonksiyonu hücrelerden kolesterolü uzaklaştırabilmesiyle yani ters kolesterol taşınmasıyla ilişkilendirilmiştir. HDL periferel dokulardan ve makrofajlardan kolesterolü uzaklaştırırken, kolesterol esterlerini plazma veya hepatik alıcı proteinlere vermektedir.

Geri kolesterol taşınımında meydana gelen bir bozukluk kolesterolün arteriyel duvarda birikmesine ve ateroskleroz gelişimine katkıda bulunabilmektedir⁷³. Birçok çalışma artmış plazma HDL düzeyinin koruyucu niteliğini ve düşük düzeylerinin ise hastalık riskini arttırdığını göstermiştir^{74,75}.

Normal koşullarda HDL, LDL'nin oksidasyonunu antioksidan bileşenleri Apo A1, paraoksonaz ve glutatyon aracılığıyla inhibe etmekte lipid peroksidleri inaktive ederek okside LDL'nin damar duvarına infiltrasyonunu engellemektedir^{43,76}. Ayrıca HDL üzerinde taşınan platelet aktive edici faktör asetil hidrolaz okside LDL'den, okside olmuş yağ asitlerini uzaklaştırarak etkilerini nötralize etmektedir⁷⁷ ancak in vivo enzim HDL'den çok LDL'de tanımlanmıştır⁷⁸.

Kardiyovasküler koruyucu etkileri ters kolesterol taşınmasına atfedilse de HDL'nin antiaterojenik etkilerinde önemli rol oynayan antioksidan, antiinflamatuvar ve antitrombotik etki gibi birçok pleiotropik etkileri de bulunmaktadır^{43,72}.

Hem LDL hem de HDL oksidasyona uğrasa da sadece okside LDL çöpçü reseptörler tarafından tanınmakta ve makrofajlarca alınmaktadır⁷⁹. Okside HDL'nin hücrelerden kolesterolü alma kapasitesinin azaldığı gösterilmiştir¹² ancak genetik LCAT eksikliği olanlarda aterosklerozda artış gözlenmemesine bağlı olarak⁸⁰ HDL'nin serbest radikallere karşı sünger görevi görüp lipid peroksidasyonunu engellediği, dolaşımdaki peroksidlerin majör taşıyıcısı olan HDL'nin okside formlarının intimal bölgedeki düzeyinin yüksek olduğu öne sürülmüştür.

2.2.5. Paraoksonaz Enzimleri (PON 1, PON 2 ve PON 3)

Genleri birbirine komşu ve 7.kromozomun uzun kolu üzerinde lokalize olmuş PON enzim ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç enzimden oluşmaktadır. İnsan PON genleri aminoasit düzeyinde %65, nükleotid düzeyinde yaklaşık %70 benzerlik göstermektedir^{81,82}.

İnsanlarda PON1 başlıca karaciğerde, PON3 karaciğer ve böbrekte eksprese edilirken her iki enzimin gen ürünleri dolaşımda HDL'ye Apo A1 ve Apo J üzerinden bağlı olarak bulunmaktadır. PON2 geni ise kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, plasenta, dalak, mide ve testis gibi birçok dokuda eksprese edilir ancak protein ürünü intrasellüler bir enzim olup plazmada bulunmamaktadır⁷⁰. Ayrıca PON2, endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofajları içeren arter duvarı hücrelerinde de tespit edilmiştir^{81,83,84,85}.

PON1; 45 kDa moleküler ağırlığa sahip, organofosfat bileşiklerinin hidrolizini katalizleyen arildialkilfosfataz olarak da adlandırılan, hem aktivitesi hem de stabilitesi için kalsiyum bağımlı olan bir ester hidrolazdır⁶⁹. PON3 dolaşımda PON1'e kıyasla çok düşük düzeylerde bulunan yaklaşık 40 kDa ağırlığında olan bir proteinken⁸⁶ PON2 yaklaşık 44 kDa moleküler ağırlığa sahip geniş ölçüde ekspresyona uğrayan intrasellüler bir proteindir⁸⁴.

Bu enzimlerin fizyolojik rolleri hala tam aydınlatılmamış olmakla birlikte PON1; paraoksonaz, arilesteraz ve laktonaz aktivitesine sahip olup ksenobiyotik toksisitesine karşı koruyucudur^{87,88}. PON2 ve PON3 organofosfat substratlarına karşı aktif olmayıp laktonaz aktivitesi göstermektedirler⁸⁹.

İnsanlarda serum PON1 enziminin iki genetik polimorfizmi tanımlanmıştır. Bu iki polimorfizmden biri 55. kodondaki metiyoninin lösinle (M/L55), diğeri ise 192. pozisyonundaki glutaminin argininle yer değiştirmesidir (Q/R 192). M/L55 polimorfizmi enzimin konsantrasyonunu etkilerken, Q/R 192

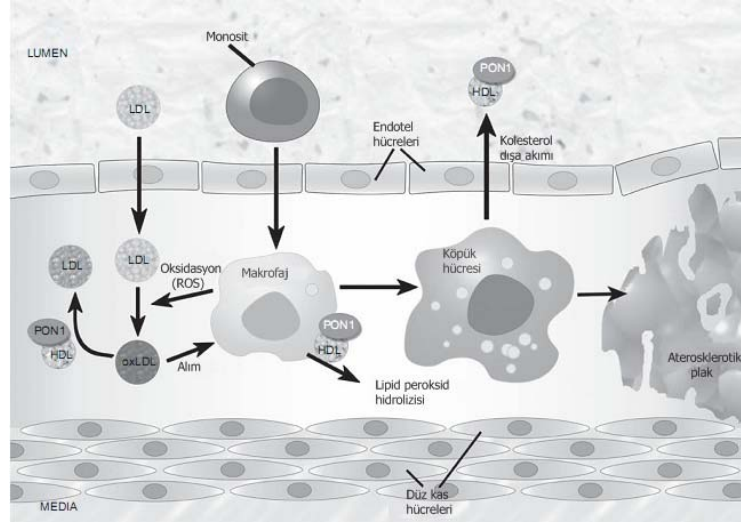
polimorfizmi enzimin katalitik aktivitesini etkilemektedir. Bu iki genetik polimorfizme ek olarak, PON1 ekspresyonunu etkilediği düşünölen, PON1'in promotör bölgesinde en az beş farklı polimorfizm belirlenmiştir^{81,90-93}

PON1 enzim aktivitesi yenidoğanlarda erişkin düzeyinin yarısı kadardır. Bir yılda erişkin düzeyine ulaşmakta ve yaşam boyu aynı düzeyde kalmaktadır. PON1 aktivitesinde yaklaşık 10-40 kat arasında değişen bireysel farklılıklar gözlenmektedir⁸¹. Genetik etkilerin yanı sıra sigara^{94,95}, vitamin C ve E tüketimi⁹⁶, alkol alımı⁹⁷ gibi çevresel faktörlerin de PON1 ekspresyonunu ve aktivitesini etkilediği gösterilmiştir.

2.2.6. Paraoksonaz Enzimleri ve Aterosklerozdaki Koruyucu Roller

PON1 en çok araştırılan paraoksonaz enzimi olup yapılan çalışmalar, polimorfizmin ve enzim aktivitesinin birçok hastalıkla ilişkili olduğunu, ailesel hiperkolesterolemi, diyabet ve kronik renal yetmezlik gibi lipid metabolizması bozukluklarının eşlik ettiğı hastalıklarda HDL-PON1 aktivitesinin düşük olduğunu göstermiştir⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Oksidasyon koşullarında inkübe edildiğinde HDL'nin, LDL'de lipid peroksitlerinin oluşumunu engellediğı¹⁰¹, bu aktiviteden PON1'in sorumlu olduğu gösterilmiştir¹⁰². Watson ve arkadaşları minimal okside LDL'deki biyolojik olarak aktif moleküllerin multioksiyene fosfolipidler olduğunu ve bu oksidasyon ürünlerinin PON1 için substrat olduğunu gösterdiler¹⁰³. PON1, hem LDL hem de HDL'yi lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır. PON1'in HDL'nin oksidasyonunu inhibe etmesi, HDL'nin ters kolesterol trasportundaki antiaterojenik etkilerini sürdürmesini sağlamaktadır¹⁰⁴ (Şekil 3).



Şekil 3 : PON1'in aterosklerozdaki koruyucu rolü

PON1'in, okside olmuş lipoproteinlerdeki okside kolesterol esterlerini ve okside fosfolipidleri hidroliz ettiği^{104,105}, okside eikozanoid ve dokosanoidlere karşı yüksek aktivite gösterdiği bildirilmiştir¹⁰⁶. Okside LDL ve okside HDL'deki okside lipidlerin PON1'i inaktive ettiği, PON1R izoformunun PON1Q izoformundan daha fazla inaktive olduğu bildirilmiştir^{107,108}. Monoenoik asitlerin ve bunların fosfolipidlerinin, PON1'in oksidatif inaktivasyondan korunmasında yararlı olduğu, bu anlamda en etkin yağ asidinin oleik asit olduğu gösterilmiştir¹⁰⁹.

Lipid peroksidasyon ürünlerinin LDL proteinine bağlanmasının ve lipid peroksidlerinin LDL'de birikiminin PON1 varlığında azaldığı¹¹⁰, PON1'de 248. konumdaki serbest sülfidril grubunun lipoproteinlerin lipid peroksidasyonuna karşı korunması için gerekli olduğu gösterilmiştir¹¹¹. Okside LDL'de bulunan lipid peroksidasyon ürünü 4-hidroksinonenalin ve okside fosfolipidlerin, monositlerin dokuya göçünü ve burada makrofajlara dönüşümünü regüle eden kemokin olan monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1)'in üretimini stimüle ettiği in vitro olarak gösterilmiştir¹¹². Yine kültüre makrofajlarda yapılan çalışmalar; PON1'in kolesterol çıkışını arttırdığını, ABCA1 taşıyıcılarının aktivitesini stimüle ettiğini, HDL'nin hücreye

bağlanmasını ve HDL tarafından kolesterolün alımını arttırdığını göstermiştir¹⁰¹. Apolipoprotein AI^(-/-) ve LDL reseptör^(-/-) knock-out farelerde düşük PON1 aktivitesi, ateroskleroz gelişiminde artış, ters kolesterol taşınmasında azalma ve MCP-1 konsantrasyonunda artma gösterilmiştir¹¹⁴.

PON2 ve PON3 genleri, Primo-Parmo ve arkadaşları tarafından 1996 yılında belirlenmiş olup¹¹⁵, bu proteinler hakkında günümüzde çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalar; PON2 polimorfizminin serum kolesterol ve Apo AI konsantrasyonu ile ilişkili olduğunu¹¹⁶, proaterojenik diyet verilen farelerde PON2 eksikliğinin oksidatif stresi, inflamasyonu ve ateroskleroz gelişimini şiddetlendirdiğini¹¹⁷, PON3'ün sadece kardiyovasküler hastalıklarla değil obeziteyle de ilişkili olduğunu göstermiştir¹¹⁸.

2.3. Homosistein Metabolizması

İnsanlarda homosistein (Hcy) diyetle alınan metiyoninden biyolojik metilasyon reaksiyonlarının bir yan ürünü olarak oluşan ve sülfür içeren bir aminoasittir. Diyetle alınan metiyonin sindirim sisteminde proteinlerin parçalanmasıyla serbest kalmaktadır. Serbest metiyonin kandan organlara taşınmakta ve hücreler tarafından alınmaktadır. Hücre içinde metiyonin protein biyosentezinde kullanıldığı gibi genel bir metil donörü olan S-adenozil metiyonin (AdoMet) sentezinde de kullanılmaktadır. Biyolojik metilasyon reaksiyonlarının bir sonucu olarak S- Adenozil metiyonin metil grubunu vererek S-adenozil homosisteine (SAH) dönüşmektedir. Bu bileşik daha sonra tersinir enzimatik hidroliz sonucu adenosin ve homosisteine dönüşmektedir. Homosistein remetilasyon yoluyla metiyonine veya transsülfürasyon yoluyla sisteine metabolize olmaktadır¹¹⁹⁻¹²¹.

2.3.1. Homosisteinin Remetilasyon Yolağı

Metiyonin homosistein dönüşüm reaksiyonları tetrahidrofolat türevlerinin kullanıldığı reaksiyonlardır. Homosisteinin metiyonine remetilasyonu iki farklı yolla gerçekleşmektedir. *Birincisinde*; vitamin B₁₂ ve 5-metiltetrahidrofolat gerekmektedir. Burada metil grubu vericisi 5-metiltetrahidrofolattır. 5,10-metilentetrahidrofolat metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi aracılığıyla 5-metiltetrahidrofolata indirgenmektedir. 5-metiltetrahidrofolatın bir metil grubu vitamin B₁₂ bağımlı metiyonin sentaz (MS) enzimi aracılığıyla homosisteine aktarılmakta ve böylece metiyonin oluşmaktadır. Homosistein remetilasyonu her organın hücrelerinde meydana gelmekte ayrıca oluşan tetrahidrofolat tekrar 5,10-metilentetrahidrofolata dönüşmektedir³. *İkinci yolda ise*; homosisteinin metiyonine remetilasyonu, karaciğer ve böbrekte betain: homosistein metiltransferaz (BHMT) enzimiyle katalizlenen alternatif bir yolla olmaktadır¹¹⁹⁻¹²⁰.

2.3.2. Homosisteinin Transsülfürasyon Yolağı

Transsülfürasyon metabolik yolunda homosistein serinle birleşerek vitamin B₆ bağımlı bir enzim olan sistatyonin β-sentaz (CBS) ile sistatyonine dönüşmektedir. Sistatyonin, sistatyonin γ-liyaz enziminin katalizliğinde sisteine dönüşmektedir. Sistein ise inorganik sülfata hidroliz olarak idrarla atılmaktadır¹¹⁹⁻¹²⁰.

2.3.3. Homosisteinin Metabolik Regülasyonu

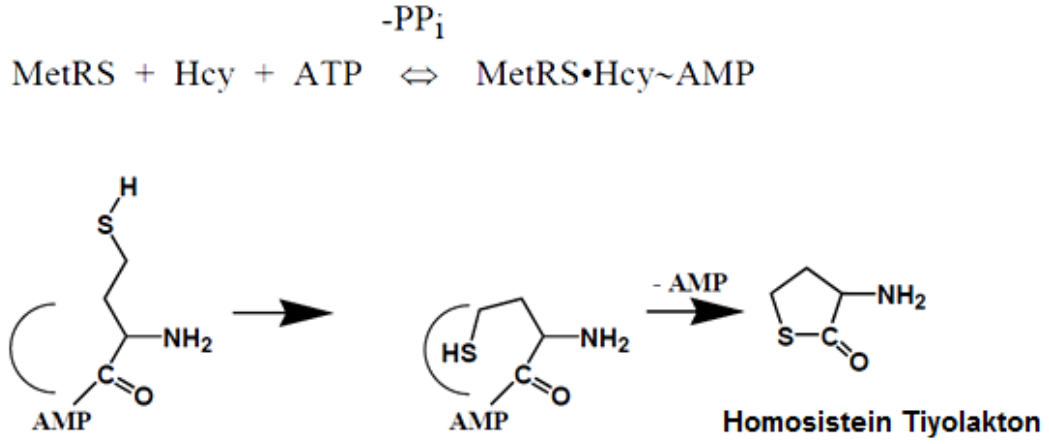
Homosistein düzeyleri metiyonin sentaz enzimi katalizliğinde, metiyonine remetilasyonu yoluyla ve sistatyonin β sentaz enzimi aracılığıyla

sistatyonine transsülfürasyonu yoluyla regüle olmaktadır. Homosisteinin bu iki metabolik yoldaki dağılımı, metiyonin ihtiyacına bağlı olarak S-adenozil metiyonin tarafından koordine bir şekilde regüle edilmektedir. Bu koordine regülasyonun bozulması sonucu hücre içi homosistein hücre dışına çıkmaktadır¹²². Plazma homosistein düzeyleri diyetle alınan metiyoninle direkt ilişkiliyken, homosistein metabolizmasında rol oynayan vitamin B₆, B₁₂ ve folat gibi vitaminlerin diyetel alımıyla ters ilişkilidir^{123,124}. Homosisteinin metabolik yollarındaki enzim defektleri ve vitamin yetersizlikleri de plazma homosistein düzeyinin artmasına yol açmaktadır¹¹⁹.

İnsan plazmasında homosisteinin yaklaşık %70'i başta albumin olmak üzere çeşitli proteinlerle disülfid bağı ile bağlıdır. Geriye kalan %30'u ise oksitlenerek homosistein dimerleri oluşturur veya sisteinle birleşerek karma disülfidleri oluşturur. %1'den azı ise dolaşımda serbest olarak bulunmaktadır¹²⁵. Sağlıklı yetişkinlerde total homosistein aralığı genellikle 5-15 µM'da seyretmekte ve hiperhomosisteinemi plazma total homosistein düzeylerinin 15 µM'ın üzerinde olduğu durumu tanımlamaktadır¹²⁶.

2.3.4.Homosistein Tiyolakton Oluşumu

Homosistein, protein yapısında yer alan metiyonin, izolösün ve lösine benzerliğinden dolayı protein biyosentezinin ilk basamağında bu amino asitlerin yerine metiyonil-, izolösil- ve lösil-tRNA sentetazlarla reaksiyona girerek homosisteinil adenilat oluşturmaktadır. Bunu takiben homosisteinil adenilatın düzenlenmesiyle homosistein tiyolakton (hcy-tiyolakton) açığa çıkmaktadır (Şekil 4). Bütün hücre tiplerinde meydana gelen hcy-tiyolakton memelilerde metiyonil-tRNA sentetaz (MetRS) tarafından oluşturulurken, bakterilerde lösil-tRNA sentetaz (LeuRS) ve izolösil-tRNA sentetaz (IleRS)'ın homosisteini, hcy- tiyolaktona çevirdiği gösterilmiştir^{127,128}.



Şekil 4 : Homosistein Tiyolakton oluşumu

Normal metabolik şartlarda hücre içi homosistein konsantrasyonu düşük olduğundan hcy- tiyolakton sentezi düşüktür ancak sistatyonin β -sentaz, metiyonin sentaz veya metilen tetrahidrofolat redüktaz gibi homosistein metabolizmasında görevli enzimlerin genetik yapılarındaki değişikliklere veya yetersiz folat, vitamin B₁₂ veya vitamin B₆ alımına bağlı olarak Hcy/Met oranının arttığında hcy-tiyolakton sentezi de artmaktadır^{129,130}.

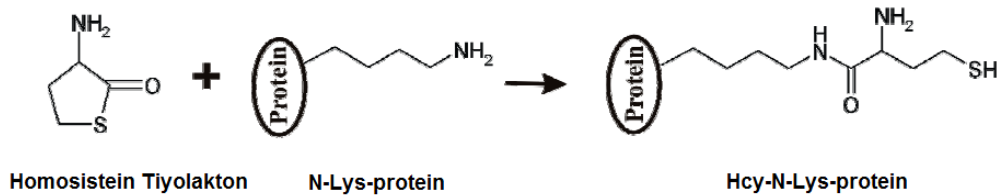
Hcy-tiyolaktonun, insan endotel hücreleri, fibroblastlar, meme kanseri hücreleri ve HeLa hücrelerinde sentezlendiği^{128,131} fizyolojik pH'ta nötral karakterli olması nedeniyle hücre membranlarında difüze olup hücre kültür ortamında biriktiği gösterilmiştir. Analitik metodların geliştirilmesinden sonra serum hcy- tiyolakton konsantrasyonu $\sim 50\mu\text{g/ml}$ veya $\sim 1\mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir¹³².

Homosistein tiyolaktonun insan hücrelerinde ve serumda başlıca iki reaksiyona girdiği in vitro olarak gösterilmiştir^{129,130}.

1. Homosistein tiyolaktonun primer aminlerle nükleofilik katım reaksiyonuna girmesi; proteinlerindeki lizinin ε- amino gruplarıyla amid bağı oluşturarak proteinlerin N-homosisteinilasyonuna sebep olması.
2. Homosistein tiyolaktonun, intrasellüler homosistein tiyolaktonaz/Bleomisin hidrolaz ve HDL'nin bileşeni olan ekstrasellüler homosistein tiyolaktonaz enzimiyle hidrolizi.

2.3.5. Protein N- Homosisteinilasyonu

Hcy- tiyolakton, proteinlerdeki lizinin ε- amino gruplarıyla amid bağı oluşturmak suretiyle N-homosisteinilasyona sebep olan reaktif bir bileşiktir. Protein homosisteinilasyonu, 10nmol/L'lik hcy-tiyolakton konsantrasyonlarında meydana gelmektedir (Şekil 5)^{18,131,133-135}.



Şekil 5 : Protein N-homosisteinilasyonu

İnsan serumu hcy-tiyolaktonla inkübe edildiğinde, protein homosisteinilasyonunun primer yol olduğu³¹, plazma Hcy-N-protein düzeylerinin plazma homosistein düzeyleriyle pozitif, folik asit ve HDL konsantrasyonlarıyla negatif ilişkili olduğu gösterilmiştir^{18,129,134,136}.

Bir proteindeki lizinin ε-amino grubunun yerine N-bağlı homosisteinin gelmesi protein üzerindeki net pozitif yükün azalmasına neden olduğu ve sekonder yapısal değişikliklere yol açtığı için N-

homosisteinilasyon, proteinin yapı ve fonksiyonunu olumsuz etkilemektedir^{132,137}. Yapılan çalışmalar hemoglobin, albumin, γ -globulin, transferin, HDL, LDL, α -1 antitripsin ve fibrinojenin N-homosisteinilasyona uğradığını¹³⁸, yine N-homosisteinilasyonla lizin oksidaz¹³⁹, tripsin¹³³, MetRS¹³³ ve paraoksonaz 1¹⁴⁰ enzimlerinin inaktif hale geldiğini göstermiştir.

Hcy-tiyolakton sentezi gibi protein N-homosisteinilasyonu da CBS veya MTHFR eksikliğinde¹⁴¹, antifolat bileşik olan aminopterin kullanımında¹³¹ artmakta ve folik asit desteğiyle inhibe olmaktadır. İnsanlarda homosisteinin protein yapısına girmesinin otoimmün cevabı¹⁴² ve vasküler inflamasyonu artırarak¹⁴³ aterosklerotik süreci etkilediği düşünülmektedir (Şekil 6). Ayrıca N-Hcy-LDL'nin agregat oluşturma eğiliminde olduğu ve endotelial hücrelerde hücre ölümünü indüklediği in vitro olarak gösterilmiştir¹⁴⁴. Koroner arter hastalığı olan kişilerde anti-N-Hcy protein IgG antikor düzeylerinde artış görülmesi ve homosistein düzeyleriyle korelasyon göstermesi homosistein hipotezini doğrular niteliktedir¹⁴⁵.

2.3.7.Ekstrasellüler Homosistein Tiyolaktonaz

İlk defa 2000 yılında Jakubowski tarafından memelilerde bulunan spesifik bir enzimin hcy-tiyolaktonu homosisteine hidroliz ettiği gösterilmiştir. HDL'nin 45-KDa'luk protein bileşeni olan bu enzimin aktivitesi ve stabilitesi için Ca^{+2} 'un gerekli olduğunu gösteren araştırmacı, bu enzimin doğal substratının hcy-tiyolakton olduğunu ancak enzimin fenil asetat, p-nitrofenil asetat ve organofosfat bileşiği olan paraoksonu da hidroliz ettiğini göstermiştir. Hcy-tiyolaktonaz ve paraoksonaz enzimlerinin, türler arasındaki dağılımının aynı olması, her iki enzimin memeli serumunda bulunması, aynı kromatografik özelliklerde saflaştırılması, fenil asetat, p-nitrofenil asetat ve paraokson için ölçülen kinetik sabitlerinin aynı olması ve kalsiyum bağımlı olup HDL'nin 45-kDa'luk protein komponenti olarak belirlenmesi, hcy-tiyolaktonaz enziminin paraoksonaz enzimiyle aynı enzim olduğunu göstermiştir¹³⁷.

İnsan vasküler endotel hücrelerinin hcy-tiyolakton sentezlediği ve kültür ortamına hcy-tiyolaktonaz eklendiğinde sentezin baskılandığının gösterilmesi sonucunda endotel hücrelerinin hcy-tiyolaktonaz aktivitesi göstermediği bunun da hcy-tiyolaktonun endotel üzerindeki toksik etkilerinde önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır¹²⁹. Hcy-tiyolaktonun toksik etkileri ve hcy-tiyolaktonazın koruyucu rolünü araştırmak amacıyla yapılan çalışmalarda maymunlara kronik homosistein veya hcy- tiyolakton infüzyonunun ateroskleroza yol açtığı, benzer şekilde yüksek hcy-tiyolaktonaz aktivitesine sahip tavşanlarda infüzyonun ateroskleroz oluşturmadığı gösterilmiştir¹³⁷.

2.3.8.İntrasellüler Homosistein Tiyolaktonaz

Hcy-tiyolaktonu intrasellüler olarak yıkan enzimin bleomisin hidrolazla aynı enzim olduğu, bu enzimin serum hcy-tiyolaktonazdan 100 kat daha büyük katalitik etkiye sahip olduğu 2006 yılında Jakubowski ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir¹⁴⁸. İnsanlarda bleomisin hidrolaz doku bağımlı eksprese edilen bir enzim olup, dalak, timus, prostat, overler, ince barsak, kalp, beyin, plesenta ve akciğerde ve en yüksek oranda ise iskelet kası, testis ve pankreasta eksprese edildiği gösterilmiştir¹⁴⁹. İnsan umbilikal ven endotel hücrelerinde hcy-tiyolaktonaz/bleomisin hidrolaz aktivitesinin olmadığı, bu nedenle de endotel hücrelerinin homosistein toksisitesine daha duyarlı olabileceği bildirilmiştir¹⁸.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kalsiyum Klorid Dihidrat.....	Sigma
Trizma (Trishidroksimetilaminometan).....	Sigma
Trizma Hidroklorid.....	Fluka
4-Nitrofenol.....	Sigma-Aldrich
Paraoksan (Dietil <i>p</i> -nitrofenil fosfat)	Sigma

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

Hassas Terazı	AND GR-200
Vorteks	Vibrolabo
pH Metre	WTW-İnolab
Magnetik Karıştırıcı	Nüve
Ultrasonik Banyo	Bandelin Sonorex
Yüksek Devirli Soğutmalı Santrifüj	Jouan MR 1822
Derin Dondurucu	Jouan
Otomatik Pipetler (50, 100, 1000 µl)	Eppendorf
Spektrofotometre.....	Shimadzu V-160 A
ELISA Okuyucu	Tricontinent
Ox-LDL ELISA Kiti	İmmundiagnostik
Homosistein Tiylaktonaz kiti	Cosmo Bio.Co.

3.3. Çalışmaya Katılan Hasta ve Kontrol Grupları

3.3.1. Hasta ve Kontrol Grubu

Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı Polikliniğinde kararlı anjina pektoris öntanısı ile koroner anjiyografi yapılmasına karar verilmiş hastalardan oluşturuldu. Anjiyografi bulgularına göre koroner arter hastalığı olan 36 kişi hasta grubu, koroner arter hastalığı olmayan 12 kişi kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Koroner aterosklerozun (KAH) şiddeti “*Gensini Skorlaması*” ile tayin edildi¹⁵⁰. Hasta grubunda Gensini Skoru 1-20 arasındakiler hafif KAH, 20 ve üzeri olanlar şiddetli KAH olarak kabul edildi.

Hasta ve kontrol grubuna Tablo 3’te verilen anket formu uygulandı.

3.4. Kan Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerden 12 saatlik açlık sonrası yapılan koroner anjiyografiden hemen önce alınan kan örnekleri serum elde edilmek üzere 5000xg’de 15 dak. santrifuj edildi. Ayrılan serumlar -70°C’de analiz süresince saklandı.

Tablo 3: Hasta ve kontrol grubuna uygulanan anket formu

Adı-Soyad ı:

Cinsiyet :

Yaş :

Boy/Kilo :

VKİ :

Aile Öyküsü :

KAH Öyküsü :

Hipertansiyon : ☐ Evet ☐ Hayır

Diabetes Mellitus : ☐ Evet ☐ Hayır

Kullandığı İlaçlar :

Doz :

Süre :

Sigara Kullanımı :

☐ İçmeyen ☐Önce Bırakmış ☐ İçen.....sigara/gün.....yıldır

Alkol Kullanımı : ☐ Hayır ☐ml/gün,ay,yıl

Diastolik/Sistolik Kan Basıncı :...../.....

Açlık kan Şekeri :

Üre :

Kreatinin :

Ürik Asit :

Total Kolestrol :

Trigliserid :

HDL :

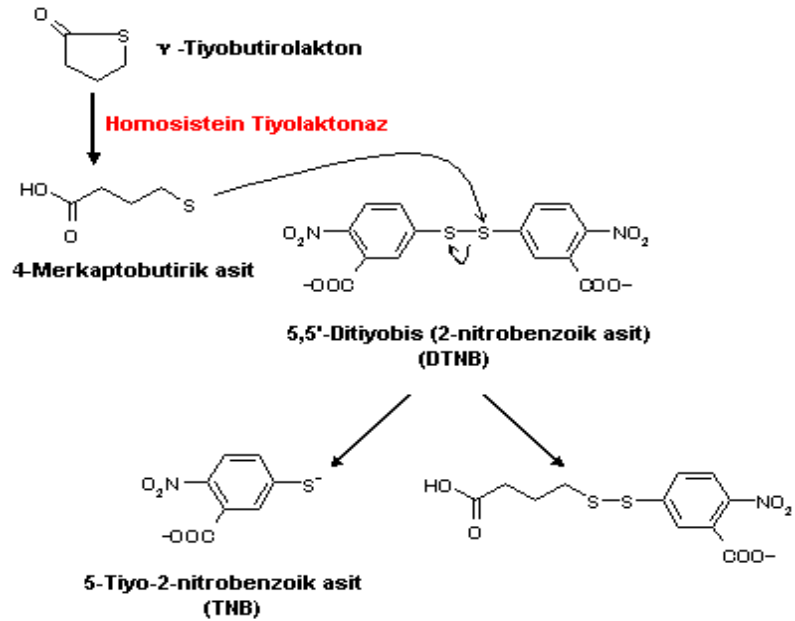
LDL :

Total kolesterol/HDL :

Hs-CRP :

3.5. Serum Homosistein Tiyolaktonaz Aktivite Tayini

Serum homosistein tiyolaktonaz enzim aktivitesi, Alfresa Pharma (Japonya) da hazırlatılan reaktifler kullanılarak ölçülmüştür. Yöntem serumda bulunan homosistein tiyolaktonaz enziminin, substrat olarak ilave edilen γ -tiyobutirolaktonun, lakton halkasını hidroliz etmesi, açığa çıkan serbest tiyol gruplarının Ellman Reajanı 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik asit) ile 5-tiyo 2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşturması, oluşan bu üründen hareketle enzimin aktivitesinin tayin edilmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7 : γ -Tiyobutirolakton'un Homosistein Tiyolaktonaz ile hidrolizi

3.5.1. Kullanılan Çözeltiler

Reaktif 1: % 0.005 Sodyum azid içeren tampon (pH7.2)

Reaktif 2: Reaktif 1A ve 1B'nin 100:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilir

Reaktif 2A: %0.005 sodyum azid

Reaktif 2B: Substrat (γ -tiyobütürolakton)

3.5.2. Serum Homosistein Tiyolaktonaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

4 µl serum, 400 µl Reaktif 1 ile karıştırıldıktan sonra 37 °C'de 5 dakika inkübe edildi. 100 µl Reaktif 2 ilave edilip reaksiyon başlatıldıktan sonra 2.5 ve 5. dakikalarda 450 nm'de absorbans ölçüldü. Serum yerine ultra saf su kullanılarak hazırlanan çözelti kör olarak kullanıldı.

3.5.3. Serum Homosistein Tiyolaktonaz Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{Hcy Tiyolaktonaz Aktivitesi (U/L)} = \frac{\Delta EA \times V \times 10^6}{7667 \times sv \times d}$$

ΔEA : Dakikada meydana gelen absorbans değişimi

10^6 : molen mikromole geçiş katsayısı

ϵ_{450} : TNB'nin 450 nm için molar ekstinksiyon katsayısı = $7667 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

V : reaksiyon karışımının toplam hacmi (µl)

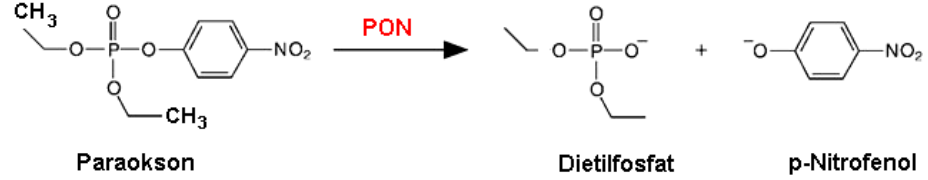
sv : serum hacmi (µl)

d: Işık yolu = 1 cm

3.6. Serum Paraoksonaz Aktivite Tayini

Serum paraoksonaz enzim aktivite ölçümleri, M.Harengi ve arkadaşları tarafından geliştirilen metoda göre yapılmıştır. Substrat olarak paraokson kullanılarak paraoksonaz enzim aktivitesine bağlı olarak oluşan hidroliz ürünü 4-nitrofenol'ün 1 dakikada oluşturduğu absorbans

artışından hareketle enzim aktivitesi hesaplanmıştır¹⁵¹. PON1 aktivitesi için bir ünite; 1 nmol 4-nitrofenol/mL serum/dak olarak tanımlandı.



Şekil 8: Paraoksonun Paraoksonaz ile hidrolizi

3.6.1. Kullanılan Çözeltiler

100 mM Trizma Tamponu: 50 mL ultra saf suda 0,7881 gr Trizma HCl ve yine 50 mL’de 0.6055 gr trizma çözülerek bu iki çözelti 1:1 oranında karıştırılıp pH’ı 8 olan 100 mL trizma tamponu hazırlandı.

2 mM CaCl₂: 29,74 mg CaCl₂ tartılarak 100mL trizma tamponuna ilave edildi.

5.5 mM paraokson: 132 µL paraokson 100 mL trizma tamponuna ilave edildi.

3.6.2. Serum Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi

2 mM CaCl₂ ve 5.5 mM paraokson içeren 1 mL 100 mM trizma tamponuna (pH: 8.0) 50 µl serum ilave edilip oluşan p-nitrofenolün meydana getirdiği absorbans artışı 412 nm’de 5 dakikalık zaman diliminde izlendi. Serum yerine ultra saf su ilave edilerek hazırlanan çözelti kör olarak kullanıldı.

3.6.3. Serum Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{PON Aktivitesi (U/mL)} = \frac{\Delta A}{\epsilon_{450}} \times \frac{10^9}{10^3} \times \frac{\text{toplam hacim}}{\text{numune hacmi}}$$

ϵ_{412} :*p*-nitrofenol'ün 412 nm'deki molar ekstinksiyon katsayısı =17000 M⁻¹ cm⁻¹

ΔA : Dakikada meydana gelen absorbans değışimi

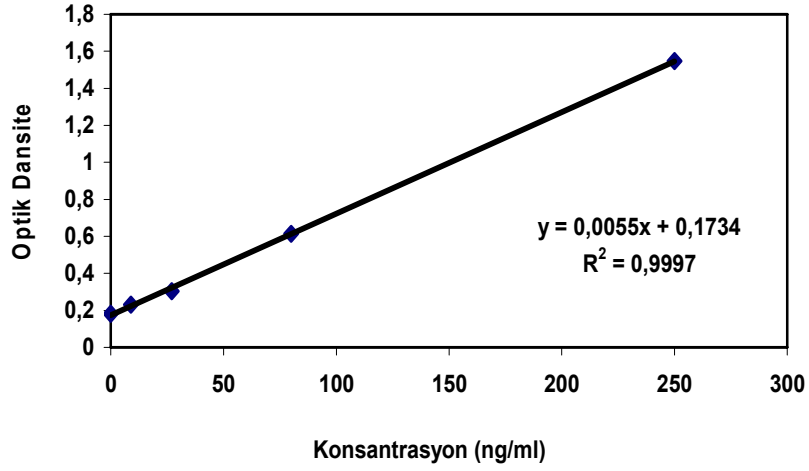
3.7. Serum Okside-LDL Tayini

Serum okside LDL düzeyleri Immundiagnostik ox-LDL ELISA kiti (Lot No: K7810-080610) kullanılarak tayin edildi. Test, insan serum ve plazmasındaki okside LDL'nin direkt ölçümüne imkan sağlamaktadır.

Okside LDL standart konsantrasyonlarına karşılık gelen optik dansite değerleri Tablo 4'te, kalibrasyon grafiğı Şekil 8'de verilmiştir. Serum okside LDL konsantrasyonları, kalibrasyon grafiğinden elde edilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

Tablo 4: Ox-LDL Standart Konsantrasyonlarına Karşılık Gelen Optik Dansite (OD) Değerleri

Standart ox-LDL Konsantrasyonu (ng/mL)	O.D.
0	0.1810
9	0.2300
27	0.3045
80	0.6135
250	1.5470



Şekil 9 : Okside-LDL Standart Grafiği

3.8. Rutin Klinik Parametrelerin Tayini

Hasta ve kontrol grubu rutin klinik parametreleri Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda otoanalizörle çalışılmıştır.

3.9. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma sonucu elde edilen veriler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. Parametrelerin değerlendirilmesinde, ortalamalar arasındaki anlamlılığın değerlendirilmesi, ikili gruplar için Mann-Whittney *U* testi, çoklu gruplar için Tukey testi ile yapılmıştır. Parametreler arasındaki korelasyon ilişkisi Spearman *Rho* Korelasyon analiziyle değerlendirilmiştir. Sonuçlar %95 güven aralığında, anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Anjiyografi sonucu; koroner arter hastalığı (KAH) olan hasta grubuna (n=36) ve KAH olmayan kontrol grubuna (n=12) ait demografik özellikler Tablo 5’te verilmiştir.

Tablo 5 : Hasta ve Kontrol Gruplarının Demografik Özellikleri

Parametreler	Hasta Grubu (n=36)	Kontrol Grubu (n=12)
Cinsiyet % (n)		
Kadın	38.9 (14)	58.3 (7)
Erkek	61.1 (22)	41.7 (5)
Sigara Kullanımı % (n)		
İçen	38.9 (14)	66.7 (4)
İçmeyen	61.1 (22)	33.3 (8)
Alkol Kullanımı % (n)		
Var	- (0)	- (0)
Yok	100 (36)	100 (12)
KAH Öyküsü		
Var	5.6 (2)	- (0)
yok	94.4 (34)	100 (12)
Aile Öyküsü % (n)		
Var	11.1 (4)	8.3 (1)
Yok	88.9 (32)	91.7 (11)
Hiperlipidemi % (n)		
Var	47.2 (17)	41.7 (5)
Yok	52.8 (19)	58.3 (7)
Diyabet % (n)		
Var	38.9 (14)	8.3 (1)
Yok	61.1 (22)	91.7 (11)

Hasta ve kontrol grubunun rutin klinik verileri Tablo 6’da verilmiştir. Çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda ox-LDL, ox-LDL/Total Kolesterol oranı ile paraoksonaz ve homosistein tiyolaktonaz enzim

aktiviteleri tayin edildi. Bu ölçülen parametrelerde, KAH şiddetini yansıtan gensini skorlamasına, yaş, cinsiyet, sigara içme durumu, hiperlipidemi ve diyabete bağlı olarak meydana gelen değişiklikler incelendi. Parametrelerin birbirleriyle ve rutin klinik verilerle olası korelasyonları değerlendirildi.

Tablo 6 : Hasta ve Kontrol Gruplarının Klinik Verileri

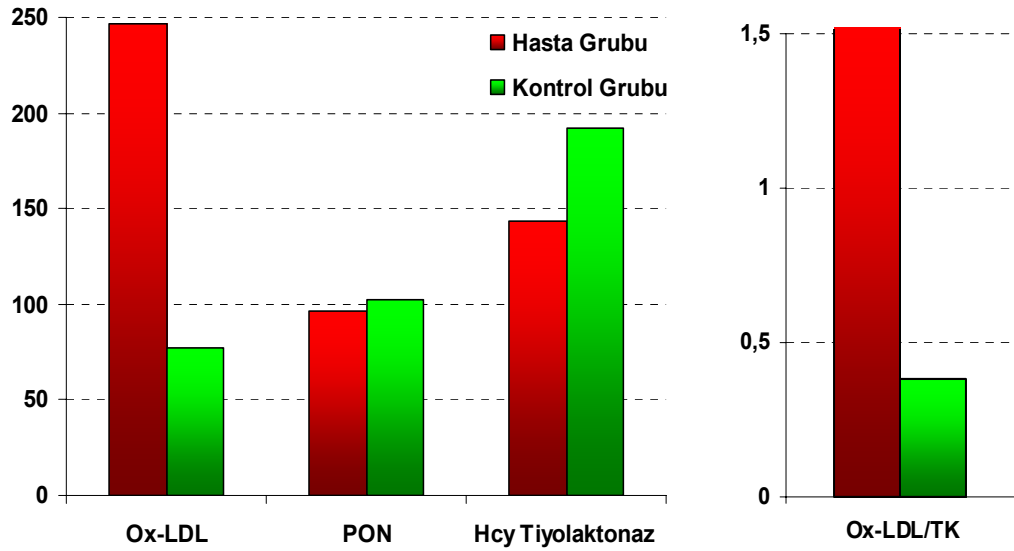
	Hasta Grubu (n=36)	Kontrol Grubu (n=12)	p
Yaş (yıl)	63.9±10.0	53.2±10.9	0.008
Vücut Kitle İndeksi (kg/m ²)	27.8±3.9	27,4±3.6	0.406
Sistolik Kan Basıncı (mmHg)	133.5±16.1	127.1±18.5	0.361
Diastolik Kan Basıncı (mmHg)	79.9±8.5	76.2±12.6	0.390
Total Kolesterol (mg/dL)	180.1±43.3	205.2±32.6	0.044
Trigliserid (mg/dL)	160.7±87.1	156.7±50.9	0.651
HDL (mg/dL)	41.4±10.6	45.3±11.8	0.063
LDL (mg/dL)	106.5±28.7	120.3±41.9	0.048
Açlık Kan Şekeri (mg/dL)	123.9±42.9	114.7±34.1	0.528
Kreatinin (mg/dL)	1,0±0,3	0.8±0,2	0.043
Ürik Asit (mg/dL)	5.7±1.8	5.1±1,0	0.314
HsCRP (mg/L)	4.5±4.3	2.2±2,2	0.051

Yapılan istatistiksel değerlendirmede, hasta grubu ox-LDL düzeyleri ve ox-LDL/Total kolesterol oranı kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunurken (sırasıyla p<0.04, p<0.01), hasta grubu hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesinin kontrollere kıyasla istatistiksel olarak

anlamli derecede düşük olduğu gözlendi ($p<0.05$). Hasta ve kontrol grubu arasında paraoksonaz enzim aktivitesi bakımından anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 7) (Şekil 10).

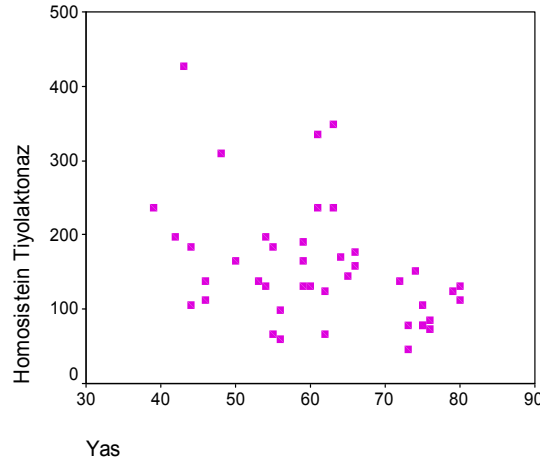
Tablo 7: Hasta ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Parametrelerin Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması.

	Hasta Grubu (n=36)	Kontrol Grubu (n=12)	
Parametreler	Ortalama $\pm$ SS.	Ortalama $\pm$ SS.	P
Ox-LDL (ng/ml)	246.8 $\pm$ 246.0	77.1 $\pm$ 57.4	0.031
PON (U/ml)	96.8 $\pm$ 59.2	102.6 $\pm$ 57.1	0.651
Hcy Tiyolaktonaz (U/L)	143.8 $\pm$ 76.2	191.8 $\pm$ 92.3	0.041
Ox-LDL/Total Kolesterol	1.52 $\pm$ 1.68	0.38 $\pm$ 0.30	0.009



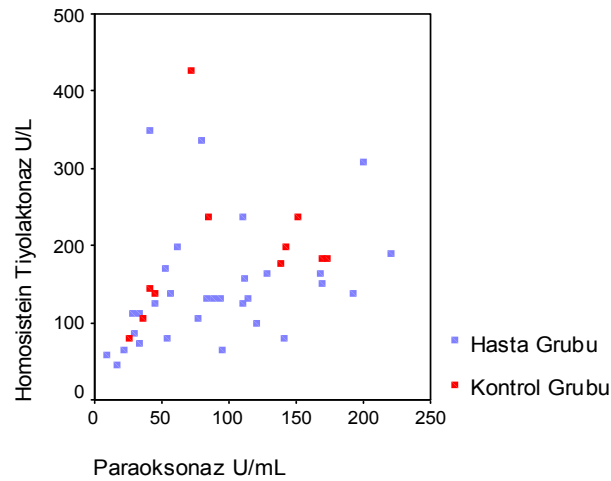
Şekil 10: Hasta ve Kontrol Grubunda Ox-LDL, Paraoksonaz, Homosistein Tiyolaktonaz ve Ox-LDL/Total Kolesterol Oranının Ortalama Düzeyleri

Genel olarak değerlendirildiğinde yaşla birlikte hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesinin azaldığı gözlemlendi ($r=-0.410$, $p<0.007$) (Şekil 11).



Şekil 11: Yaş ile Homosistein Tiyolaktonaz Arasındaki Korelasyon

Serum hcy-tiyolaktonaz aktivitesi hem hasta grubunda ($r=0.479$, $p<0.007$) hem de kontrol grubunda ($r=0.603$, $p<0.05$) serum paraoksonaz aktivitesiyle pozitif korelasyon gösterdi (Şekil 12).



Şekil 12: Hasta ve Kontrol Grubunda Serum Homosistein Tiyolaktonaz ve Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Arasındaki Korelasyon

Hasta ve kontrol grubunda ox-LDL ile PON ve hcy-tiyolaktonaz düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon gözlenmedi. Hasta grubunda hcy-tiyolaktonaz aktivitesi total kolesterol, LDL ve trigliserit düzeyleri ile anlamlı korelasyon gösterirken, kontrol grubunda benzer şekilde hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesi total kolesterol, HDL ve LDL ile anlamlı korelasyon gösterdi (Tablo 8).

Tablo 8: Hasta ve Kontrol Grubunda Parametreler Arasındaki Korelasyonlar

	HASTA GRUBU	KONTROL GRUBU
	Hcy Tiyolaktonaz	Hcy Tiyolaktonaz
PON	r=0.479 p=0.006	r=0.603 p=0.05
Total Kolesterol	r=0.511 p=0.003	r=0.749 p=0.008
HDL	-	r=0.653 p=0.029
LDL	r=0.393 p=0.029	r=0.635 p=0.036
Trigliserid	r=0.528 p=0.002	

Cinsiyete göre tayin edilen parametreler değerlendirildiğinde hem hasta hem de kontrol grubunda ox-LDL, PON ve hcy-tiyolaktonaz düzeylerinin, erkeklerle karşılaştırıldığında kadınlarda yüksek olmakla birlikte, düzeylerdeki farklılığın istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmadığı gözlemlendi. Hasta grubundaki erkeklerde ox-LDL düzeyleri kontrol grubundaki erkeklere göre anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p<0.03$), kadın hastalarla kadın kontroller arasında değerlendirilen parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmedi (Tablo 9).

Tablo 9: Hasta ve Kontrol Gruplarında Parametrelerin Ortalama Değerlerinin Cinsiyete Göre Karşılaştırılması

		Kadın	Erkek	p
		n=14	n=22	
Hasta Grubu	Ox-LDL (ng/mL)	278.9±299.4	227.8±213.9 **	0.933
	PON (U/mL)	97.0±57.5	96.7±61.6	0.962
	Hcy Tiyolaktonaz (U/L)	177.5±100.2	125.2±53.5	0.261
	Total Kolesterol (mg/dL)	197.9±42.7	168.8±40.6	0.049
	Trigliserid (mg/dL)	210.9±88.1	128.7±71.3	0.003
	HDL (mg/dL)	44.8±10.4	39.3±10.4	0.095
	LDL (mg/dL)	110.8±30.3 *	103.7±28.1	0.413
	Ox-LDL/Total Kolesterol	1.41±1.48	1.59±1.82	0.533
		n=7	n=5	
Kontrol Grubu	Ox-LDL (ng/mL)	92.8±71.1	55.2±21.2	0.639
	PON (U/mL)	115.3±50.9	84.8±66.2	0.432
	Hcy Tiyolaktonaz (U/L)	231.2±107.5	144.6±41.8	0.052
	Total Kolesterol (mg/dL)	215.7±37.3	190.6±19.3	0.268
	Trigliserid (mg/dL)	164.3±40.7	146.2±66.5	0.530
	HDL (mg/dL)	44.9±15.1	45.8±6.4	0.530
	LDL (mg/dL)	137.9±26.3	95.6±50.0	0.106
	Ox-LDL/Total Kolesterol	0.45±0.38	0.29. ±0.14	0.530

* p<0.05 kontrol grubu kadınlarla karşılaştırıldığında

** p<0.03 kontrol grubu erkeklerle karşılaştırıldığında

Yapılan istatistiksel değerlendirmede hem hasta hem de kontrol grubunda sigara kullanan ve kullanmayan bireyler arasında değerlendirilen parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmedi (Tablo 10).

Tablo 10: Hasta ve Kontrol Gruplarında Parametrelerin Ortalama Değerlerinin Sigara Kullanımına Göre Karşılaştırılması

		Sigara (+) n=14	Sigara (-) n=22	p
Hasta Grubu	Ox-LDL (ng/mL)	180.0±147.5	286.2±284.9	0.368
	PON (U/mL)	74.2±52.6	111.2±59.7	0.570
	Hcy Tiyolaktonaz (U/L)	118.9±57.3	159.5±83.6	0.527
	Total Kolesterol (mg/dL)	179.1±27.2	180.7±51.6	0.570
	Trigliserid (mg/dL)	137.0±84.3	175.7±87.3	0.570
	HDL (mg/dL)	41.8±11.8	41.2±10.1	0.214
	LDL (mg/dL)	109.9±16.6	104.3±34.5	0.214
	Ox-LDL/Total Kolesterol	1.11±1.12	1.75±1.92	0.749
		n=4	n=8	
Kontrol Grubu	Ox-LDL (ng/mL)	48.7±19.4	91.3±65.8	0.555
	PON (U/mL)	107.3±73.7	100.3±52.7	0.083
	Hcy Tiyolaktonaz (U/L)	162.7±24.8	207.5±114.0	0.220
	Total Kolesterol (mg/dL)	191.5±12.7	212.1±37.9	0.150
	Trigliserid (mg/dL)	138.7±64.7	165.7±44.8	0.689
	HDL (mg/dL)	43.9±6.2	45.9±14.1	0.936
	LDL (mg/dL)	94.8±56.4	133.0±29.1	0.413
	Ox-LDL/Total Kolesterol	0.26±0.12	0.45±0.35	0.461

Hiperlipidemi tanısı almış bireyler hiperlipidemisi olmayanlarla karşılaştırıldığında, hem hasta hem de kontrol grubunda hiperlipidemisi olanlarda ox-LDL, PON ve hcy-tiyolaktonaz düzeylerinin, hiperlipidemisi olmayanlara kıyasla, yüksek olduğu gözlenirken sadece kontrol grubunda PON düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.04$). Hiperlipidemisi olmayan hastalarda hiperlipidemisi olmayan kontrollere kıyasla ox-LDL düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.03$) (Tablo 11).

Tablo 11: Hasta ve Kontrol Gruplarında Parametrelerin Ortalama Değerlerinin Hiperlipidemi Varlığına Göre Karşılaştırılması

		Hiperlipidemi (+) n=17	Hiperlipidemi (-) n=19	p
Hasta Grubu	Ox-LDL (ng/mL)	262.9±259.3	231.5±239.3 **	0.984
	PON (U/mL)	111.4±67.6	83.8±48.7	0.257
	Hcy Tiyolaktonaz (U/L)	160.6±88.5	129.9±63.7	0.336
	Total Kolesterol (mg/dL)	185.8±46.4	175.0±40.9	0.684
	Trigliserid (mg/dL)	168.6±84.1	153.5±91.4	0.510
	HDL (mg/dL)	40.3±9.4 *	42.5±11.7	0.851
	LDL (mg/dL)	111.7±3.3	101.7±25.0	0.315
	Ox-LDL/Total Kolesterol	1.47±1.44	1.56±1.92	0.961
		n=5	n=7	
Kontrol Grubu	Ox-LDL (ng/mL)	113.6±68.3	51.1±32.2	0.106
	PON (U/mL)	144.1±35.6	72.9±51.6	0.030
	Hcy Tiyolaktonaz (U/L)	207.7±26.9	178.6±126.5	0.082
	Total Kolesterol (mg/dL)	217.8±40.4	196.3±25.3	0.432
	Trigliserid (mg/dL)	163.8±56.7	151.7±50.5	0.530
	HDL (mg/dL)	49.9±4.2	41.9±14.5	0.432
	LDL (mg/dL)	135.1±30.8	109.7±47.8	0.432
	Ox-LDL/Total Kolesterol	0.53±0.38	0.28±1.97	0.106

* p<0.02 Kontrol grubu hiperlipidemi (+) ile karşılaştırıldığında

** p<0.03 Kontrol grubu hiperlipidemi (-) ile karşılaştırıldığında

Diyabeti olan hastalarla diyabeti olmayan hastalar arasında değerlendirilen parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Kontrol grubunda diyabeti olan bir kişi bulunduğu için istatistiksel değerlendirme yapılmadı. Diyabeti olmayan hastalarda diyabeti olmayan kontrollere kıyasla ox-LDL düzeyleri anlamlı derecede yüksek bulundu (p<0.02) (Tablo 12).

Tablo 12: Hasta ve Kontrol Gruplarında Parametrelerin Ortalama Değerlerinin Diyabet Varlığına Göre Karşılaştırılması

		Diyabet (+) n=14	Diyabet (-) n=22	p
Hasta Grubu	Ox-LDL (ng/mL)	196.5±201.3	280.3±271.3 *	0.495
	PON (U/mL)	112.6±66.6	86.8±53.1	0.253
	Hcy Tiyolaktonaz (U/L)	132.1±78.8	150.2±75.9	0.338
	Total Kolesterol (mg/dL)	165.5±32.2	189.4±47.4	0.116
	Trigliserid (mg/dL)	141.7±71.8	172.7±95.1	0.281
	HDL (mg/dL)	40.6±11.7	42.0±10.1	0.689
	LDL (mg/dL)	96.5±23.9	112.8±30.2	0.170
	Ox-LDL/Total Kolesterol	1.26±1.34	1.69±1.88	0.803
		n=1	n=11	
Kontrol Grubu	Ox-LDL (ng/mL)	197.2	66.2±45.3	-
	PON (U/mL)	142.2	98.9±58.4	-
	Hcy Tiyolaktonaz (U/L)	197.2	191.3±97.3	-
	Total Kolesterol (mg/dL)	148	208.3±32.4	-
	Trigliserid (mg/dL)	172	157.5±53.4	-
	HDL (mg/dL)	48	45.1±12.3	-
	LDL (mg/dL)	94.4	122.6±43.2	-
	Ox-LDL/Total Kolesterol	1.14	0.32±0.19	-

*p< 0.02 Kontrol Grubu Diyabet (-) ile karşılaştırıldığında

Hasta grubunda koroner aterosklerozun derecesi *Gensini Skorlamasına* göre değerlendirildi. Gensini skoru "0" olanlar kontrol grubu, "1-20" olanlar hafif KAH olan hasta grubu ve gensini skoru "20"nin üzeri olanlar şiddetli KAH olan hasta grubu olarak ayrılarak yapılan değerlendirmede, sadece hafif KAH grubu ox-LDL düzeyleri ve ox-LDL/Total kolesterol oranı kontrol grubu düzeylerine kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu (sırasıyla p<0.01, p<0.02) (Tablo 13). Değerlendirilen parametrelerle gensini skoru arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir korelasyon gözlenmedi.

Tablo 13: Gensini Skorlamasına Göre Oluşturulan Kontrol Grubu, Hafif KAH ve Şiddetli KAH Gruplarının Karşılaştırılması

	Hafif KAH n=20	Şiddetli KAH n=16	Kontrol Grubu (n=12)
Ox-LDL (ng/mL)	314.7±279.8 **	166.1±174.5	77.1±57.4
PON (U/mL)	86.7±58.4	109.4±59.5	102.6±57.1
Hcy Tiyoalaktonaz (U/L)	142.9±76.7	145.2±78.7	191.8±92.3
Total kolesterol (mg/dL)	180.8±46.4	179.2±40.6	205.2±32.6
Trigliserid (mg/dL)	169.9±99.7	149.1±69.7	156.7±50.9
HDL (mg/dL)	40.0±7.5	43.2±13.6	45.3±11.8
LDL (mg/dL)	106.8±30.2	106.0±27.8	120.3±41.9
Ox-LDL/Total Kolesterol	1.94±1.96 *	1.01±1.13	0.39±0.30

* p<0.02 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

** p<0.01 Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde koroner arter hastalıkları dünya genelinde en önemli mortalite nedenlerinden biri olup kronik, dejeneratif, ilerleyici ve multifaktöriyel bir hastalık süreci olan ateroskleroz ile karakterizedir. Ateroskleroz yaşlanma, dislipidemi, inflamasyon, metabolik ve genetik birçok risk faktörüyle ilişkili olup, bu faktörlerin birbiriyle etkileşimi hastalığın gelişimini ilerletmektedir. Risk faktörlerinin ateroskleroz gelişimiyle gösterdiği korelasyonu açıklamaya yönelik ileri sürülen hipotezlerin ortak yönü; LDL ve inflamasyonun merkezi rol oynadığı yönündedir. Yaygın olarak araştırılan oksidatif modifikasyon hipotezi ile ilgili çalışmalar ox-LDL ve diğer okside olmuş lipidler ile bunların oksidasyon ürünlerinin çeşitli proinflamatuvar, proimmün reaksiyonlar ve sitotoksik mekanizmalarla ateroskleroz gelişimini indüklediğini göstermiştir¹⁵²⁻³.

HDL, ters kolesterol tranportu sağlayıp kolesterolü ekstrahepatik dokulardan uzaklaştırmasının yanı sıra LDL'nin oksidasyonunun ilerlemesini ve aterosklerotik sürecin gelişimini inhibe eden koruyucu özelliklere sahip bir lipoproteindir⁷³. Yapısında yer alan Apo AI, platelet aktive edici faktör asetil hidrolaz ve paraoksonaz gibi moleküller HDL'nin antioksidan özelliklerinden sorumlu moleküller olarak öne çıkmaktadır^{101,102}.

Paraoksonaz, HDL üzerinde lokalize bir enzim olup okside lipidleri hidroliz ederek reaktif aldehit ürünlerinin ve lipid peroksitlerinin LDL'de birikimini önlemenin yanı sıra HDL'de lipid hidroperoksit oluşumunu inhibe ederek HDL bütünlüğünün ve fonksiyonunun devamlılığını sağlamaktadır^{13,154}.

HDL ile ilişkili ve hcy-tiyolaktonu homosisteine hidroliz edebilen hcy-tiyolaktonazın varlığı, Jakubowski ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. HDL'nin protein bileşeni olan bu enzimin aktivitesi ve stabilitesi için Ca^{+2} 'un gerekli olması, doğal substratının Hcy-tiyolakton olmakla birlikte enzimin fenil asetat, p-nitrofenil asetat ve organofosfat bileşiği olan paraoksanı da hidroliz etmesi hcy-tiyolaktonaz enzimi ile paraoksonaz enziminin aynı enzim olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda, hcy-tiyolaktonaz ve paraoksonaz enzimlerinin, türler arasındaki dağılımının aynı olması, her iki enzimin memeli serumunda bulunması, aynı kromatografik özelliklerde saflaştırılması, fenil asetat, p-nitrofenil asetat ve paraokson için ölçülen kinetik sabitlerinin aynı olması ve kalsiyum bağımlı olup HDL'nin 45-kDa'luk protein komponenti olarak belirlenmesi, paraoksonaz (PON1) proteininin hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesi gösterdiği ve hcy-tiyolaktonu detoksifiye ettiğini göstermiştir^{132,137}.

Yapılan çalışmalar koroner arter hastalığı olan kişilerde serum ox-LDL düzeylerinin yüksek olduğunu göstermektedir¹⁵⁵⁻⁷.

Stabil ve anstabil anjinalı hasta ve sağlıklı kontrollerde ox-LDL düzeylerinin ölçüldüğü ve koroner arter hastalığı şiddetiyle korelasyonlarının incelendiği çalışmada ox-LDL düzeyleri anstabil anjinalı hastalarda, stabil anjinalı hasta ve kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Aynı çalışmada anjiyografik kompleks lezyonları olan hastalarda daha yüksek ox-LDL düzeyleri gözlenmiştir¹⁵⁵.

Benzer şekilde Faviou ve arkadaşları tarafından yapılan, plazma ox-LDL düzeylerinin homosistein ve lipid parametreleriyle korelasyonunun incelendiği, 41 anstabil anjinalı, 62 stabil anjinalı ve 170 kontrol grubu olmak üzere 273 kişi üzerinde yapılan çalışmada; stabil anjinalı hastalarla karşılaştırıldığında anstabil anjinalı hastaların ox-LDL

düzeylelerinin belirgin derecede yüksek olduğu, hem stabil hem de unstabil anjinalı hastalarda ox-LDL düzeylelerinin kontrollere kıyasla yüksek olduğu bildirilmiştir¹⁵⁶.

Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak koroner arter hastalığı olan hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek ox-LDL düzeyleleri gözlenmiştir.

LDL'nin birikimi, agregasyonu ve oksidatif modifikasyonu arteryal inflamasyonun aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Ayrıca endotel hücreleri, düz kas hücreleri ve makrofajlardan salınan serbest radikaller LDL modifikasyonundaki oksidatif mekanizmalara katılmaktadır. Plazma ox-LDL düzeyleleri hastalığın farklı evrelerinde değişebilmektedir. Çalışmalar ox-LDL düzeylelerinin özellikle myokard infarktüsü ve perkütan translüminal koroner anjiyografi gibi akut koroner olaylarda plak rüptürüne bağılı olarak arttığını göstermektedir. Akut koroner sendromlu (MI ve anstabil anjina gibi) hastalarda stabil anjinalı hastalardan daha yüksek ox-LDL düzeylelerinin gözlenmesi, plazma ox-LDL düzeylelerinin koroner stenozun şiddetiyle korele olduğunu destekler niteliktedir. Huang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada MI'lı hastalarda ox-LDL düzeylelerinin kontrollerden 6 kat yüksek olduğu gözlendi¹⁵⁷.

Ox-LDL düzeyleleri koroner arter hastalığının bir göstergesi olarak değerlendirilmesi yönünde Fredrikson ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ox-LDL/total kolesterol oranı risk faktörü olarak formüle edilse de ox-LDL plazma düzeylelerindeki varyasyonların büyük olmasının bunu zorlaştırdığı bildirilmiştir. Huang ve arkadaşları tarafından 2008 yılında yapılan çalışmada akut miyokard infarktüsü, stabil anjinalı, anstabil anjinalı, normal kontrol ve dislipidemili kontrol grupları üzerinde ox-LDL, ox-LDL/total kolesterol, ox-LDL/HDL, ox-LDL/LDL oranları belirlenmiş, bu parametrelerin koroner arter hastalığı olan kişileri sağlıklı kişilerden

ayırmada total kolesterol, trigliserid, HDL-C, LDL-C'den daha iyi belirteç olduğunu, ox-LDL/ total kolesterol oranı yüksek olan hastaların daha yüksek koroner arter hastalığı riski taşıdığını bildirmişlerdir^{157,158}.

Çalışmamızda koroner aterosklerozun derecesi gensini skorlamasına göre değerlendirilmiş, sadece gensini skoru 1-20 arası olan hafif KAH'lı hastalarda ox-LDL düzeyleri ve ox-LDL/total kolesterol oranı kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Gensini skoru ile ölçtüğümüz parametreler arasında anlamlı korelasyon gözlenmemiştir.

Oksidatif stres koroner arter hastalığı, diyabet gibi hastalıklarda yaygın patolojik yolaktır. Sigara ve hiperlipidemi gibi faktörler oksidatif stresi indükleyerek ve inflamatuvar hücrelerde serbest radikal oluşumunu arttırarak LDL'nin oksidasyonunu hızlandırmaktadır. Toshima ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ox-LDL düzeyleri ile sigara kullanımı, diyabet ve hipertansiyon, cinsiyet gibi diğer KAH risk faktörleri arasında anlamlı ilişki gözlenmemiş, KAH bulgusu olmayan diyabetik hastalarda ise yüksek ox-LDL düzeyleri gözlenmiştir¹⁵⁹. Bununla birlikte ox-LDL düzeylerinin diyabetik KAH'lı hastalarda diyabetik olmayan KAH'lı hastalara göre anlamlı derecede yüksek olduğu da bildirilmiştir^{159,160}.

Çalışmamızda sigara kullanımına, diyabete ve cinsiyete bağlı olarak ox-LDL düzeylerinde anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir. Elde ettiğimiz bulgular, daha büyük hasta grubunda farklılık gösterebileceği gibi, yüksek ox-LDL düzeylerinin koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olabileceği yönündeki görüşleri destekler niteliktedir.

Koroner arter hastalığında paraoksonaz enzim aktivitesini belirlemeye yönelik yapılan çalışmaların çoğunluğu, KAH'da paraoksonaz enzim aktivitesinin sağlıklı kontrollere kıyasla düşük olduğunu göstermekle birlikte¹⁶¹⁻³, PON aktivitesinde anlamlı farklılıkların gözlenmediği çalışmalar

da bulunmaktadır¹⁶⁴. Myokard infarktüsü, anstabil anjinal ve diyabetik koroner arter hastalığı olan hastalarda yapılan çalışmalarda serum PON aktivitesinin sağlıklı kontrollere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi^{161-3,157}. Mackness ve arkadaşları tarafından KAH'lı hastalarda ve Ayub ve arkadaşları tarafından MI'lı hastalarda yapılan çalışmada PON aktivite ve konsantrasyonunun kontrollere kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlendi^{165,166}.

Mackness ve arkadaşları tarafından koroner arter hastalığı olan 49-65 yaş arasındaki 1353 erkek üzerinde yapılan prospektif çalışmada paraoksonaz aktivitesi ölçülmüş, yeni koroner arter hastalığı geçirmiş erkeklerde geçirmeyenlere kıyasla PON1 aktivitesinin %20 daha düşük düzeyde olduğu gözlemlenmiştir. Yüksek PON aktivitesine sahip olan bireylerin yeni bir koroner arter hastalığı geçirme olasılığının, düşük PON aktivitesine sahip olan kişilere oranla %50 daha düşük olduğu saptanmıştır¹⁶⁷.

Çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında PON enzim aktivitesi bakımından anlamlı bir fark bulunmamış, cinsiyet, sigara kullanımı ve diyabetin varlığına göre PON aktivitesinde anlamlı değişiklikler izlenmemiştir. Serum PON enzimi genetik polimorfizm göstermekte, L55M polimorfizmi PON1 enzim konsantrasyonunu etkilerken, Q192R polimorfizmi enzimin katalitik aktivitesini etkilemektedir. Hem genetik hem de etnik farklılıkların enzim aktivitesinde etkili olması nedeniyle çalışma grubunda yer alan bireylerin genetik farklılıklarının, elde ettiğimiz sonuçlar üzerinde etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Hiperlipidemik kontrol grubunda hiperlipidemik olmayan kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek PON aktivitesinin gözlenmesinin hiperlipidemik bireylerdeki muhtemel statin kullanımına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Bu bulgumuz, simvastatin kullanan hiperlipidemik

hastalarda yüksek PON aktivitesinin gözleendiği çalışmayla da uyumludur¹⁶⁸.

Hcy-tiyolakton protein homosisteinilasyonuna neden olduğundan, hcy-tiyolaktonaz LDL ve HDL'yi protein homosisteinilasyonuna karşı korumaktadır. Biyolojik sıvılarda hcy-tiyolakton ölçümüne imkan sağlamak amacıyla geliştirilen metodların radyoaktif iyot ve komplike analitik yöntemleri gerektirmesi, klinik çalışmalarda hcy-tiyolakton düzeylerinin ölçümünü sınırlandırmış, 2000 yılında Jakubowski tarafından hcy- tiyolaktonaz enziminin ve bu enzimin PON1 enzimine eşdeğer enzim olduğunun belirlenmesiyle hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesinin tayiniyle ilgili metodların geliştirilmesi hız kazanmıştır¹³².

Jakubowski ve arkadaşları hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesi ile PON1 genotipi ve koroner arter hastalığı riski arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu, yüksek serum hcy- tiyolaktonaz aktivitesinin düşük serum hcy-tiyolaktonaz aktivitesine göre serum protein homosisteinilasyonuna karşı daha iyi koruma sağladığını göstermişlerdir¹³⁷.

Koubao ve arkadaşlarının 91 KAH'lı ve 118 sağlıklı kontrol grubunda yaptığı çalışmada hcy-tiyolaktonaz aktivitesinin KAH'lı hastalarda %42 oranında azaldığı, enzim aktivitesi ile trigliserid ve total homosistein düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğu gözleendi¹⁶⁹.

Lakshman ve arkadaşlarının yaptığı Tip-2 diyabetli şiddetli kardiyovasküler hastalığı olan bireylerde PON ve hcy-tiyolaktonaz korelasyonlarının incelendiği çalışmada; kardiyovasküler hastalığı olan ve olmayan diyabetli hastalarda ateroskerozun artmasıyla PON aktivitesinde düşüş gözleendiği, serum hcy-tiyolaktonaz aktivitesinin diyabetli hastalarda

kardiyovasküler hastalık şiddetiyle negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir¹⁶³.

273 KAH'lı ve 202 sağlıklı kontrol grubunda yapılan çalışmada hcy-tiyolaktonaz aktivitesi KAH'lı hastalarda kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu. Yüksek hcy-tiyolaktonaz aktivitesinin PON1-192-R ve PON1-55-L alleleriyle, düşük enzim aktivitesinin ise PON1-192-Q ve PON1-55-M alleleriyle ilişkili olduğu gözlemlendi. Bu çalışmada cinsiyetin enzim aktivitesi üzerinde etkili olmadığı, KAH'lı hastalarda total kolesterol, LDL-kolesterol, Apo A1, Apo B100 ve HDL-kolesterol ile hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesi arasında anlamlı pozitif korelasyonların gözlemlendiği bildirildi. Kolesterol ve hcy-tiyolaktonaz arasındaki pozitif ilişki, kolesterolün enzim aktivitesini transkripsiyonel ve posttranskripsiyonel düzeyde regüle edebileceği şeklinde açıklandı¹⁷⁰.

PON düzeylerinde anlamlı düzeyde farklılık gözlenmezken, çalışmamızda literatürle uyumlu olarak hcy-tiyolaktonaz aktivitesi KAH'lı hastalarda kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu, hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesi hasta grubunda PON, total kolesterol, LDL ve trigliserid düzeyleri arasında, kontrol grubunda ise PON, total kolesterol, HDL ve LDL arasında anlamlı korelasyon gözlemlendi. Hcy- tiyolakton ve paraokson PON1 proteini farklı bölgelerinde hidroliz edilen bileşiklerdir. PON1 proteininin, homosisteinilasyon, glikasyon ve lipid peroksidasyon ürünleriyle modifikasyonu gibi posttranslasyonel değişiklikler enzim aktivitelerini farklı etkileyebildiğinden, çalışmamızda KAH grubunda gözlenen PON ve hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitelerindeki farklılıkları açıklayıcı niteliktedir.

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz veriler; aterosklerotik süreçte ox-LDL'nin düzeylerinin arttığını, ateroskleroza önlemede koruyucu rol oynayan hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesinin azaldığını göstermektedir. Çalışmamızın Ox-LDL, hcy-tiyolaktonaz enzimi ve lipid düzeyleri arasında gözlenen ilişkiyi aydınlatmaya yönelik çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

6. ÖZET

Ateroskleoz ve aterosklerozla ilişkili miyokardiyal infarktüs, felç ve periferik vasküler hastalıklar gibi komplikasyonlar ölüme sebep olabilen patolojik durumlardır. Günümüzde ateroskleroz gelişiminde rol oynayan birçok faktör tanımlanmış ve hastalığın gelişimini önleyici veya tedavisinde yardımcı olabilecek çeşitli moleküller üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Ox-LDL ateroskleroz patojenezi ve ilerlemesinde temel rolü olan bir moleküldür. Bunun yanısıra artmış plazma homosistein düzeyleri de ox-LDL gibi ateroskleroz gelişiminde rol oynayan bir risk faktörüdür. HDL ile ilişkili PON1 enzimi LDL'leri oksidatif modifikasyona karşı koruyarak, hcy-tiyolaktonaz ise homosisteinin toksik etkilerini azaltarak aterosklerozda koruyucu rol oynamaktadır.

Bu çalışmada anjina pectoris öntanısı ile koroner anjiyografi yapılmasına karar verilmiş 36 hasta ve kontrol grubunu oluşturan koroner anjiyografisi yapılmış 12 bireyde ox-LDL, PON ve hcy-tiyolaktonaz enzim aktiviteleri ölçülerek değerlendirildi. Koroner aterosklerozun (KAH) şiddeti “*Gensini Skoruması*” ile tayin edildi. Koroner aterosklerozun derecesi, cinsiyet, hiperlipidemi, diyabet ve sigara kullanımına bağlı olarak ölçülen parametreler değerlendirildi.

Çalışmamızda ox-LDL düzeyleri hasta grubunda kontrollere kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunurken ($p<0.031$), hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesi anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.041$). serum paraoksonaz aktivitesi bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi. Yaşla birlikte hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesinin azaldığı gözlemlendi ($r=-0.410$, $p<0.007$). Serum hcy-tiyolaktonaz aktivitesi hem hasta hem de kontrol grubunda ($r=0.603$, $p<0.05$) serum paraoksonaz aktivitesiyle pozitif korelasyon gösterdi. Koroner aterosklerozun derecesine, cinsiyet, diyabet ve sigara kullanımına bağlı

olarak ölçülen parametreler yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gözlenmedi. Kontrol grubunda hiperlipidemik hastalar ve hiperlipidemik olmayan hastalar arasında paraoksonaz enzim aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlemlendi ($p<0.03$).

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz veriler; aterosklerotik süreçte ox-LDL'nin düzeylerinin arttığını, ateroskleroza önlemede koruyucu rol oynayan hcy-tiyolaktonaz enzim aktivitesinin azaldığını göstermektedir. Çalışmamızın Ox-LDL, hcy-tiyolaktonaz enzimi ve lipid düzeyleri arasında gözlenen ilişkiyi aydınlatmaya yönelik çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

7.SUMMARY

Atherosclerosis and related myocardial infarction, brain strokes and peripheral vascular diseases are life threatening complications. Today many factors that contribute to atherosclerosis are identified. And researches are still in progress on the molecules to prevent and treat atherosclerosis. Ox-LDL is the fundamental molecule about the progress and pathogenesis of atherosclerosis. And also increase of plasma homocysteine level is a contributing risk factor for atherosclerosis. HDL related PON1 enzyme have a protective role that protects LDL particles against oxidative modification and also homocysteine thiolactonase have protective role in atherosclerosis that reduces toxic effects of homocysteine.

In this study, 36 patients who were scheduled for angiography with angina pectoris diagnosis and 12 patients that had undergone coronary angiography were included. In these patients ox-LDL, PON and Hcy-thiolactonase enzyme activities were measured. Coronary atherosclerosis was evaluated with "*Gensini Scoring System*". The severity of coronary atherosclerosis was evaluated with the parameters that depend on sexuality, hyperlipidemia, diabetes and smoking.

In our study, ox-LDL levels of patient group were higher than those of the control group ($p < 0.031$) and homocysteine thiolactonase enzyme activity was significantly lower in patient group than the control group ($p < 0.041$). There was no statistically significant difference between these two groups in terms of serum paraoxonase activity. There was negative correlation between homocysteine thiolactonase activity and age ($r = -0.410$, $p < 0.007$). There was a positive correlation between serum homocysteine thiolactonase activity and serum paraoxonase activity in both groups ($r = 0.603$, $p < 0.05$). There was no statistically significant

difference between groups in terms of measured parameters depending on severity of coronary atherosclerosis, gender, diabetes mellitus and cigarette smoking. There was significant statistically difference in paraoxonase enzyme activity between hyperlipidemic and non-hyperlipidemic patients in control group ($p<0.03$).

According to our findings in this study, we can say that ox-LDL levels increase in the atherosclerotic process and hcy-thiolactonase enzyme activity decreases which acts as a protector against atherosclerosis. We think that this study will be helpful to other studies that examine the relation between ox-LDL, hcy-thiolactonase and lipid levels.

8. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. The World Health Statistics Reports. Available at: <http://www.who.int/whosis/whostat/2009/en/index.html>
2. Keys A, Aravanis C, Blackburn, H, Buzina R, Djordjevic BS, Dontas AS, Fidanza F, Karvonen, MJ, Kimura N, Menotti A, Mohacek I, Nedeljkovic S, Puddu V, Punsar S, Taylor HL, Van Buchem FSP, Seven Countries. A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease 1980. Harvard University Press, Cambridge, MA and London. 1-381.
3. U. Keil. Coronary artery disease: the role of lipids, hypertension and smoking. Basic Res Cardiol 2000; 95(1): 52-58.
4. Itabe H. Oxidized low density lipoproteins: What is understood and what remains to be clarified. Biol Pharm Bull 2003; 26(1): 1-9
5. Rich- Edwards JW, Manson JE, Hennekens CH, Buring JE. The primary prevention of coronary heart disease in women. N Engl J Med 1995; 332: 1758-66
6. Parthasarathy S, Litvinov D, Selvarajan K, Garelnabi M. Lipid peroxidation and decomposition-Conflicting roles in plaque vulnerability and stability. Biochim Biophys Acta 2008; 1781: 221-231
7. Rosin BL. The progression of cardiovascular risk to cardiovascular disease. Cardiovasc Med 2007; 8: 3-8
8. Le NA, Walter MF. The role of hypertriglyceridemia in atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep 2007 ; 9: 110-115
9. Cromwell WC, Otvos JD. Low-density lipoprotein particle number and risk for cardiovascular disease. Curr Atheroscler Rep 2004; 6: 381-387
10. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves

lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1984; 81: 3883-3887

11. Norata GD, Pirillo A, Catapano AL. Modified HDL: Biological and physiopathological consequences. *Nutrition, Metabolism & Cardiovasc. Diseases* 2006; 16: 371-386
12. Francis GA. High density lipoprotein oxidation: in vitro susceptibility and potential in vivo consequences. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1483: 217-235
13. Watson A, Berliner J, Hama S et al. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96: 2882-2891
14. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases 1,2 and 3, oxidative stress, and macrophage foam cell formation during atherosclerosis development. *Free Radic Biol & Med* 2004; 37(9): 1304-1316
15. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmac* 1998; 31: 329-336
16. Mc Cully KS. Vascular pathology of hyperhomocysteinemia: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128
17. Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 470-487
18. Jakubowski H, Zhang L, Bardeguet A, Aviv A. Homocysteine thiolactone and protein homocysteinylation in human endothelial cells: Implications for atherosclerosis. *Circ Res* 2000; 87: 45-51
19. Jakubowski H, Ambrosius WT, Pratt JH. Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett* 2001; 491: 35-39
20. Munro JM, Cotran RS. *Biology of Disease. The pathogenesis of atherosclerosis: Atherogenesis and Inflammation.* *Lab Invest* 1988; 58(3): 249

21. Davies MJ, Woolf N. Atherosclerosis: what is it and why does it occur?. Br Heart J 1993; 69: 3-11
22. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull WJr, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. Circulation 1992; 85: 391-405
23. Schachter M. The pathogenesis of atherosclerosis. Int J Cardiol 1997; 62(suppl 2): 3-7
24. Hadi HA, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy and outcome. Vasc Health Risk Man 2005; 1: 183-98
25. Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: Novel tools give (free) radical insight. J Mol Cell Cardiol 2009 (baskıda: 10.1016/j.yjmcc.2009.05.013):1-10
26. Libby P, Hansson GK. Biology of disease. Involvement of the immune system in human atherogenesis: current knowledge and unanswered questions. Lab Invest 1991; 64: 5-15
27. Victor WM, van Hinsbergh. The endothelium: vascular control of haemostasis. Eur J Obstet Gyn R B. 2001; 95: 198-201
28. The Framingham Heart Study, <http://www.framingham.com/heart>.
29. Maas R, Böger RH. Old and new cardiovascular risk factors: from unresolved issues to new opportunities. Athero Suppl 2003; 4: 5-17.
30. Vitale C, Mendelsohn ME, Rosano GM. Gender differences in the cardiovascular effect of sex hormones. Nat Rev Cardiol 2009 (baskıda)
31. Ordoñez JM. Gender, a significant factor in the cross talk between genes, environment and health. Gender Medicine 2007; 4(B): 111-122
32. Heitzer T, Meitner T. Prevention of coronary heart disease: smoking. Z Cardiol 2005; 94(3): 30-42

33. Hulea SA, Olinescu R, Nita S, Crocnan D, Kummerow FA. Cigarette smoking causes biochemical changes in blood that are suggestive of oxidative stres: a case control study. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1995; 14: 173-80
34. Barnoya J, Glantz SA. Cardiovascular effects of secondhand smoke: nearly as large as smoking. *Circulation* 2005; 111: 2684-98
35. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the1990s *Nature* 1993; 362: 801-809
36. Eberly LE, Stamler J, Neaton JD, for the Multiple Risk factor Intervention Trial Research Group. Relation of triglyceride levels, fasting and nonfasting, to fatal and nonfatal coronary heart disease. *Arc Intern Med* 2003;163: 1077-83
37. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized trial of cholesterol lowering 4444 patients with coronary disease. Scandinavian Simvastatin Survival Study. *Lancet* 1987; 344: 1383-89
38. Krauss RM. Relation of intermediate and low-density lipoprotein subspecies to risk of coronary artery disease. *Am Heart J* 1987; 113: 578-82
39. Scanu AM, Fless GM. Lipoprotein (a): Heterogeneity and biological relevance. *J Clin Invest* 1990; 85: 1709-15
40. Wu LL. Review of risk factors for cardiovascular diseases. *Ann Clin Lab Sci* 1999; 29(2): 127-132
41. Frishman WH. Biologic markers as predictors of cardiovascular disease. *Am J Med.* 1998; 104(6A): 18-27
42. McCully KS. Hyperhomocysteinemia and atherosclerosis: historical perspective. *Clin Chem Lab Med.* 2005; 43: 980-86
43. Link JJ, Rohatgi A, and JA de Lemos. HDL kolesterol: Physiology, pathophysiology and management. *Curr Probl Cardiol* 2007; 32: 268-314

44. Brown WV, MD. High-density lipoprotein and transport of cholesterol and triglyceride in blood. *J Clin Lipidol* 2007; 1: 7-19
45. Olofsson SO, Wiklund O, Boren J. Apolipoproteins AI and B: biosynthesis, role in the development of atherosclerosis and targets for intervention against cardiovascular disease. *Vasc Health and Risk Management* 2007; 3(4): 491-502
46. Fujioka Y, Ishikawa Y. Remnant lipoproteins as strong key particles to atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 2009; 16: 145-154
47. Cooper AD. Hepatic uptake of chylomicron remnants. *J Lipid Res* 1997; 38: 2173-92
48. Mahley RW, Huang Y. Atherogenic remnant lipoproteins role for proteoglycans in trapping, transferring and internalizing. *J Clin Invest* 2007; 117: 94-98
49. Taskinen MR. Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice *Diabetologia* 2003; 46: 733-49
50. Gotto AM, Pownall HJ, Havel RJ. Introduction to the plasma lipoproteins. *Methods Enzymol* 1986; 128: 3-41
51. Ramos P, Giesege SP, Schuster B, Esterbauer H. Effect of temperature and phase transition on oxidation resistance of low density lipoprotein. *J Lipid Res* 1995; 36: 2113-2128
52. Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 2001; 15: 2073-2084
53. Brewer HB, Gregg RE, Hoeg JM, Fojo SS: Apoproteins and lipoproteins in Human Plasma: an overview. *Clin Chem* 1988; 34(8): B4-B8
54. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47
55. Sakai M, Scicchiri M, Hakamate H, Horiuchi S. Endocytosed lysophosphatidylcholine, through the scavenger receptor, plays an essential role in oxidized low-density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *Trends Cardiovas Med* 1998; 8(3): 119-124

56. Brown M, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 223-61
57. Steinbrecher UP, Witztum JL, Parthasarathy S, Steinberg D. Decrease in reactive amino groups during oxidation or endothelial cell modification of LDL. Correlation with changes in receptor-mediated catabolism. *Arteriosclerosis* 1987; 7: 135-143
58. Henriksen T, Mahoney E, Steinberg D. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: recognition by receptors for acetylated low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78(10): 6499-6503.
59. Leake DS, Rankin SM. The oxidative modifications of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem J*. 1990; 270: 741
60. Hazell LJ, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem* 1993; 290(1): 165-172
61. Hincckle JW. Mechanisms of oxidative damage of low- density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997; 8: 268-274
62. Harats D, Shaish A, George J, Mulkins M, Kurihara H, Levkovitz H, Sigal E. Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2100-2105
63. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1716-1723
64. Vohra RS et al. Atherosclerosis and the lectin-like oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor. *Trends Cardiovasc Med* 2006; 16(2): 60-64

65. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B et al. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 1990; 85: 1260-1266
66. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 5134-8
67. Terkeltaub R, Banka CL, Solan J, Santoro D, Brand K, Curtiss LK. Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity. *Arterioscler Thromb* 1994; 14: 47-53
68. Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative mechanisms and atherothrombotic cardiovascular disease. *Drug Discov Today: Therapeutic Strategies* 2008; 5(1): 5-13
69. Van Berkel TJC, De Rijke YB, Kruijt JK. Different fate in vivo of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein in rats. Recognition by various scavenger receptors on Kupffer and endothelial liver cells *J Biol Chem* 1991; 266: 2282-2289
70. Steinbrecher UP. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1436: 279-298
71. Libby P. Managing the risk of atherosclerosis: The role of high-density lipoprotein. *Am J Cardiol* 2001; 88 (suppl): 3N-8N
72. Ansell BJ, Watson KE, Fogelman AM, Navab M, Fonarow GC. High-density lipoprotein function. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(10): 1792-1798
73. von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G. High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 13-27

74. Stampfer MJ, Sacks MD, Salvini S, Willett SC, Hennekens CH. A prospective study of cholesterol, apolipoproteins and the risk of myocardial infarction. *New Engl J Med* 1991; 325: 373-381
75. Rubins HB, Robins SJ, Iwane MK, Boden WE, Elam MB, Fye CL, Gordon DJ, Schaefer EJ, Schectman G, Wittes JT. Rationale and design of the department of veterans affairs high density lipoprotein intervention trial (HIT) for secondary prevention of coronary arter disease in men with low high density lipoprotein cholesterol and desirable low density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol* 1993; 71: 45-52
76. Ansell BJ. Targeting the anti- inflammatory effects of high density lipoprotein. *Am J Cardiol* 2007; 100(suppl): 3N-9N
77. Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre BN, La Du BN, Fogelman AM, Berliner JA. Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 95: 774-782
78. McCall MR, LaBella M, Forte TM, Krauss RM, Takanami Y, Tribble DL. Dissociable and nondissociable forms of platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma LDL: implications for LDL oxidative susceptibility. *Biochem Biophys Acta* 1999; 1437: 23-36
79. Parthasarathy S, Bamett J, Fong LG. High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1044: 275-283
80. Tall AR. Plasma high density lipoproteins: metabolism and relationship to atherogenesis. *J Clin Invest* 1990; 86: 379-384
81. Ng CJ, Shih DM, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radic Biol& Med* 2005 38(2): 153-163

82. Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev CL Lab Sci* 2009; 46(2): 83-106
83. Primo-Parma SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON 1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33: 498-507
84. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2001; 276: 44444-44449
85. Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordan-Starck TC, Harmony JA. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 1994; 33: 832-839
86. Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, Shih DM, Lusis AJ, Navab M, Fogelman AM. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 542-547
87. Billecke S, Dragonov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 2000; 28: 1335-1342
88. Costa LG, Cole TB, Vitalone A, Furlong CE. Measurement of paraoxonase (PON1) status as a potential biomarker of susceptibility to organophosphate toxicity. *Clin Chim Acta* 2005; 352: 37-47
89. Draganov DI, Teiber JF, Speelman A, Osawa Y, Sunahara R, La Du BN. Human paraoxonases (PON1, PON2 and PON3) are lactonases with overlapping and distinct substrate specificities. *J Lipid Res* 2005; 46: 1239-1247

90. Leviev I, James RW. Promoter polymorphisms of human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 516-521
91. James RW, Leviev I, Ruiz J, Passa P, Froguel P, Garin MC. Promoter polymorphism T(-107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2000; 49: 1390-1393
92. Brophy VH, Hastings MD, Clendenning JB, Richter RJ, Clendenning JB, Jarvik GP, Furlong CE. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenet* 2001; 11: 77-84
93. Brophy VH, Jampsa RL, Clendenning JB, McKinstry LA, Jarvik GP, Furlong CE. Effects of 5 regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 1428-1436
94. James RW, Leviev I, Righetti A. Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in patients with coronary arter disease. *Circulation* 2001; 101: 2252-2257
95. Senti M, Tomas R, Anglada R, Elosua J, Marrugat MI, Covas, Fito M. Interrelationship of smoking, paraoxonase activity and leisure time physical activity: a population based study. *Eur J Intern Med* 2003; 14: 178-184
96. Jarvik GP, Tsai NT, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Hatsukami TS, Furlong CE. Vitamin C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1329-1333
97. Van der Gaag MS, A van Tol, Scheek LM, James RW, Urgert R, Schaafsma G, Hendriks HF. Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity: a diet-controlled, randomised intervention study in middle- aged men. *Atherosclerosis* 1999; 147: 405-410

98. Mackness MI, Arrol S, Abbott CA, Durrington PN. Is paraoxonase related to atherosclerosis. *Chem Biol Interact* 1993; 87: 161-171
99. Paragh Gy, Seres I, Balogh Z, Varga Zs, Karpati I, Matyus J, Ujhelyi L, Kakuk Gy. The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. *Nephron* 1998; 80: 166-170
100. Paragh Gy, Asztalos L, Seres I, Balogh Z, Locsey L, Karpati I, Matyus J, Katona E, Harangi M, Kakuk Gy. Serum paraoxonase activity changes in uremic and kidney transplanted patients. *Nephron* 1999; 83: 126-131
101. Mackness MI, Abbott CA, Arrol S, Durrington PN. The role of high density lipoprotein and lipid-soluble antioxidant vitamins in inhibiting low density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993; 294: 829-834
102. Mackness MI, Abbott CA, Arrol S, Durrington PN. Protection of low density lipoprotein against oxidative modification by high density lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 1993; 104: 129-135
103. Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du BN, Faul KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of HDL associated paraoxonase: inhibition of biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 96: 2882-2891
104. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Paromo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-1590
105. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov BN, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW. Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxynitrite donor. *J Biol Chem* 2001; 276: 24473-24481

106. Teiber JF, Draganov DI, La Du BN. Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 887-896
107. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Frogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 892-904
108. Jaouad L, Miloschevitch C, Khalil A. PON1 paraoxonase activity is reduced during HDL oxidation and is an indicator of HDL antioxidant capacity. *Free Radic Res* 2003; 37: 77-83
109. Nguyen SD, Sok DE. Beneficial effect of oleoylated lipids on paraoxonase 1: protection against oxidative inactivation and stabilization. *Biochem J* 2003; 375: 275-285
110. Sanvanich P, Mackness B, Gaskell SJ, Durrington P, Mackness M. The effect of high-density lipoproteins on the formation of lipid/protein conjugates during in vitro oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 300: 501-506
111. Aviram M, Billecke S, Sorenson R, Bisgaier C, Newton R, Rosenblat M, Eroglu J, Hsu C, Dunlop C, La Du BN. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1617-1624
112. Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M, Mackness M. Paraoxonase-1 inhibits oxidized LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 680-683
113. Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M. Paraoxonase 1(PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the

cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2005; 179: 69-77

114. Moore RE, Navab M, Millar JS, Zimetti F, Hama S, Rothblat GH, Rader DJ. Increased atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein A-I attributable to both impaired cholesterol transport and increased inflammation. *Circ Res* 2005; 97: 763-771
115. Primo-Parmo SL, Sorenson RC, Teiber J, La Du BN. The human serum paraoxonase/ arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 1996; 33: 498-507
116. Boright AP, Connelly PW, Brunt JH, Scherer SW, Tsui LC, Hegele RA. Genetic variation in paraoxonase-1 and paraoxonase-2 is associated with variation in plasma lipoproteins in Alberta Hutterites. *Atherosclerosis* 1998; 139: 131-136
117. Ng CJ, Bourquard N, Frijalva V, Hama S, Shih DN, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ, Young S, Reddy ST. Paraoxonase-2 deficiency aggravates atherosclerosis in mice despite lower apolipoprotein-B-containing lipoproteins. Anti-atherogenic role for paraoxonase-2. *J Biol Chem* 2006; 281: 29491-29500
118. Shih DM, Xia YR, Wang SS, Wang SS, Bourquard N, Fogelman AM, Lusis AJ, Reddy ST. Decreased obesity and atherosclerosis in human paraoxonase 3 transgenic mice. *Circ Res* 2007; 100: 1200-1207
119. Miner S, Evrovski J, Cole D. Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: An update. *Clin Biochem* 1997; 30(3):189-201
120. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. *Eur J Pediatr* 1998; 157(2): 40-44
121. Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006; 136: 1741-49
122. Selhub J, Miller JW. The pathogenesis of homocysteinemia: Interruption of the coordinate regulation by S-Adenosylmethionine of

the remethylation and transsulfuration of homocysteine. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 131-38

123. Ubbink JB. Vitamin nutrition status and homocysteine: an atherogenic risk factor. *Nutr Rev* 1994; 52: 383-93
124. Guttormsen AB, Schneede J, Fiskerstrand T, Ueland PM, Refsum HM. Plasma concentrations of homocysteine and other aminothiols compounds are related to food intake in healthy human subjects. *J Nutr* 1994; 124: 1934-41
125. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998; 49: 31-6
126. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, et al. Total homocysteine in plasma or serum. Methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993; 39: 1764-79
127. Jakubowski H. Proofreading in vivo: editing of homocysteine by aminoacyl-tRNA synthetases in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1995; 270: 17672-17673
128. Jakubowski H, Goldman E. Synthesis of homocysteine thiolactone by methionyl-tRNA synthetase in cultured mammalian cells. *FEBS Lett* 1993; 317: 593-98
129. Jakubowski H. Homocysteine Thiolactone: Metabolic origin and protein homocysteinylation in humans. *J Nutr* 2000; 130: 377-381
130. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2008; 59(9): 155-167
131. Jakubowski H. Metabolism of homocysteine thiolactone in human cell cultures. *J Biol Chem* 1997; 272(3): 1935-42
132. Jakubowski H. Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase: a protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 2000; 275(6): 3957-62.

133. Jakubowski H. Protein homocysteinylation: Possible mechanism underlying pathological consequences of elevated homocysteine levels. *FASEB J* 1999; 13: 2277-83
134. Jakubowski H. Homocysteine is a protein amino acid in humans: Implications for homocysteine –linked disease. *J Biol Chem* 2002; 277: 30425-8
135. Glowacki R, Jakubowski H. Cross-talk between cys34 and lysine residues in human serum albumin revealed by N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 2004; 279: 10864-71
136. Jakubowski H. Translational accuracy of aminoacyl-tRNA synthetases: implications for atherosclerosis. *J Nutr* 2001; 131: 2983-87
137. Jakubowski H, Ambrosius W, Pratt JH. Genetic determinants of homocysteine thiolactonase activity in humans: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett* 2001; 491: 35-39
138. Jakubowski H. New method for the determination of protein N-linked homocysteine. *Anal Biochem* 2008; 380: 257-61
139. Liu G, Nellaiappan K, Kagan HM. Irreversible inhibition of lysyl oxidase by homocysteine thiolactone and its selenium and oxygen analogues. Implications for homocystinuria. *J Biol Chem* 1997; 272: 32370-32377
140. Ferretti G, Bacchetti T, Marotti E, Curatola G. Effect of homocysteinylation on human high-density lipoproteins: a correlation with paraoxonase activity. *Metabolism* 2003; 52: 146-151
141. Jakubowski H, Boers GH, Strauss KA. Mutations in cystathionine beta-synthase or methylenetetrahydrofolate reductase gene increase N-homocysteinylation protein levels in humans. *FASEB J* 2008; 22: 4071-4076
142. Jakubowski H. Anti- N-homocysteinylation protein autoantibodies and cardiovascular disease. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 1011-1014

143. Bogdanski P, Pupek-Musialik D, Dytfeld J, Lacinski M, Jablecka A, Jakubowski H. Plasma homocysteine is a determinant of tissue necrosis factor alpha in hypertensive patients. *Biomed Pharmacother* 2008; 62: 360-65
144. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Vignini A, Nanetti L, Curatola G. Effect of homocysteinylation of low density lipoproteins on lipid peroxidation of human endothelial cells. *J Cell Biochem* 2004; 92: 351-360
145. Undas A, Perla J, Lacinski M, Trzeciak W, Kazmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylation proteins in humans: implications for atherosclerosis. *Stroke* 2004; 35: 1299-1304
146. Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006; 136: 1741-49
147. Chwatko G, Jakubowski H. Urinary Excretion of Homocysteine-Thiolactone in Humans. *Clin Chem* 2005; 52: 408-415
148. Zimny J, Sikora M, Guranowski A, Jakubowski H. Protective mechanisms against homocysteine toxicity: The role of bleomycin hydrolase. *J Biol Chem* 2006; 281(32): 22485-92
149. Bromme D, Rossi AB, Smeekens SP, Anderson DC, Payan D. Human bleomycin hydrolase: Molecular cloning, sequencing, functional expression enzymatic characterization. *Biochemistry* 1996; 35: 6706-6714
150. Goffredo G, Gensini MD. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am J Cardiol* Feb 1983; 51: 604-605
151. Harangi M, Remenyik E, Seres I, Varga Z, Katona E, Paragh G. Determination of DNA damage induced by oxidative stress in hyperlipidemic patients. *Mutat Res* 2002; 513 : 17-25
152. S Roland, F John and JR Keaney. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381-1478
153. P Libby. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-874

154. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraonase and coronary heart disease. *Atherosclerosis Supp* 2002; 3: 49-55
155. Anselmi M, Garbin U, Agostoni P, Fusaro M, Pasini AF, Nava C, Keta D, Turri M, Zardini P, Vassanelli C, Cascio VL, Cominacini L. Plasma levels of oxidized-low-density lipoproteins are higher in patients with unstable angino and correlated with angiographic coronary complex plaques. *Atherosclerosis* 2006; 185 :114-120
156. Faviou E, Vourli G, Nounopoulos C, Zachari A, Dionyssiou-Asteriou A. Circulating oxidized low density lipoprotein, autoantibodies against them and homocysteine serum levels in diagnosis and estimation of severity of coronary artery disease. *Free Rad Res* 2005; 39(4): 419-429.
157. Huang H, mai W, Liu D, Hao Y, Dong Y. The oxidaton ratio of LDL: a predictor for coronary artery disease. *Discasc Markers* 2008; 24: 341-349.
158. Fredrikson GN, Hedblad B, Berglund G, Nilsson J. Plasma oxidized LDL: a predictor for acut myocardial infarction. *J Int Med* 2003; 253: 425-429
159. Toshima S, Hasegawa A, Kurabayashi M, Itabe H, Takano T, Sugano J, Shimamura K, Kimura J, Michishita I, Suzuki T, Nagai R. Circulating oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 2243-2247
160. Lu C, Gao Y, Zhou H, Tian H. The relationships between PON1 activity as well as ox-LDL levels and coronary artery lesions in CHD patients with diabetes mellitus or impaired fasting glucose. *Pathophysiol Nat History* 2008; 19: 565-573
161. Sarkar DM, Shivaprakash TM, Madhusudhan B. Association between paraonase activity and lipid evels in patients with premature coronary artery disease. *Clin Chim Acta* 2006; 373:77-81

162. Şentürk T, Sarandöl E, Güllülü S, Erdiñç S, Özdemir B, Baran İ, Aydınlar A. Association between paraoxonase 1 activity and severity of coronary artery disease in patients with acut coronary syndromes. *Acta Cardiol* 2008; 63(2):361-367
163. Laksman MR, Gottipati CS, Narasimhan S, Munoz J, Marmillot P, Nylen E. Invers correlation of serum paraoxonase and homocysteine thiolactonase activities and antioxidant capacity of high-density lipoprotein with the severity of cardiovascular disease in persons with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2006; 55(9): 1201-1206
164. Azarsız E, Kayıkçioğlu M, Payzin S, Sözmen EY. PON1 activities and oxidative markers of LDL in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Int J Cardiol* 2003; 91:43-51.
165. Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E, Roberts C, Durrington PN, Mackness MI. Paraoxonase status in coronary heart disease. Are activity and concentration more important than genotype?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1451-1457.
166. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Ptel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after mycardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 330-335
167. Mackness B, Durrington P, FMedSci, McElduff P, Yarnell J, Azam N, Watt M, Mackness M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 2003; 107: 2775-2779
168. Tomas M, Senti M, Garcia-Faria F, Vila J, Torrents A, Covas M, Marrugat J. Effect of simvastatin therapy on paraoxonase activity and related lipoproteins in familial hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2113-2119.
169. Koubaa N, Nakbi A, Hammami S, Attia N, Mehri S, Ben Hamda K, Ben Farhat M, Miled A, Hammami M. Association of homocysteine

thiolactonase activity and PON1 polymorphisms with the severity of acute coronary syndrome. Clin Biochem 2009 Jun; 42(9): 771-6

170. Domagala TB, Lacinski M, Trzeciak WH, Mackness B, Mackness MI, Jakubowski H. The correlation of homocysteine-thiolactonase activity of the paraoxonase (PON1) protein with coronary heart disease status. Cell Mol Biol 2006; 52(5): 4-10.



T. C.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
LOKAL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI



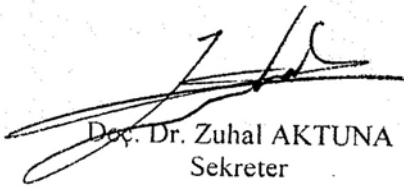
Karar Tarihi: 13. 04. 2009

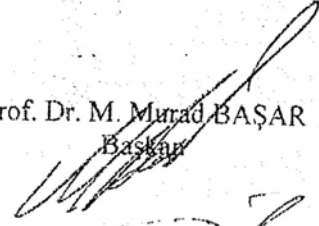
Karar No: 2009/042

K. Ü. T. F. Etik Komite toplantısı 13. 04. 2009 tarihinde Prof. Dr. M. Murad BAŞAR başkanlığında, Prof. Dr. Osman ÇAĞLAYAN, Prof. Dr. Cüneyt ENSARİ, Doç. Dr. Serdar GÜNAYDIN, Doç. Dr. Zuhul AKTUNA, Yrd. Doç. Dr. Murat TULMAÇ ve Yrd. Doç. Dr. Nurper ERBERK-ÖZEN'in katılımı ile yapıldı. Prof. Dr. Osman ÇAĞLAYAN ve Doç. Dr. Pınar ATASOY ve Ecz. Saadet KURUÖZ mazeretleri nedeni ile toplantıya katılamadılar.

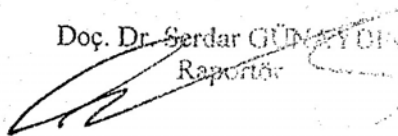
Toplantıda Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.D.dan Doç. Dr. Yeyun ÖZKAN sorumluluğunda planlanan "Aterosklerotik olgularda homosistein, tiolaktonazenzim aktivitesinin incelenmesi" isimli çalışması yapılan düzenleme önerileri doğrultusunda tekrar değerlendirildi. Yapılan inceleme sonunda çalışmanın yürütülmesi için gerekli Lokal Etik Kurul kararı oy birliği ile alındı.

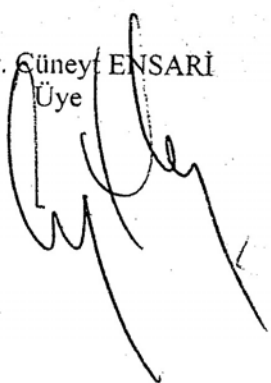
Bu oylamada araştırma ekibinde yer alan Yrd. Doç. Dr. Murat TULMAÇ oy kullanmadı.

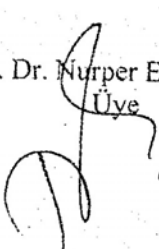

Doç. Dr. Zuhul AKTUNA
Sekreter

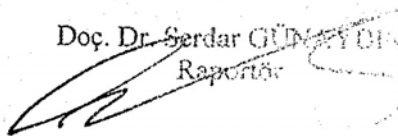

Prof. Dr. M. Murad BAŞAR
Başkan


Prof. Dr. Osman ÇAĞLAYAN
Bşk. Yrd.


Doç. Dr. Serdar GÜNAYDIN
Raporör


Prof. Dr. Cüneyt ENSARİ
Üye


Yrd. Doç. Dr. Nurper ERBERK-ÖZEN
Üye


Yrd. Doç. Dr. Murat TULMAÇ
Üye
(Araştırma ekibinde)

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı : Aylin
Soyadı : ALTINAY
Doğum Yeri ve Tarihi : Bursa, 19.01.1982
Eğitimi :Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Biyokimya Bölümü - 2006
İzmir Kız Lisesi -2000
Mehmet Aker İlköğretim Okulu – 1996
Hürriyet İlkokulu-1993
Yabancı Dili : İngilizce