



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

HİPERPROLAKTİNEMİ İLE KİTOTRİOZİDAZ İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Dr. Özlem TÜYSÜZ

UZMANLIK TEZİ

BURSA – 2015



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

HİPERPROLAKTİNEMİ İLE KİTOTRİOZİDAZ İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Dr. Özlem TÜYSÜZ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. Melahat DİRİCAN

BURSA – 2015

İÇİNDEKİLER

Türkçe Özet	ii
İngilizce Özet	iv
Kısaltmalar	vi
Giriş	1
Kitin ve Kitinazlar.....	1
Kitotriozidaz	2
Kitotriozidaz ve Klinik Durumlarla İlişkisi	3
Kitotriozidaz ve Atheroskleroz	7
Kitotriozidaz ve Prolaktin	17
Gereç ve Yöntem	24
Bulgular	34
Tartışma ve Sonuç	41
Kaynaklar	46
Teşekkür	52
Özgeçmiş	53

ÖZET

Kitotriozidaz (CHIT) aktive makrofajlardan salınan bir enzimdir ve Gaucher hastalığı, sarkoidoz, β -talasemi, malarya, diyabet, nörolojik hastalıklar ve atheroskleroz gibi birçok bozukluğun etyopatogenezinde rol oynadığı kabul edilmektedir. Kitotriozidaz aktivitesinin makrofaj aktivasyonun bir göstergesi olduğu öne sürülmüştür. Prolaktin üreme, gebelik ve laktasyon olaylarında önemli role sahip olmasının yanında büyüme-gelişme, metabolizma, immün regülasyon ve karsinogenez gibi birçok biyolojik süreçte de etkilidir. Prolaktinin immün sistem üzerinde önemli etkilerinin olduğu, gerek humoral gerekse hücrel immüniteyi uyardığı kabul edilmektedir. İn vitro olarak prolaktinin CHIT gen ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir. CHIT ve prolaktinin her ikisinin de atherosklerotik fenotipe katkıda bulunduğu ve atherosklerotik lezyonlarda artmış olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada bir makrofaj aktivasyon belirteci olarak tanımlanan CHIT ile immün sistem üzerinde modülatör etkileri olan prolaktinin inflamatuvar bir süreç olan atheroskleroz oluşumu üzerine olası ilişkisinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmada CHIT ve prolaktin düzeylerinin ilişkisinin incelenmesi amacıyla hiperprolaktinematik (H-PRL; 85 kadın, 36 erkek) ve makroprolaktinematik (M-PRL; 14 kadın, 5 erkek) hastalar kontrol grubu (37 kadın, 17 erkek) ile karşılaştırıldı. CHIT enzim aktivitesi florometrik yöntemle, CHIT kütle düzeyi ise ELISA ile tayin edildi. Ayrıca hiperprolaktinematik oksidan-antioksidan sistemleri araştırmak amacıyla lipit profili, lipit peroksidasyon belirteci olarak malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasite (TAK) çalışıldı.

Çalışmamızda H-PRL grubunda CHIT-kütle düzeyinin kontrol ($p < 0.01$) ve M-PRL ($p < 0.05$) gruplarından düşük olduğu bulundu. CHIT aktivitesinin gruplar arasında farklılık göstermediği saptandı. CHIT-kütle ile CHIT aktivitesi arasında kontrol ve M-PRL gruplarında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandığı halde H-PRL grubunda bu ilişkinin olmadığı görüldü. CHIT-kütle ve aktivitesinin kontrol grubunda yaşla pozitif korelasyon

gösterdiği ancak H-PRL ve M-PRL gruplarında bu korelasyonun bulunmadığı saptandı. Serum glukoz düzeyinin ve lipid parametrelerinin gruplar arasında farklı olmadığı görüldü. Serum prolaktin ve CHIT-kütle düzeyleri, CHIT aktivitesi ve lipid parametreleri arasında çalışma gruplarında anlamlı bir ilişki gözlenmedi. Serum TAK'nin H-PRL ve M-PRL gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek olduğu saptandı. Serum MDA düzeyi gruplar arasında anlamlı farklılık göstermedi.

Sonuç olarak bu çalışmada, in vitro şartlarda prolaktinin CHIT indüksiyonuna yol açtığı yönündeki verilerin aksine H-PRL grupta serum CHIT-kütle düzeyinin M-PRL ve kontrol gruplarından anlamlı olarak daha düşük olduğu bulundu. Hiperprolaktinematik gruplarda lipid parametrelerinin ve atherojenik indeksin kontrol grubuna göre farklı olmaması hiperprolaktineminin belirgin dislipidemi ile birlikte olmadığı bulgusunu destekler nitelikteydi.

Anahtar Kelimeler: Kitotriozidaz, prolaktin, makroprolaktin, atheroskleroz, oksidan-antioksidan sistem.

SUMMARY

THE RELATIONSHIP OF CHITOTRIOSIDASE WITH HYPERPROLACTINEMIA

Chitotriosidase (CHIT), an enzyme released from active macrophages, has been accepted to play role in the pathogenesis of several disorders, such as Gaucher disease, sarcoidosis, β -thalassemia, malaria, diabetes, neurological diseases and atherosclerosis. It is also suggested to be an indicator of macrophage activation. In addition to its pivotal role in fertility, maternity and lactation, prolactin effects many biological processes such as growth, metabolism, immune regulation and carcinogenesis. It is accepted that prolactin has a vital effects on immune system by stimulating both humoral and cellular immunity. It was observed that prolactin increased expression of CHIT genes. Moreover, it was suggested that both CHIT and prolactin contribute to expression of atherosclerotic phenotype and they were shown to be increased in atherosclerotic lesions.

In this study, CHIT, identified as a macrophage activation indicator, and prolactin, an immune system modulator, were evaluated in order to investigate their possible association with atherogenesis which is an inflammatory process. In order to examine the relation between CHIT and prolactin levels, hyperprolactinemic (H-PRL) patients (85 female, 36 male; n: 121), macroprolactinemic (M-PRL) patients (14 female, 5 male; n: 19) and control group (37 female, 17 male; n: 54) were included in this study. CHIT enzyme activity and mass were determined by a fluorometric assay and ELISA, respectively. Moreover, lipid profile, malondialdehyde (MDA) a lipid peroxydation indicator, and total antioxidant capacity (TAC) were evaluated in order to investigate the oxidative and antioxidative systems in hyperprolactinemia.

CHIT-mass level of the H-PRL group was significantly less than those of the control ($p < 0.01$) and M-PRL ($p < 0.05$) groups. It was observed that CHIT activity did not differ among the study groups. There was a significant positive correlation between the CHIT-mass and CHIT activity in both the control and M-PRL groups, but not in the H-PRL group. It is detected that both CHIT-mass and CHIT activity had a positive correlation with age in the control group; but not in the H-PRL and M-PRL groups. It was observed serum glucose and lipid profile parameters were not different between the study groups. There was not any significant correlation between the prolactin and CHIT-mass levels, CHIT activity and lipid profile parameters in any of the study groups. Serum TAC levels were significantly higher in both the H-PRL and M-PRL groups compared with those of the control group. Serum MDA levels were not different among the study groups.

In the present study, in contrast with the findings of *in vitro* studies which reported that prolactin induced CHIT expression, serum CHIT-mass concentration was significantly lower in H-PRL group compared with those of the M-PRL and control groups. Since serum lipid parameters and atherogenic index were not different between the study groups we conclude that hyperprolactinemia does not accompany with dyslipidaemia.

Keywords: Chitotriosidase, prolactin, macroprolactin, atherosclerosis, oxidative-antioxidative system.

KISALTMALAR

- GH:** Glikozid hidrolaz
CHIT: Kitotriozidaz
PMN: Polimorfonükleer nötrofil
TNF- α : Tümör nekrosis faktör- α
MS: Multipl skleroz
ALS: Amyotrofik lateral skleroz
BOS: Beyin omurilik sıvısı
VCAM: Vasküler hücre adezyon molekülü
LDL: Düşük dansiteli lipoprotein
MmLDL: Minimal modifiye LDL
ApoB-100: Apolipoprotein B-100
MDA: Malondialdehit
VLDL: Çok düşük dansiteli lipoprotein
IDL: Ara dansiteli lipoprotein
HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein
Lp(a): Lipoprotein a
TG: Trigliserit
KKH: Koroner kalp hastalığı
OxLDL: Okside LDL
SdLDL: Küçük yoğun LDL
HL: Hepatik lipaz
CETP: Kolesterol ester transfer protein
LogTG/HDL: Atherojenik indeks
GSH: Glutasyon
SOD: Superoksit dismutaz
GPx: Glutasyon peroksidaz
GR: Glutasyon redüktaz
TAK: Total antioksidan kapasite
CRP: C-reaktif protein

HsCRP: Yüksek duyarlılıklı CRP

PRL: Prolaktin

Big PRL: Dimerik form prolaktin

Big-big PRL: Polimerik form prolaktin, makroprolaktin

PEG: Polietilenglikol

G-CSF: Granülosit- koloni uyarıcı faktör

IL: İnterlökin

GM-CSF: Granülosit-monosit koloni uyarıcı faktör

PTK: Protein tirozin kinaz

PI3-K: Fosfatidil inositol 3 kinaz

MAPK: Mitojen aktive kinazlar

PCOS: Polikistik over sendromu

DMSO: Dimetilsülfoksit

GİRİŞ

1. Kitin ve Kitinazlar

Kitin, N-asetilglukozamin monomerlerinin β -1,4 glikozid bağı ile bağlanmasıyla oluşan lineer çözünmez bir polisakkarittir ve birçok kabuklu, artropod, fungus ve parazitik nematodların ortak yapısal elemanıdır. Bu patojenler kitini konakçı oldukları hücrede kendilerini zor şartlardan korumak için kullanırlar. Kitin metabolizması primer olarak yapım ve yıkım enzimleri olan kitin sentaz ve kitinaz enzim sistemleri tarafından kontrol edilir (1).

Genel olarak kitinazlar yapı ve katalitik mekanizma farklılığına göre glikozid hidrolaz 18 ve 19 (GH18, GH19) olarak 2 gruptur. GH19 daha çok bitkilerde tanımlanmıştır. Ayrıca yakın zamanda yapılan çalışmalarda GH48 ve GH20 protein ailelerinde de kitinaz aktivitesi saptanmıştır (2).

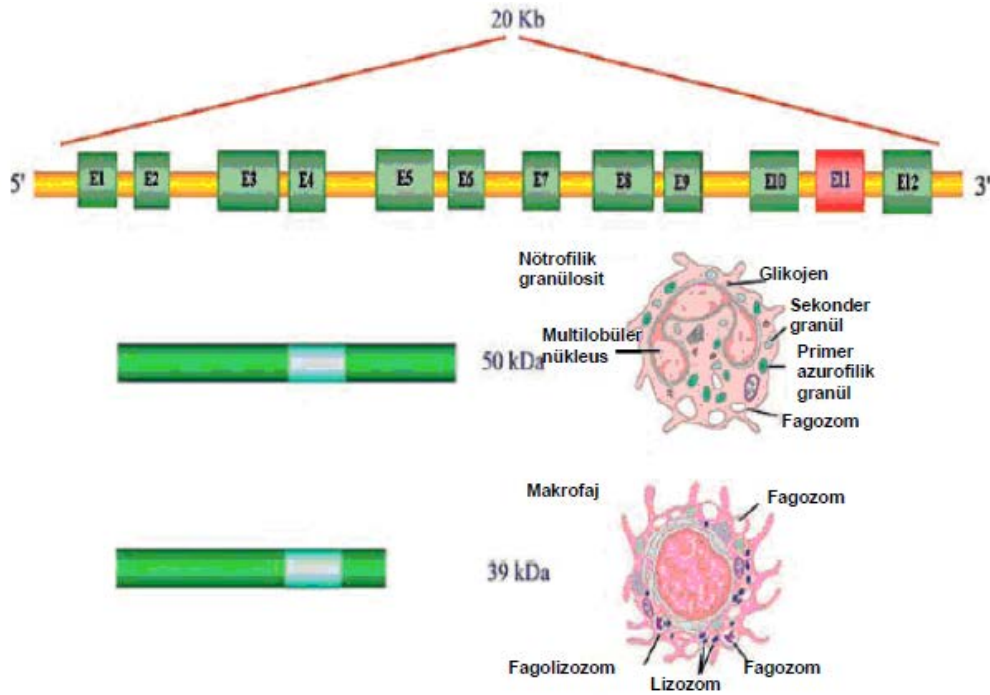
İnsan vücudunda yapısal eleman olarak kitin bulunmaz ve kitin sentez veya metabolize edilemez. İnsan genomunda kitinaz ve benzeri proteinleri kodlayan GH18 ailesine ait 8 adet gen bulunmuştur (2). Bu genler tarafından kodlanan 8 proteinden 3 tanesi enzim aktivitesi göstermektedir. Bunlar; fungustatik etkisi olduğu belirlenen ve aktif makrofajlardan salınan kitotriozidaz (CHIT) (3), doğal bağışıklık mekanizması ve besinlerin sindiriminde rol aldığı ileri sürülen, daha çok gastrointestinal kanal ve akciğerlerde bulunan asidik memeli kitinaz (2,4), ve kitinin yanı sıra asparajinle bağlanmış glikoproteinlerin lizozomal yıkımında rol alan di-N-asetilkitobiazdır. GH18 ailesinin diğer proteinleri, hidrolitik enzim aktivitesi göstermeyen fakat oligosakkarit bağlayabilme yeteneği olan, kitolektin olarak da adlandırılan proteinlerdir (2).

2. Kitotriozidaz

Kitotriozidaz, özellikleri ilk tanımlanan memeli kitinazdır. CHIT enzim yüksekliğini ilk kez 1994'de Hollak ve ark. (5) semptomatik Gaucher

hastalarının plazmalarında saptamışlar ve bu kitinaza, sentetik substrat olan kitotrioz'a da etki etmesi nedeniyle bu adı vermişlerdir.

Boot ve ark. (6) tarafından 1995'te insan CHIT cDNA'sı klonlanmış ve amino asit dizisi belirlenmiştir. İnsan CHIT geni 1q31-q32'de bulunur ve 12 ekzondan oluşan 20 kb'lık dizi içerir. İnsan dokularında CHIT moleküler kütle ve isoelektrik nokta bakımından heterojeniteye sahiptir. Majör izoform 50 kDa kütleinde nötrofilik granülosit öncülllerinden sentezlenen ve granüllerinde depolanan formdur. Bir kısım enzim makrofajların lizozomlarında proteolitik işleme uğrayarak farklı isoelektrik noktaya sahip 39 kDa kütleindeki forma dönüşerek depolanır (Şekil1). İnsanlarda kitinaz protein ailesinin 8 üyesinden 7'sinin genleri CHIT geni gibi 1. kromozomda bulunmakta, bir tanesinin geni (CHID1) 11. kromozomda (11p15.5) yer almaktadır (7).



Şekil-1: Kitotriozidazın genomik yapısı (6).

İnsanlarda major kitinaz olan CHIT enziminin sentez ve salınımı uyarı sonucunda aktiflenmiş (olgun) makrofajlar ve polimorfonukleer nötrofillerden (PMN) olmaktadır (8). Bu nedenle "insan fagosite-özel kitinaz" olarak da

adlandırılmaktadır. İnsanlarda aktive olmamış monosit ve lenfositlerde anlamlı sentez ve salınımı yoktur (9).

Değişik etnik gruplarda, CHIT aktivitesinin resesif geçişli eksikliği tanımlanmıştır (CHIT geni 10. ekzon 24 bp duplikasyonu). Homozigot olan bireylerde enzim tamamen inaktiftir ve bu bireylerde CHIT aktivitesi saptanamaz. Sadece tek bir mutant allel taşıyan (heterozigot) bireylerde ise, normal aktivitenin yaklaşık yarısı aktivite saptanır (10). Homozigot mutant allel sıklığı Avrupa'da ortalama %6-8, Afrika'da ise %0 olarak bulunmuştur (11).

Normal



Mutant



Şekil-2: Kitotriozidaz aktivitesi eksik bireylerde mRNA'daki bozukluk (6).

2.1. Kitotriozidaz ve Klinik Durumlarla İlişkisi

2.1.1. Kitotriozidaz ve Gaucher Hastalığı

1994'de Hollak ve ark. (5), semptomatik Gaucher hastalarının plazmalarında yaklaşık 1000 kat artmış CHIT yüksekliği göstermişlerdir. Gaucher hastalığı, lizozomal bir enzim olan glukoserebrozidaz aktivitesindeki eksikliğe bağlı olarak makrofajların lizozomlarında glukozilseramid birikimi ile karakterizedir. Lipit yüklü makrofajların birikimi, hepatosplenomegali, kemik lezyonları ve daha nadir olarak nörolojik anormalliklere neden olur (5). CHIT'in Gaucher'li hastalarda lipit-yüklü makrofajlar tarafından sentezlendiği gösterilmiştir (6,12). Bu bulgu ayrıca Gaucher'li hastaların dalak kesitlerinde glukozilseramid ile CHIT aktivitesi arasındaki doğrusal ilişki ile de

desteklenmiştir. Kültür yapılmış Gaucher hücresi modelinde, salınan proteinlerin yaklaşık %10'unu CHIT oluşturmaktadır (3).

Yapısı değiştirilmiş rekombinant insan glukoserebrozidazın (Imiglucerase) intravenöz infuzyonuna dayalı enzim yerine koyma tedavisi, Gaucher hastalarındaki organomegali ve hematolojik anormalliklerde önemli düzelmeler sağlamıştır. Enzim yerine koyma tedavisinin pahalı olması ve klinik iyileşmenin yavaş olması (en az 3-6 haftalık tedavi) nedeni ile tedavi cevabının takibinde erken gösterge olabilecek ikincil biyokimyasal belirteçler araştırılmıştır. Ayrıca enzim yerine koyma tedavisi başlanan hastalarda klinik iyileşmeye paralel olarak serum CHIT aktivitesi hızla düşmekte, ancak normal değerlere erişilmemektedir (5).

2.1.2. Kitotriozidaz ve Sarkoidoz

Sarkoidoz, granülom oluşumunda rol oynayan aktive olmuş T-lenfositler ve mononükleer fagositlerin birikimi ile karakterize etyolojisi bilinmeyen multisistemik granümatöz bir hastalıktır (13). En sık özellikle hiler ve mediastinel lenf nodları olmak üzere akciğerleri tutan bir hastalık olmasına karşın; gözleri, cildi, periferik lenf nodlarını, böbrekleri, eklemleri, kasları ve merkezi sinir sistemini tutabilmektedir (14). Genellikle iyi bir prognoza sahip olmasına karşın, bazı hastalarda ilerleyici interstisyel akciğer hastalığı gelişip fibrozisle sonuçlanabilmektedir (15). Prognozu ve klinik çeşitliliği öngörülemeyen bir hastalık olan sarkoidozda, klinik sonuçlar için de güvenilir bir gösterge bulunmamaktadır (16).

Aktif sarkoidozlu çoğu hastada bronkoalveolar lavaj ve serum örneklerinde CHIT aktivitesi oldukça yüksek bulunmuştur. Akciğer dışında diğer organ tutulumu olan hastalarda da akciğere izole forma göre daha yüksek CHIT aktivitesi saptanmıştır (14). Bununla birlikte kortikosteroid tedavisi alan ve remisyonda olan çoğu hastada CHIT aktivitesinde düşüş görülmüştür (15). Ayrıca sarkoidozun evreleri ile CHIT aktivitesi arasında ilişki bulunmuş, ileri evrelerde anlamlı olarak aktivitenin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (17). Sarkoidoz dışı akciğerin granümatöz hastalıklarında ise (tüberküloz, interstisyel akciğer hastalıkları) serum CHIT aktivitesinde önemli bir artış olmadığı bildirilmiştir (18,19).

2.1.3. Kitotriozidaz ve β -Talasemi

β -Talasemi, bozulmuş eritropoezle sonuçlanan, hemoglobinin β -globin zincir sentezinde genetik defektle karakterize hematolojik bir hastalıktır. Bu hastalıkta CHIT aktivitesinde artış olduğu saptanmıştır (6). Serum ferritin düzeylerinin yükseldiği ve üriner demir atılımının arttığı yoğun bir transfüzyonu takiben, β -talasemi majorlu hastaların ~% 10'unda, Gaucher hastalarınınki kadar yüksek plazma CHIT aktiviteleri saptanmıştır. Bu hastalardaki plazma CHIT yüksekliğine, makrofajlarda demir ve eritrosit yıkım ürünlerin birikmesinin yol açtığı düşünülmektedir (20). CHIT seviyelerinin hem ferritin düzeyleri ile hem de yıl başına düşen kan transfüzyonu sayısı ile anlamlı korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (21).

2.1.4. Kitotriozidaz ve Malarya

Malarya tropikal bölgelerde başlıca morbidite ve mortalite sebeplerinden biridir. Plasmodium falcifarum malaryası en ölümcül formdur ve hem insidansı hem de antimalaryal ilaçlara direnç giderek artmaktadır. Malaryal infeksiyonlarda, tümör nekrosis faktör- α (TNF- α) gibi makrofaj bağımlı faktörlerin hematolojik anormalliklerin patogenezinde ve makrofaj disfonksiyonundaki rolü uzun zamandır bilinmektedir (22).

Barone ve ark.'nın yaptığı çalışmada, Afrikalı sağlıklı çocuklarda ve malaryalı çocuklarda, beyaz ırklı çocuklara göre CHIT seviyelerinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca Afrikalı malaryalı çocuklarda CHIT seviyelerinin Afrikalı sağlıklı çocuklara göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (22).

2.1.5. Kitotriozidaz ve Diyabet

Diyabet vakalarının %90-95'ini oluşturan tip-2 diyabet, dünya çapında kardiyovasküler morbidite ve mortalitenin önde gelen nedenidir (14). Diyabet, insülin direnci ve yetersiz insülin sekresyonunun kombinasyonu sonucu meydana gelen hiperglisemi ile karakterizedir. Kronik hiperglisemi, uzun dönemde birçok organ ve dokuda yapısal zarar, disfonksiyon ve yetmezliğe yol açarak kronik ve multipl komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu komplikasyonlar sıklıkla retinopati, nefropati ve nöropati gibi mikrovasküler iskemik değişikliklerle karakterizedir (14).

Diyabette endotelial disfonksiyon ve bozulmuş insülin duyarlılığının atherosklerotik ilerlemede rol oynadığı düşünülmektedir. CHIT aktivitesi yeni tanı almış, tedavi edilmemiş ve komplikasyonsuz tip-2 diyabet hastalarında yüksek saptanmıştır. Bu yüksekliğin yaş, plazma glukoz ve asimetrik dimetilarginin düzeyleri ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Artmış CHIT aktivitesinin endotelial disfonksiyonu öngörmeye etkili olabileceği ileri sürülmüştür (23).

Kabaroğlu ve ark. (24) normal kan şekeri ve bozulmuş glukoz toleransı olan obez adolesan gruplarda yaptıkları çalışmada CHIT aktivitesini sistemik inflamatuvar belirteçlerle beraber analiz etmişler ve bozulmuş glukoz toleransı olan obez adolesanlarda anlamlı olarak daha yüksek CHIT aktivitesi saptamışlardır.

2.1.6. Kitotriozidaz ve Nörolojik Hastalıklar

Plazma CHIT aktivitesi birçok nörolojik hastalıkta [Alzheimer hastalığı, multipl skleroz (MS), akut iskemik inme, subaraknoid kanama, amiotrofik lateral skleroz (ALS)] yüksek bulunmuştur (25).

Alzheimer hastalığı yaşlı popülasyonda en sık görülen nörodejeneratif hastalık formudur (26). Alzheimer hastalığının ana patolojik bulgusu, beyinde ana içeriği çözünmeyen küçük peptidler (β -amiloid) olan senil plakların oluşumudur (25). Alzheimer hastalarında plazma CHIT aktivitesi yaşlı kontrol gruba göre önemli oranda yüksek bulunmuştur (27). Ayrıca Mattsson ve ark. serebrospinal sıvıda yaptıkları çalışmada Alzheimer hastalarında CHIT aktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bulmuşlardır (26).

Multipl skleroz merkezi sinir sisteminin kronik inflamatuvar bir hastalığıdır (28). MS patofizyolojisinde aktiflenmiş T lenfositler ve makrofajlar önemli rol oynarlar (25). Sotgiu ve ark.'nın çalışmasında MS'li hastaların hem plazmalarında hem de serebrospinal sıvı örneklerinde kontrol grubuna göre CHIT aktivitesinin oldukça yüksek olduğu bulunmuştur (28).

Amyotrofik lateral skleroz, esas olarak kortikal nöronları ve spinal motor nöronların kaybı ile giden ilerleyici ölümcül nörodejeneratif bir hastalıktır (29). Çoğu vakanın sporadik olduğu ALS' de %5-10'u ise aileseldir

(30). Varghese ve ark. (29) sporadik ALS'li hastalardan elde edilen beyin omurilik sıvısı (BOS)'nda hem ELISA ile ölçülen kütleli CHIT hem de CHIT aktivitesini tayin etmişler ve kontrol grubuna göre ALS'li hastalarda ELISA ile ölçülen CHIT değerlerinin 17 kat, aktivite ölçümlerinin de 10 kat yüksek olduğunu saptamışlardır. Diğer birçok nörolojik hastalıkta CHIT yüksekliği görülmesine rağmen en yüksek değerler ALS'de elde edilmiştir.

İşman ve ark. (31) anevrizmaya bağlı subaraknoid kanamalı hastalarda BOS ve serum CHIT seviyelerinin zaman içerisindeki değişimlerini incelemişlerdir. Kontrol grubunun düzeyleriyle karşılaştırıldığında, ortalama BOS CHIT seviyelerinin subaraknoid kanamanın 5. ve 7. günlerinde yüksek olduğunu; serum seviyelerinin ise ölçülen tüm zamanlarda yüksek olduğunu saptamışlardır. Bununla birlikte, artmış CHIT seviyeleri ile klinik parametreler arasında herhangi bir ilişki olmadığını bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda CHIT aktivitesinin enfeksiyon ve inflamasyondan bağımsız olarak inme ciddiyeti ile pozitif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (32). Bu bulgu, CHIT'ın, inme esnasında görülen makrofaj aktivasyonunu gösteren TNF- α ve diğer pro-enflamatuvar sitokinler gibi bir makrofaj aktivasyon göstergesi olduğuna işaret etmektedir (25).

3. Kitotriozidaz ve Atheroskleroz

3.1. Atheroskleroz Tanım

Atheroskleroz, primer olarak orta ve büyük boydaki elastik arterlerin intima tabakasını etkileyen, karakteristik lezyonu plak olan ve asemptomatik yağlı çizgilenmelerden damar lümenini daraltan stabil veya komplike lezyonlara kadar değişik formları olan, dünya çapında artarak insan sağlığını tehdit eden yoğun immünolojik aktivite ile karakterize ilerleyici inflamatuvar, multisistemik arteriyel bir hastalıktır (33,34).

3.2. Atherogenez

3.2.1. Normal Arter Duvarı

Normal arter duvarı intima, medya ve adventisya olmak üzere üç tabakadan oluşur. İntima tabakası lümeneye bakan yüzde tek sıra halinde

dizilmiş endotel hücreleri, bunu destekleyen subendoteliyal matriks ve bazal membran intimayı oluşturur. İntima tabakası elastik lifçiklerin yoğunlaşması ile meydana gelen membrana elastika interna ile medya tabakasından ayrılır. Arteriyel ağacın dallanma bölgelerinde, düz kas hücrelerinin çoğalmasına bağlı olarak intima kalınlığı ve endotel geçirgenliği artar, medya hücrelerinin tabakasal yapılanması bozulur. Atheroskleroz en çok intimal kalınlığın en fazla olduğu bu dallanma bölgelerinde gelişmektedir. Medya tabakası, arter duvarının orta ve en kalın tabakasıdır. Kollajen elastik lifler ve glikozaminoglikanlardan oluşan matriks içinde konsantrik olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşur (34,35).

3.2.2. Atherogenezde Rol Alan Hücreler

Endotel, arter duvarı ile kan elemanları arasında düzgün ve kesintisiz bir sınır oluşturan tek sıra dizilmiş hücrelerden oluşan bir tabakadır. Lipoproteinler, normal endotelden büyüklüklerinden dolayı ancak transsitoz ile geçebilir. Bu mekanizma lipoprotein reseptörlerinden bağımsızdır ve kandaki lipoprotein düzeyi ile ilişkilidir. Endotel zedelendiğinde, bu bariyer özelliğinin kaybolduğu ve lipoproteinlerin subendotelyuma geçişinin hızlandığı ileri sürülmektedir (35). Atheroskleroz sürecinde düz kas hücreleri medyadan intimaya göç eder ve lezyonun fibroproliferatif sürecinde görev alırlar. Plak kapsülü içeriğini sentezleyerek atherosklerotik lezyona stabilite kazandırır ve trombojenik olan lipitten zengin plak çekirdeğini trombositlerden ve pıhtılaşma kaskadı proteinlerinden ayırır (34,35).

Makrofajlar, dolaşımdaki monositlerden türeyen fagositik hücrelerdir. Her inflamatuvar olayda olduğu gibi, atherosklerotik plakta da yoğunlukla bulunurlar. Makrofajlar bir kez lezyona yerleştikten sonra kendileri de pek çok madde salgılayarak yeni makrofajların gelmesini, düz kas hücreleri, fibroblast ve monositlerin çoğalmasını ve bağ dokusu sentezini uyarırlar. Ayrıca köpük hücre oluşturan asıl hücreler makrofajlardır (35). Atherogenezin her aşamasında lezyon üzerinde trombosit kümeleri veya mural trombositler görülebilir. Endotel hasarı sonucu trombosit aktivasyonu ve agregasyonu tetiklenir. Endotel disfonksiyonu ile birlikte monositler ve T lenfositler için reseptör görevi yapan adezyon molekülleri endotel hücresinde belirlemeye

başlar. Atherosklerotik lezyonlarda hem CD4+ hem de CD8+ hücrelerin bulunması, atherosklerozun patogeneğinde bağışıklık sistemine, hatta belki de otoimmüniteye ilişkin bileşenlerin de rol oynayabileceği fikrini doğurmaktadır (34,35)

3.2.3. Atherogenezde Temel Basamaklar

Atherogenezde temel basamaklar;

- Endotel disfonksiyonu
- Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL)'in oksidasyonu
- Köpük hücre oluşumu
- Lipit çekirdeğinin (lipid core) oluşumu
- Fibröz kılıf oluşumunu içerir.

Endotel disfonksiyonu atheroskleroz patogenezindeki ilk temel basamağı oluşturur. Plak oluşumunda gözlenen ilk olay, subendotelyal intimada kan kaynaklı lipitlerin ve endotelyum üzerinde lökosit adezyon moleküllerinin görülmesidir. Endotel disfonksiyonu sonucunda nitrik oksit azalır ve fizyolojik antagonisti olan endotelin-1'in salınımı artar. Endotelinin damar düz kas hücreleri için mitojenik olduğu ve plak oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Anjiotensin II endotel fonksiyonlarını bozar ve damar düz kas hücrelerinin proinflamatuar bir tipe dönüşmesine yol açar. Nükleer faktör kappa B'yi aktive eder ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) ekspresyonunu uyarır, IL-6 ve TNF- α gibi sitokinlerin salınımına neden olur.

LDL Oksidasyonu: Endotelde disfonksiyon gelişmesinden sonra dolaşımda bulunan LDL, subendotelyal dokuya geçerler. Endotel tabakasını geçerek intimaya yerleşen LDL molekülleri, burada matriks yapısına bağlanarak birikir. LDL'nin ilk oksidasyonu endotel hücreleri tarafından yapılır. Bu aşamada LDL'nin yapısındaki apolipoprotein B100 (apoB-100) değişmediğinden minimal modifiye LDL (mmLDL) adı verilir. mmLDL daha sonra makrofajlardan salgılanan lipooksijenaz, reaktif oksijen radikalleri ve malondialdehitin (MDA) etkisi ile tekrar oksitlenir. MDA, apo B'nin lizin birimini değiştirir. Okside LDL'nin atherogenezdeki etkileri şu şekilde sıralanabilir (35-37):

- Çöpçü reseptörlerce tanınarak makrofajlar ve düz kas hücrelerince fagosite edilir.
- Endotel hücreleri ve düz kas hücrelerine sitotoksik etki gösterir.
- Dolaşımdaki monositler için kemotaktiktir.
- Endotel adezyon moleküllerinin (ICAM-1, VCAM-1) üretimini uyararak monosit ve T-lenfositlerin damar duvarına yapışmasını kolaylaştırır.
- Plak içerisindeki makrofajların motilitesini inhibe ederek, lezyondaki makrofaj sayısının artmasına yardımcı olur.
- Bazı büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılanmasını uyarır.
- İmmünojeniktir, antikor oluşumunu tetikler.

Köpük hücre oluşumu: Okside LDL'yi fagosite eden ve kolesterol esterlerine dönüştüren makrofajlar, köpük hücrelerine dönüşür (yağlı çizgi). Makrofajlar bir kez lezyona yerleştikten sonra, TNF- α ve metalloproteinazlar gibi inflamatuvar sitokinler ve prokoagülan faktörler salgırlar. Ayrıca düz kas hücreleri ve fibroblastların çoğalmasını ve bağ dokusu sentezini uyarırlar (38).

Lipit Çekirdeğin Oluşumu: Lezyon ilerledikçe hücre dışında da lipitler birikmeye başlar. Bu birikimin daha çok köpük hücrelerinin ölmesi sonucu depolanmış olan kolesterol esterlerinin açığa çıkmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Makrofajların atherosklerotik plaklarda çoğaldıkları ve dolaşımdaki monositlerin de sürekli olarak plak içine girdikleri bilinmektedir. Bu yüzden plaktaki makrofaj sayısının kontrolsüz olarak artmasını engelleyen faktörün hücre ölümü olduğu ileri sürülmektedir. Nitekim ilerlemiş atherosklerozda hücre ölümünün yaygın bir özellik olduğu gösterilmiştir. Makrofajların ölümünde, LDL oksidasyonu sonucunda oluşan peroksitlerin de etkisi olmakla beraber asıl mekanizma apoptozdur. Aktif plakta lipit çekirdek çevresinde metalloproteinaz üreten makrofaj kümeleri vardır. Metalloproteinazlar bağ dokusunun yıkımından sorumludur. Sonuçta oluşan lipit çekirdek, intima tabakasının bağ dokusu yapısı içinde kolesterol ve hücre yıkım ürünleri ile dolu boşluklardır. Bu aşamada lipit çekirdeğin üzerinde henüz fibrotik bir tabaka yoktur (35).

Fibröz Başlık Oluşumu: Olgunlaşmış atherom plağında lipit çekirdeğinin üstü fibröz bir başlıkla örtülüdür. Fibröz başlık yoğunlukla düz kas hücreleri ve onların ürettiği bağ dokusundan oluşur. Fibröz başlığın dinamik bir yapı olduğu bilinmektedir. Bir yandan düz kas hücreleri tarafından kollajen yapımı sürerken, diğer yandan proteazlar tarafından sürekli bağ dokusu yıkımı olmaktadır. Lipit çekirdek ve etrafındaki fibröz başlıktan oluşan ilerlemiş lezyona "fibroatherom" adı verilir. Lipit çekirdek ve fibröz tabakanın lezyondaki miktarı, plağın komplikasyon gelişimine ne kadar açık olduğunu belirleyen esas etkindir. Fibröz başlık ne kadar inceyse, yırtılmaya o kadar yatkın ve dolayısıyla plak da komplikasyona o kadar açıktır (35).

3.3. Atherogenez Hipotezleri

Uzun yıllardır ateroskleroz gelişimi ile ilgili kompleks olayları açıklamak için çeşitli çabalar gösterilmiştir. Bu çaba içinde üç farklı hipotez ortaya konulmuştur. Bu hipotezler birbirini dışlayan değil destekleyen hipotezlerdir. Bunlar; 1) hasara yanıt, 2) tutulmaya yanıt ve 3) oksidatif modifikasyon hipotezi olarak bilinmektedir (39).

3.3.1. Hasara Yanıt Hipotezi

Atherosklerotik süreci açıklamaya yönelik geliştirilen hipotezler içinde en yaygın kabulü hasara yanıt hipotezi görmektedir. Ross tarafından ortaya atılan bu varsayımda olayları endotel hasarı başlatmaktadır. Örneğin, zedelenme, lökositler ve trombositler için endotelyal yapışkanlığı artırır ve lokal vasküler antikoagülan ortamı prokoagülan ortama çevirir. Bir araya toplanan lökositler ve trombositlerden trombosit kaynaklı büyüme faktörleri, sitokinler ve vazoaktif ajanlar salıverilir. Bunlar düz kas hücrelerinin intimaya göçü ve proliferasyonu ile karakterize olan bir inflamatuvar yanıtı başlatırlar (39,40).

3.3.2. Tutulmaya Yanıt Hipotezi

Bu hipotez, lipoproteinlerin tutulmasının ateroskleroza başlatan olay olduğunu ileri sürer. Arteriyel duvarda lipoproteinlerin alıkonması, ekstraselüler matriksin komponentleri ile ilişkili görünmektedir. Aterosklerozun erken evrelerinde, apo B içeren lipoproteinler arteriyel proteoglikanlar aracılığı ile arter duvarında tutulmaktadır. Ekstraselüler

matriksteki lipolitik ve lizozomal enzimler de bağlanmada rol oynarlar. Örneğin, lipoprotein lipaz *in vitro* ortamda LDL'nin yapışkanlığını artırır ve bu etki enzimatik aktiviteden bağımsızdır. Arter duvarında tutulan LDL, muhtemelen sfingomyelinaz etkisiyle mikroagregatlar oluşturur. Agregat haline gelmiş LDL, makrofajlar ve düz kas hücreleri tarafından alınır ve böylece köpük hücre oluşumuna neden olur. Atherosklerozun birçok özelliği arteriyel duvar içinde LDL'nin tutulmasının ve proteoglikanlarla ilişkisinin artışına bağlıdır (39).

3.3.3. Oksidatif Modifikasyon Hipotezi

Oksidatif stres, okside-olmayan lipoproteinlere nazaran makrofajlar tarafından daha kolay alınan LDL oksidasyonuna neden olur. Kimyasal olarak modifiye edilmiş LDL, çöpçü reseptör denilen yolla makrofajlar tarafından daha hızlı ve kontrolsüzce alınır. Oksidatif modifikasyon hipotezine göre, LDL lipitleri oksidasyona maruz kalır ve apo B-100'deki lizin kalıntıları modifiye edilir, böylece lipoprotein partikülünün negatif yükü artar. Apo B-100'ün bu modifikasyonu, LDL'nin çöpçü reseptör yolu aracılığıyla makrofajlar tarafından alınmasını artırır ve kolesterol yüklü köpük hücrelerini üretir. Köpük hücrelerinin birikimi, gelişmekte olan atherosklerotik lezyonun temelini oluşturur (39).

3.4. Lipitlerin Atherosklerozdaki Yeri

Steroid hormonların ve safra asidlerinin öncül molekülü ve ayrıca hücre membranlarının yapısal komponenti olan kolesterol, diyetle alınabildiği gibi, %10–20'si karaciğerde olmak üzere çeşitli vücut hücreleri tarafından da sentezlenebilir. Lipitler, plazmada taşınabilmeleri için bağlandıkları hidrofilik yapıdaki apoproteinler ile lipoprotein denilen yapıları oluştururlar. Lipoproteinler ultrasentrifügasyon ile ayrımlarına göre:

1. Şilomikronlar,
2. Çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL),
3. Ara dansiteli lipoproteinler (IDL),
4. Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL),
5. Yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL),
6. Lipoprotein a [Lp(a)]

şeklinde adlandırılırlar. Kolesterolün büyük bölümü LDL ile taşınmaktadır; endojen trigliseritler (TG) ise esas olarak VLDL ile taşınırlar. Kolesterolün ekstrahepatik dokulardan karaciğere tersine nakledilmesi ise HDL ile gerçekleşir (41).

Tüm dünyada önde gelen mortalite ve morbidite sebeplerinden olan kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde ateroskleroz önemli rol oynar. Plazmada yüksek oranda kolesterol, özellikle de LDL ve TG bulunması yanı sıra, HDL'nin düşük olması, tütün kullanımı, hipertansiyon, diyabet, erkek cinsiyet, egzersiz eksikliği, obezite ve stres, aterosklerotik kardiyovasküler hastalıklar için önemli risk faktörleridir (42).

Hipertrigliseridemi, aterosklerozun değiştirilebilir risk faktörleri arasında sayılmaktadır. Bu faktör başlı başına da aterosklerozun gelişimini ve aterosklerotik lezyonların ilerlemesini hızlandırabilir (43).

Önemli bir risk faktörü olan major kolesterol taşıyıcısı LDL'den fazla miktarda kolesterolün makrofajlara aktarılması, aterosklerotik lezyonun göstergesi olan kolesterol ester yüklü köpük hücrelerinin oluşumuna neden olur (44). Yapılan anjiyografik çalışmalarda başta LDL kolesterol düzeyinin azaltılması olmak üzere, lipit düşürücü/değiştirici tedavinin arter duvarına olan etkisi incelenmiş olup bu yaklaşımla aterosklerozun gerilediği ya da ilerlemesinin yavaşladığı saptanmıştır (45). LDL'nin aksine, iyi kolesterol olarak da bilinen HDL, ateroskleroza karşı koruyucu özelliklere sahiptir. En önemli rolü, tersine kolesterol taşıma yoluyla dokulardan kolesterolü uzaklaştırıp arter duvarını aterosklerozdan korumasıdır (46). HDL düzeylerinde 1 mg/dL'lik artış koroner kalp hastalığı (KKH) riskini erkeklerde %2, kadınlarda %3 oranında düşürmektedir (47).

Glikozillenme ve oksidasyon gibi çeşitli modifikasyonlara uğrayabilen LDL, ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynar. Bu patogenezde üzerinde en çok çalışılan modifiye lipoprotein, okside LDL (oxLDL)' dir. oxLDL sitotoksik etkisi ile vasküler endotelde hasara yol açabilir, T lenfositler ve monositler için kemotaktik etki gösterebilir ve köpük hücre oluşumunu arttırabilir (48).

Büyüklik ve yoğunluk bakımından LDL farklı iki fenotipik özellik gösterir. Küçük yoğun LDL (small dense LDL, sdLDL)'nin (LDL boyutunun 25.5 nm ve altında olması) baskın olduğu şekil B paterni, büyük partiküllerin (LDL boyutunun 25.5 nm ve üstünde olması) baskın olduğu şekil A paterni olarak adlandırılır. Çapı 25.5 nm ve altında olan sdLDL' nin dansitesi 1044-1063 g/mL' dir (49).

Küçük yoğun LDL, KKH riskini yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, serum TG, LDL ve HDL kolesterol konsantrasyonlarından bağımsız olarak artırmaktadır. KKH olan hastaların yarısından fazlasında, LDL kolesterolünün normal düzeyde olması sdLDL içeriğinin çok olması ile açıklanabilir (50). Ayrıca sdLDL'nin karotis arter aterosklerozu ile de ilişkili olduğu bildirilmiştir (51). sdLDL atherojenitesinin nedeni; subintimal boşluk içine girme yeteneğinin artmış olmasına, daha fazla okside olmasına ve intimal proteoglikanlara bağlanmasındaki artışa bağlıdır. sdLDL'nin LDL reseptörüne afinitesi az, oksidasyona olan yatkınlığı yüksektir. Yarı ömrü daha uzun olup, dolaşımdan daha güç uzaklaştırılır. Plazmada daha uzun süre kalması nedeniyle oksidasyona uğrama olasılığı artar (52). sdLDL oluşumundaki kilit nokta kanda TG düzeyinin yüksekliğidir. Hepatik lipaz (HL) ve kolesterol ester transfer protein (CETP) aktivitesi de sdLDL oluşumunda rol oynar. Hafif veya orta derecede TG yüksekliğinde, VLDL oranı artar. VLDL yıkımı ile oluşan LDL'nin apo B-100 konformasyonu değiştiğinden LDL reseptörüne bağlanma özelliği azalmış, dolaşımda kalma süresi uzamıştır. LDL, VLDL'den TG alır; karşılığında bu lipoproteinlere kolesterol esterleri ile fosfolipitleri transfer eder. Bu transfer, CETP aracılığı ile gerçekleşir. CETP düzeyi yüksek olan bireylerde LDL'ye TG transferi hızlanmıştır. TG'ten zengin hale gelen LDL, HL için substrat olur. HL'ın hidrolizi ile yağ asitleri açığa çıkar ve apoprotein/lipit oranı yüksek sdLDL partikülleri oluşur. B paternindeki kişilerin plazma TG düzeyleri A paternindeki kişilere göre iki kat daha yüksektir. sdLDL'nin kandaki düzeyi, insülin direnci, tip 2 DM, metabolik sendrom, renal hastalık ve preeklampside artmaktadır. Ayrıca yağdan fakir ve karbonhidrattan zengin beslenme bu fenotipe yatkınlığı olan kişilerde

sdLDL'nin artmasına zemin hazırlar. Yine, ailesel kombine hiperlipidemide B fenotipinin sıklığı artar (52).

Tip 2 DM ve metabolik sendrom'da insülin direncine eşlik eden etkenler ve sdLDL parçacıklarında artma kardiyovasküler hastalık riskini yükseltmektedir. Bu durumla birlikte riski tek başına önemli ölçüde arttıran, atherojen lipoprotein fenotipini sayısal olarak yansıtan bir gösterge olarak atherojenik indeks (log TG/HDL-K) geliştirilmiştir. Bu indeks lipoprotein parçacıklarının büyüklüğü ile yakından ilgilidir. Atherojen indeks, HDL içindeki serbest kolesterolün esterleşme hızına ve HDL parçacıklarının küçülmesine paralel gider. Düşük HDL-K ve yüksek TG düzeyleri sdLDL parçacık sayısının yükselmesini indükler (53). Hermans ve ark.'ları yaptıkları çalışmada tip 2 DM'lu erkeklerde atherojenik dislipideminin % 35 civarında olduğunu göstermişler ve atherojenik indeksin (log TG/HDL-K) insülin rezistansını öngörmeye kolay bir araç olabileceğini ve koroner arter hastalığı riskini gösterebileceğini ortaya koymuşlardır (54).

3.5. Atherosklerozda Oksidatif Stres ve Antioksidanların Rol

3.5.1. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (55).

Oksidatif stresin sonucunda DNA, lipitler ve proteinler gibi önemli hücresel yapıtaşları okside olur. Hücrelerin reaktif oksijen ürünlerine karşı en hassas komponentleri lipitlerdir. Membran lipitlerindeki doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen ürünleri tarafından oksidasyonu lipit peroksidasyonu olarak bilinir (56). Lipit peroksidasyonu sonucunda; konjuge dienler, MDA, 4-hidroksinonenal, akrolein, izoprostanlar ile etan ve pentan gibi alkanlar meydana gelir (57). Lipit peroksidasyonu geçiş metalleri katalizi ile yıkıldığında

çoğu zararlı olan aldehitler oluşur. Oluşan aldehitler içinde en çok dikkati MDA çekmiştir. MDA ölçümü ile lipit peroksidasyonu değerlendirilmektedir.

3.5.2. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türleri (ROS)'nin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" olarak bilinirler. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirirler. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; glutatyon (GSH), membranlara bağlanabilen α -tokoferol ve β -karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir. Hücre içi serbest radikallere karşı savaşan enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (58).

Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu antioksidanların bir kısmının bir arada etki etmesi sonucu her birinin tek başına oluşturduğundan daha fazla antioksidan etki ortaya çıkar, yani aralarında sinerjistik etki vardır. Bu nedenle vücuttaki oksidan-antioksidan dengesinin belirlenmesi için tek tek antioksidanların ölçümündense total antioksidan kapasite (TAK)'nin ölçümünün daha yararlı olacağı düşünülmektedir (59,60).

3.6. Kitotriozidaz ve Atheroskleroz İlişkisi

Boot ve ark. atherosklerotik dokularda CHIT aktivitesinin 55 kat arttığını saptayarak ilk kez insan atherosklerotik damar duvarı içindeki lipit yüklü makrofajlar ile CHIT ekspresyonu arasında açık bir bağlantı olduğunu göstermişlerdir (61). Ayrıca atherosklerotik hastaların serumlarında da CHIT aktivitesi atherosklerotik lezyonun şiddetiyle de orantılı olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş ve atheroskleroz boyutunun bir belirteci olabileceği ileri sürülmüştür. Son yapılan çalışmalar, serum CHIT aktivitesinin kuvvetli bir inflamatuvar belirteç olduğunu ve yeni kardiyovasküler olayların

gelişme riskini önceden öngörmede etkili olabileceğini düşündürmektedir (7,62).

Artieda ve ark.'nın (63) yaptıkları 4 yıllık gözlem çalışmasında, serum CHIT aktivitesinin yeni kardiyovasküler olayların gelişme riskini öngörebildiği bildirilmiştir. Araştırmacılar bu yeni kardiyovasküler risk belirtecinin C-reaktif proteinden (CRP) bağımsız olduğunu ve kombine edildiklerinde yeni kardiyovasküler olay riskinin öngörülmesinde ve düşük riskli grupların tanımlanmasında etkili olabileceğini düşünmüşlerdir.

Karadağ ve ark. (64) anjiografi sonucu bir, iki ve üç damarı tıkalı olan hasta grubu ile damar tıkanıklığı olmayan sağlıklı kişilerde serum CHIT ve yüksek duyarlılıklı CRP (High sensitivity CRP, hsCRP) düzeylerini karşılaştırmışlar ve tıkalı damar sayısı arttıkça serum CHIT ve hsCRP değerlerinin arttığını tespit etmişlerdir. Tıkalı damar sayısı arttıkça serum CHIT seviyelerindeki artışın, hsCRP'deki artışa göre daha anlamlı düzeyde olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar koroner arter hastalığında serum CHIT aktivitesinin güçlü bir inflamatuvar belirteç olarak düşünülebileceğini ve hastalığın ciddiyetinin kantitatif bir göstergesi olabileceğini savunmuşlardır.

4. Kitotriozidaz ve Prolaktin

4.1. Prolaktin Yapı, Sentez ve Klinik

Prolaktin, 1970 yılında tanımlanan yaklaşık 200 amino asitten oluşan polipeptit yapıda bir hormondur. Prolaktin geni 6. kromozomun kısa kolu üzerindedir. Prolaktin prehormon (26 kDa) olarak sentez edilip ayrılma işlemi sonrası monomerik izoforma (23 kDa) dönüşmektedir. Bu monomerik form biyolojik ve immünolojik olarak aktif olan şekildedir ve dolaşımdaki total prolaktinin %80-95'ini oluşturmaktadır. Diğer formlar dimerik form (big PRL, 45-60 kDa) ve polimerik formdur (big-big PRL, >150 kDa, makroprolaktin) (65).

Prolaktin sekresyonu hipofiz laktotrof hücrelerde hipotalamik dopaminin portal venöz yolla D2 reseptör üzerine tonik inhibisyonu ile kontrol edilmektedir (66). Dopamin tanımlanan en önemli prolaktin inhibitör faktördür.

Stimulatör faktörler de prolaktin sekresyonunu düzenler. Bunlar ya direkt olarak hipofize etki ederek ya da dopaminerjik blokaj ile bunu sağlarlar (67).

Prolaktin üreme, gebelik, laktasyon, büyüme-gelişme, metabolizma, immün düzenlenme, elektrolit transportu, deri regülasyonu, davranışlar ve karsinogenez gibi birçok biyolojik fonksiyonda rol alan önemli bir hormondur (68). PRL salınımı pulsatildir ve uyku, stres, egzersiz, göğüs duvarının ve meme başının uyarılması ile artar. PRL kan seviyesi genel olarak, kadınlarda 15-20 ng/ml ve erkeklerde 10-15 ng/mL'nin altındadır (66).

Hiperprolaktinemi klinik endokrinolojide en sık karşılaşılan hipotalamik hipofizer bozukluktur. Hiperprolaktineminin klinik bulguları, hipogonadizm, galaktore ve tümörün kitle etkisinden kaynaklanan semptomlarla karakterizedir. Kadınlarda amenore, galaktore, infertilite, azalmış libido, habitüel abortusla kendini gösterebilir (69). Ayrıca kitle etkisine bağlı olarak, baş ağrısı, görme kaybı ve kranial nöropati izlenebilir. Erkeklerde PRL yüksekliği oligospermiye, impotansa veya her ikisine birden neden olur. Ayrıca, PRL salgılayan hipofiz adenomları olan erkeklerde sıklıkla makroadenomlar ve büyüyen tümör kütesinin optik sinir kesişimine baskı yapması sonucu görme alanı bozuklukları ile kendini gösterir. Erkeklerde, kadınlarda olduğu gibi mikroadenomun varlığının işaretlerini veren adet döngüsü düzensizlikleri gibi bir uyarıcı yoktur. Klinik olarak sessiz hipofiz adenomları olan bireylerin %30 kadarı yüksek PRL düzeylerine sahiptir. PRL yüksekliğinin diğer nedenleri Tablo-1'de verilmiştir (70).

Tablo-1: Prolaktin Yüksesliđi Nedenleri (70).

Kronik böbrek yetmezliđi
Gebelik, laktasyon
Memenin uyarılması, göğüs duvarı travması
Primer hipotiroidizm
Boş sella sendromu
Hipofiz adenomu
İdiyopatik
İlaçlar
Hipotalamik nedenler

4.2. Makroprolaktin

Makroprolaktin ilk olarak 1974'te Suh ve ark.'ları tarafından tanımlanmıştır (71). Yapısı ve oluşumu tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli görüşler ileri sürülmüştür (72). Hattori ve ark.'larının idiyopatik hiperprolaktinemi olan hastaların bazılarının serumunda, anti-PRL antikorlarını göstermesi ile makroprolaktin molekülünün, immunglobulin G ile kompleks yapmış monomerik PRL'den oluşan bir makromolekül kompleksi olduğu anlaşılmıştır (73).

Genel popülasyonda kadınlarda %0.2, erkeklerde %0.02 oranında makroprolaktin tespit edilmiştir (74). Buna karşın yakın zamanda yapılan çalışmada makroprolaktinemi oranı %3.68 ve cinsiyetler arasında fark olmadığı bildirilmiştir (65). Hiperprolaktinematik popülasyonda yapılan birçok çalışmada ise makroprolaktinemi oranı %15-35 arasında rapor edilmiştir (75,76).

İmmunglobulin G'ye bağlı prolaktinin dolaşımdan uzaklaştırılması serbest prolaktine göre daha yavaştır. Muhtemelen molekül büyüklüğü ve/veya net yükündeki değişiklikler nedeniyle makroprolaktin böbrek bariyerini geçememekte ve klirensi gecikmekte, aynı nedenle hipotalamusa geçemediğinden yüksek prolaktin düzeyleri ile tetiklenen hipotalamik negatif feed back mekanizması işlememekte ve sonuçta hiperprolaktinemi ortaya çıkmaktadır (77).

Makroprolaktinin biyolojik aktivitesi PRL'e göre daha düşüktür. Bunun sebebi molekülün büyüklüğü nedeni ile bu kompleksin kapiller membrandan geçip prolaktin reseptörlerine ulaşılmasının güç olmasıdır. Böylece hiperprolaktinemi klinik semptomlarını göstermez.

Prolaktin ölçümünde kullanılan yöntemler normal monomerik prolaktin ölçümü için uygun yöntemlerdir. Makroprolaktin varlığında çapraz reaksiyon nedeni ile farklı yöntemlerde, farklı derecelerde hatalı yükseklikler ortaya çıkar (78). Makroprolaktin ölçümü için altın standart yöntem jel filtrasyon kromatografisidir ancak bu yöntem zaman alıcı ve pahalıdır (78). Günümüzde sıklıkla makroprolaktin tayininde spesifikliğı düşük olmasına karşın kolay ve ucuz olduğundan polietilen glikol (PEG) ile çöktürme yöntemi kullanılmaktadır.

4.3. Prolaktin ve İmmün Sistem

Prolaktinin genel olarak laktojenik ve mammotrofik etkilerinin üzerinde durulmasına karşın, yapılan çalışmalarda immün sistem üzerinde önemli etkilerinin olduğu, gerek humoral gerekse hücreyel immüniteyi uyardığı kabul edilmektedir (79). HLA antijenlerinin PRL gibi 6. kromozomda yer alması PRL'in immün sistem ile bağlantısını desteklemektedir. PRL reseptörü natural killer hücreleri, B ve T lenfositler üzerinde gösterilmiştir. PRL reseptör ailesindeki sitokin reseptörleri granülosit- koloni uyarıcı faktör (G-CSF), eritropoetin, interlökin (IL)-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, interferon- γ , α ve β reseptörlerdir. Ligandlar arası değişim nedeni ile bu maddeler birbirlerinin reseptörlerine bağlanabilirler. Bu da yüksek prolaktin düzeylerinin immüniteyi hem stimüle etmesini hem de inhibe etmesini açıklar (80).

Prolaktin fizyolojik üst sınırlarda granülosit monosit koloni-uyarıcı faktör (GM-CSF) ile birlikte, antijen sunan HLA-DR ekspresyonunu indükler. Th1 hücre farklılaşmasını sağlar. Ancak her zaman Th1 hücre profiline yol açmaz. Gebelikte paradoksal olarak, Th2 sitokin fenotipi ile hiperprolaktineminin bir arada görülmesi, immün cevap üzerinde, PRL'in doz bağımlı etkileri olduğunu düşündürmüştür. PRL'in hafif yüksekliğı veya üst fizyolojik sınırları immün cevabı aktive ederken, yüksek konsantrasyonlarının ise devam etmekte olan immün cevabı baskıladığı bilinmektedir (81).

B lenfosit ve antikor üretiminin uyarılması, T supresör lenfosit fonksiyonlarının inhibisyonu, T hücrelerinin makrofaj aktive edici faktör üretiminin desteklenmesi ile T ve B lenfosit gelişiminin düzenlenmesi PRL'in bilinen immünomodülatör özellikleri arasındadır (80).

Sıçanlarda yapılan çalışmada siklosporin A verildiğinde PRL düzeyinin 4 kat arttığı görülmüş ve ilacın immünsüpresif etkisinin T ve B lenfositler üzerindeki PRL'in immünsüpresif etkisinden kaynaklandığı düşünülmüştür (82,83).

4.4. Prolaktin ve Atheroskleroz

Atheroskleroz kronik inflamatuvar bir süreçtir ve prolaktinin de inflamatuvar cevabın bir komponenti olduğu gösterilmiştir. Son çalışmalar prolaktinin atherojenik fenotipe katkıda bulunduğunu göstermiştir (84) Bu da; hiperprolaktineminin erken evre inflamasyonda olduğu gibi bozulmuş endotelial disfonksiyon ve azalmış insülin duyarlılığı ile birliktelik göstermesine dayandırılmaktadır (85). Ek olarak hala fizyolojik sınırlar içerisinde olan yüksek prolaktin düzeylerinin kardiyovasküler hastalık risk faktörü olan arteriyel kan basıncı ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur (86). En önemlisi de prolaktinin 10 yıllık kardiyovasküler mortaliteyi öngörmede risk skoru ile korele olduğu gösterilmiştir (87). Reuwer ve ark.'ları (84) çalışmalarında prolaktinin reseptörlerini aktive ederek direkt aterosklerozu etkileyebileceği hipotezini öne sürmüşler ve prolaktin reseptör izoform mRNA'larını karotid atherosklerotik plakta tespit ederek, özellikle de atherosklerotik plağın en önemli inflamasyon bölgesi olan makrofajlarda mevcut olduğunu göstermişlerdir.

Koroner arter hastalığı gelişme riski ile prolaktin ilişkisini araştıran Reuwer ve ark.'ları (88) diğer bir çalışmalarında prolaktin düzeylerinin kontrol grubu ile koroner arter hastalığı gelişen grup arasında anlamlı farklılık göstermediğini bulmuşlardır. Bu bulgu, atherosklerotik plakta prolaktin reseptörlerinin bulunmasına rağmen genel popülasyonda prolaktin yüksekliğinin koroner arter hastalığını öngörmede yetersiz kaldığı şeklinde yorumlanmıştır.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada premenopozal kadınlarda hiperprolaktinemi ile erken atheroskleroz gelişiminde risk faktörleri olan vücut kitle indeksinde artış, dislipidemi, sistolik ve diastolik kan basıncı arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. HDL hariç tüm parametreler ile prolaktin arasında pozitif korelasyon bulunurken, sadece diastolik kan basıncı ile olan ilişkinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir (89).

4.5. Kitotriozidaz ve Prolaktin İlişkisi

Makrofaj lizozomlarında çeşitli hastalıklarda meydana gelen birikimler bu hücrelerin aktivasyonuna yol açarak, aşırı miktarda CHIT sentez ve salınımına ve sonuçta serum CHIT düzeylerinde/aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Benzer olarak TNF- α , lipopolisakkarit ve prolaktin makrofajlardan; GM-CSF ise hem makrofaj hem de nötrofillerden CHIT salınımını uyarırlar (25).

Malaguarnera ve ark. yaptıkları çalışmada in vitro koşullarda insan monosit makrofajlarına kültür ortamında 25 ng prolaktin uygulayarak maksimum 4 saat içinde CHIT gen ekspresyonunu up-regüle ettiğini göstermişlerdir (90). Rosa ve ark. (91) prolaktine cevap olarak CHIT uyarımının sinyal yolunu tespit etmişlerdir. Prolaktin'in CHIT ekspresyonunu protein tirozin kinaz (PTK), fosfatidil inositol 3 kinaz (PI3-K), mitojen aktive kinazlar (MAPK) ve transdüksiyon komponentleri sinyalleri ile up-regüle ettiğini saptamışlardır. Çalışmada çeşitli PTK ve PI3-K inhibitörleri ile prolaktin aracılı CHIT indüksiyonunda azalma olduğu da gösterilmiştir.

Prolaktin ve CHIT ilişkisi ile ilgili in vivo çalışmalar bulunmamaktadır. Yalnızca yakın zamanda yapılan bir klinik çalışmada Alanbay ve ark.'ları (92) polikistik over sendrom (PCOS)' lu hastalarda CHIT aktivitesi ile biyokimyasal parametreler arasındaki korelasyonu değerlendirmişler ve bu parametreler içinde prolaktin ile CHIT arasında anlamlı olmayan bir negatif korelasyon bulmuşlardır.

Bu çalışmada bir makrofaj aktivasyon belirteci olarak tanımlanan CHIT enzimini yine bir immün sistem üzerinde modülatör etkileri olan prolaktin ile birlikte değerlendirmeyi ve aynı zamanda inflamatuvar bir süreç olan atheroskleroz ile olan ilişkilerini belirlemeyi amaçladık. İn vitro olarak

prolaktinin CHIT gen ekspresyonunu arttırdığına yönelik çalışmalar olmasına karşın in vivo çalışmalar henüz yapılmamıştır. Çalışmada CHIT ve prolaktin ilişkisinin incelenmesi amacıyla hiperprolaktinmik hastalar kontrol grubu ve makroprolaktinmik hastalarla karşılaştırıldı. Ayrıca hiperprolaktinemide atheroskleroz ile oksidan-antioksidan mekanizmaların ilişkisini incelemek amacıyla lipit profili, lipit peroksidasyon belirteci olarak MDA ve TAK değerlendirildi.

GEREÇ VE YÖNTEM

1. Gereç

1.1. Olgular ve Örnek Toplanması

Bu çalışmaya Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Bilim Dalı'nda takip ve tedavi edilen; hiperprolaktinematik 85 kadın ve 36 erkek olmak üzere 121 olgu ile kontrol grubu olarak prolaktin değeri normal olan 37 kadın ve 17 erkek olmak üzere 54 olgu alındı. Etik kurul onayından sonra çalışmaya katılanlar bilgilendirildi ve onamları alındı (Uludağ Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik kurulu, 02.07.2013, karar no: 2013-12/8).

Hiperprolaktinematik grup; kadınlarda referans aralığının üst sınırı olan 29.93 ng/mL, erkeklerde 18.12 ng/mL ve üzerinde olanlardan oluşturuldu. 121 hiperprolaktinematik olgudan 21 olguda PEG presipitasyonu sonrası ölçülen prolaktin oranı (Oran hesabı: PEG presipitasyonu sonrası ölçülen prolaktin/ PEG presipitasyonu öncesinde ölçülen prolaktin x 100) %40'tan düşük bulundu ve bu olgular makroprolaktinemiye bağlı hiperprolaktinemi olarak ayrı bir grubu oluşturdu.

Hiperprolaktinematik grup 47 prolaktinoma–adenom tanılarıyla takipte olan, 27 prolaktinoma-adenom nedeniyle opere olan ve 47 nonspesifik hiperprolaktinematik kişilerden oluşmaktaydı. Kontrol grubu 29 adenom-mikroadenom nedeniyle opere olup takiplerinde normal-stabil olan ve 25 nonspesifik nedenlerle başvuran olgulardan oluşmaktaydı. Hipofiz adenomu dışında malignitesi olan ve gebeliği olan olgular çalışma dışı bırakıldı.

Çalışmaya katılanlardan jelli tüplere (Becton Dickinson, ABD) alınan kan örnekleri 1800 xg'de 5 dakika santrifüj edilip serum örnekleri porsiyonlara ayrıldı ve biriktirilerek çalışılmak üzere - 80 °C'de saklandı.

1.2. Cihazlar

1. Fluoroskan Ascent FL microplate florometre luminometre (Thermo Scientific, ABD)

2. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı (Shimadzu LC, Almanya) ve C 18 HPLC kolonu (Machereil-Nagel, Almanya)
3. Architech C8000, C16000 otoanalizörler (Abbott, ABD)
4. Flashscan S12 microplate okuyucu (Analytik Jena, Almanya)
5. NF 1200R Santrifüj (Nüve, Türkiye)
6. Karıştırıcı (vorteks) (Heidolph, Almanya)
7. BM 302 Su banyosu (Nüve, Türkiye)
8. EN 400 Etüv (Nüve, Türkiye)
9. Otomatik pipetler (Ependorf, Almanya)
10. Derin dondurucu (-80 °C) (Sanyo, Japonya)
11. PJ 3000 Tartı (Mettler, İsviçre)
12. HI8114 pH metre (Hanna Instruments, ABD)

1.3. Ticari Kitler

1. Human Chitinaz-1 (Chitotriosidase) ELISA kiti (Cusabio, Çin)
2. TAK kiti (Randox, İngiltere)
3. sdLDL kiti (Randox, İngiltere)
4. Total kolesterol kiti (Abbott, ABD)
5. HDL kolesterol kiti (Abbott, ABD)
6. Trigliserit kiti (Abbott, ABD)
7. Glukoz kiti (Abbott, ABD)

1.4. Kimyasal Malzemeler

1. Sitrik asit ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) (Merck, Almanya)
2. Di-sodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) (Merck, Almanya)
3. Disodyum karbonat (Na_2CO_3) (Merck, Almanya)
4. Sodyum hidrojen karbonat ($NaHCO_3$) (Merck, Almanya)
5. 4- methylumbelliferyl- β -D-N,N,N-triacetylchitotriose (Sigma, ABD)
6. 4-methylumbelliferone (Sigma, ABD)
7. Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma, ABD)
8. Metanol (HPLC grade) (Merck, Almanya)
9. Sodyum hidroksit (Merck, Almanya)
10. Orto-fosforik asit (Merck, Almanya)
11. 2-Tiyobarbitürik asit (>%98) (Sigma, ABD)

12. Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4) (Merck, Almanya)
13. Sodyum fosfat dibazik (Na_2HPO_4) (Merck, Almanya)
14. 1,1',3,3'Tetrametoksiopropan (Aldrich Chemistry, Çin)
15. Polietilen glikol 6000 (PEG) (Merck, Almanya)

2. Yöntemler

2.1. Florometrik Kitotriozidaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

Serum CHIT enzim aktivitesi ölçümünde Guo Y. ve ark'nın (93) florometrik yöntemi referans alınarak modifiye edildi.

2.1.1. Prensip

Bu yöntemde, sentetik kitinaz substratı olan 4-metilumbeliferil- β -D-N,N,N-triasetilkitotriozun serumdaki CHIT ile inkübasyonu sonrasında hidrolizi sonucu oluşan 4-metilumbelliferonun alkali ortamda verdiği floresansın şiddeti florometrede ölçülerek (eksitasyon 355 nm, emisyon 460 nm) serum CHIT aktivitesi tayin edildi.

2.1.2. Reaktiflerin Hazırlanması

1) Sitrat-fosfat tamponu: 2.1 g sitrik asit 50 mL deiyonize su ile çözülerek 0.2 M sitrik asit çözeltisi hazırlandı. İkinci bir temiz kapta 7.16 gr disodyum hidrojen fosfat 50 mL deiyonize suda çözülerek 0.4 M di-sodyum hidrojen fosfat çözeltisi hazırlandı. 23.3 mL sitrik asit çözeltisine yaklaşık 26.7 mL disodyum hidrojen fosfat çözeltisi eklenerek pH 5.2'ye ayarlandı. Son hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı.

2) Karbonat tamponu: 26.5 g disodyum karbonat 250 mL deiyonize su ile çözülerek 1 M disodyum karbonat çözeltisi hazırlandı. İkinci bir kapta 4.2 g sodyum hidrojen karbonat 50 mL deiyonize suda çözülerek 1 M sodyum hidrojen karbonat çözeltisi hazırlandı. 225 mL disodyum karbonat çözeltisine yaklaşık 25 mL sodyum hidrojen karbonat çözeltisi eklenerek pH 10.7'ye ayarlandı. Son hacim deiyonize su ile 500 mL'ye tamamlandı.

3) Substrat: 1 mg 4-methylumbelliferyl- β -D-N,N,N-triacetylchitotriose kendi vialinde 1.284 mL DMSO ile çözüldü ve 0.990 mM stok substrat elde edildi. Stok substrat 6 porsiyona ayrılarak -20 °C'de saklandı. 0.2 mL stok

substrata 0.4 mL DMSO ve 8.4 mL sitrat fosfat tampon eklenerek 9 mL 22 μ M konsantrasyondaki çalışma substratı elde edildi. Çalışma substratı da porsiyonlanarak -20 °C'de saklandı. Substrat hazırlanırken ve saklanırken ışıktan korundu.

4) Standart: 500 mg 4-methylumbelliferon tartılıp 100 mL metanolde çözüldü ve stok standart elde edildi (C=28.38 mM). Stok standarttan 1 mL alıp karbonat tampon ile 100 mL'ye tamamlandı (C=283.8 μ M). Bu çözültiden 3.52 mL alınarak karbonat tampon ile 10 mL'ye tamamlandı (C=100 μ M). Bu standarttan seri dilüsyonlarla 1000 nM, 500 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 5 nM ve 1 nM konsantrasyonlarda 7 tane standart hazırlandı. Standartlar hazırlanırken ve saklanırken ışıktan korundu.

2.1.3. Çalışma

Standartlar ve serum örnekleri kuyucuklara 10 μ L, kör kuyucuğuna da 10 μ L distile su pipetlendi, takiben kuyucuklara 100 μ L çalışma substratı eklendi ve 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 120 μ L karbonat tampon ilave edildi ve floresansı ölçüldü (Eksitasyon 355 nm, emisyon 460 nm). Tablo 2'de çalışma protokolü özetlenmiştir.

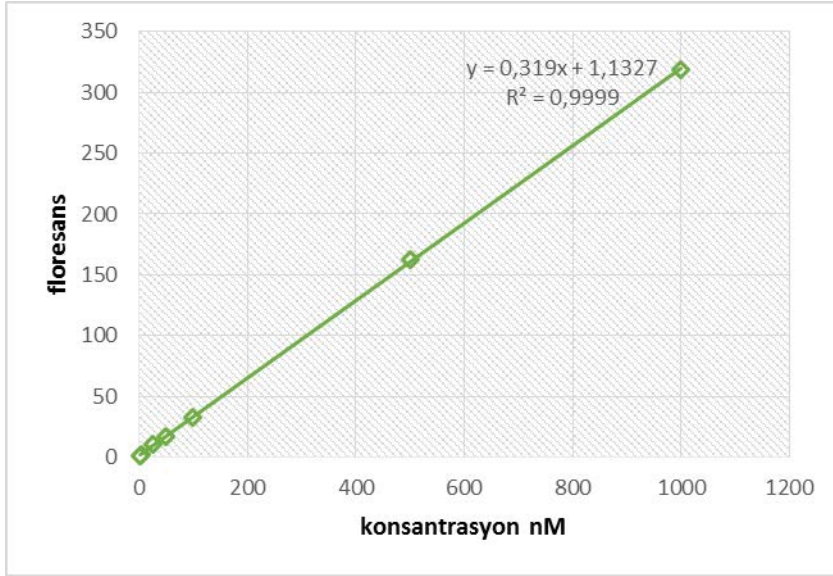
Tablo-2: Serum kitotriozidaz aktivitesi florometrik ölçüm protokolü.

	Numune	Standart	Kör
	10 μ L serum	10 μ L standart	10 μ L distile su
Çalışma substratı	100 μ L	100 μ L	100 μ L
37 °C'de 1 saat inkübe edilir			
Karbonat tampon	120 μ L	120 μ L	120 μ L
Eksitasyon 355 nm, emisyon 460 nm 25 nm slit aralığında floresans ölçümü			

Standartlar kullanılarak oluşturulan standart eğri grafiğinden örneklerdeki CHIT aktivitesi sonucu açığa çıkan 4-metilumbelliferon

konsantrasyonu tayin edildi ve enzim aktivitesi 1 saatte oluşan ürün konsantrasyonu olarak ifade edildi (nmol/mL/saat).

1-1000 nM konsantrasyon aralığında hazırlanan 4-metillumbelliferon çalışma standartları ile yöntemin doğrusallığı incelendi ve bu aralıkta yöntemin doğrusal olduğu tespit edildi (Şekil 3).



Şekil-3: Serum kitotriozidaz aktivitesi ölçümü doğrusallık grafiği

Serum CHIT ölçüm yöntemine ait tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları Tablo-3'te gösterilmektedir.

Tablo-3: Serum kitotriozidaz aktivitesi ölçüm yöntemine ait tekrarlanabilirlik sonuçları

Ölçüm no	Aktivite (nmol/mL/saat)
1	146.7
2	162.8
3	164.8
4	156.7
5	167.3
6	171.7
7	168.9
8	147.2
9	152.5
10	161.7
Ortalama	160
Standart sapma	8.9
% CV	5.55

2.2. Serum Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü

Serum MDA düzeyi ölçümü Young ve ark.'nın (94) tanımladığı yöntemle yapıldı.

2.2.1. Prensi

Yöntem tiyobarbitürik asit (TBA) ile lipit peroksidasyonu son ürünü olan MDA'nın asidik ortamda yüksek ısının etkisi ile pembe renkli bir kompleks oluşturması prensibine dayanır. Analiz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı ile yapıldı. Serum MDA analizinde aşağıdaki özellikler kullanıldı.

2.2.2. Reaktiflerin Hazırlanması

1) TBA: 0.6 g tartılıp 100 mL distile suda çözülerek 0.44 M çözelti elde edildi.

2) Fosfat Tamponu: KH_2PO_4 'tan 3.402 g tartılıp 1 L distile suda çözüldü. Na_2HPO_4 'tan 1.775 g tartılıp 500 mL distile suda çözüldü. Bu iki çözelti sırasıyla 7:3 oranında karıştırılarak 25 mM fosfat tampon elde edildi.

3) Fosforik Asit: %85'lik fosforik asitten 4.15 mL alınarak distile su ile 100 mL'ye tamamlandı ve 0.36 M konsantrasyonda çözelti elde edildi.

2.2.3. Çalışma

Bu yöntemde mobil faz 1:1 metanol (HPLC grade) ile 25 mM fosfat tamponundan (pH: 6.5) oluşmakta olup akış hızı 0.8 mL/dk olarak ayarlandı. Dedektör dalga boyu 532 nm'dir.

Kör, numune ve standart tüplerinin her birine 500 μL 0.36 M fosforik asit, 500 μL 0.44 M TBA, 900 μL distile su ve sırasıyla 100 μL distile su, serum ve standart eklendi. Reaksiyon karışımı 100 °C' de 1 saat su banyosunda inkübe edildikten sonra 10 dk 4°C'de soğutuldu. Bu reaksiyon karışımından 400 μL alınarak üzerine 720 μL metanol (HPLC grade) ve 80 μL 1 M sodyum hidroksit eklendi. 1500 xg'de 10 dk santrifüj edildikten sonra supernatandan 50 μL alınarak kolona enjekte edildi. Tablo 4'de çalışma protokolü özetlenmiştir.

Tablo-4: MDA çalışma protokolü

	Numune	Standart	Kör
Distile su	900 μL	900 μL	900 μL
Fosforik asit	500 μL	500 μL	500 μL
	100 μL serum	100 μL standart	100 μL distile su
TBA	500 μL	500 μL	500 μL
100 °C' de 1 saat su banyosunda inkübe edilip, 4 °C'de soğutuldu.			
Reaksiyon karışımı	400 μL	400 μL	400 μL
Metanol	720 μL	720 μL	720 μL
NaOH	80 μL	80 μL	80 μL
1500 xg'de 10 dk santrifüj edildikten sonra süpernatandan 50 μL alınarak HPLC'ye enjekte edildi.			

MDA: malondialdehit, TBA: tiyobarbitürik asit, NaOH: sodyum hidroksit

Standart eğri grafiği, 0.5, 1, 2, 4 ve 6 nmol/mL'lik konsantrasyonlarda hazırlanan 1,1',3,3'-tetrametoksipropan ile çalışarak oluşturuldu. Yaklaşık 4.5 dakikada oluşan MDA pikinin alanına karşılık gelen değer standart eğri grafiğinden hesaplandı ve serum MDA düzeyi nmol/mL şeklinde ifade edildi.

2.4. Kitotriozidaz ELISA Kiti ile Kütle Ölçümü

Kitotriozidaz kütle ölçümü Cusabio marka Human Chitinase (Chitotiosidase) ELISA kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

Ölçüm için kullanılan kantitatif sandviç enzim immün ölçüm tekniğinde CHIT'a spesifik antikora kaplı kuyucuklara numune, standart ve kör pipetlendi, 2 saat 37 °C'de bekletilerek antikora bağlanma gerçekleşti. Bağlı olmayanlar uzaklaştırıldıktan sonra CHIT'a spesifik biyotinle konjuge edilmiş antikor eklendi, 37 °C'de 1 saat bekletildi. Yıkama yapılarak avidinle konjuge edilmiş peroksidaz ilave edildi, 37 °C'de 1 saat bekletildi ve yıkama ile avidin-enzim ayırıcına bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldı. Kuyucuklara substrat ilavesi ile ilk adımda CHIT bağlanma miktarları ile orantılı olarak renklenme meydana getirildi ve 15 dk sonra stop solüsyonla reaksiyon sonlandırılarak oluşan absorbanslar 450 nm'de okundu. Oluşturulan standart eğri grafiğinden değerlendirme yapılarak pg/mL olarak sonuçlar hesaplandı.

2.5. Prolaktin ve Makroprolaktin Ölçümü

Prolaktin Architech C16000 cihazında Abbott marka kit kullanılarak kemilüminesan mikropartikül immünolojik ölçüm (CMIA) yöntemiyle tayin edildi.

Makroprolaktin PEG ile çöktürme yöntemi kullanılarak ölçüldü (78). 300 µL serum örneğine 300 µL %25'lik PEG eklendi ve vorteks ile karıştırıldı. Hemen sonra 1800 xg hızında 30 dk santrifüj edildi. Süpernatant ayrıldı ve prolaktin analizi yapıldı. Sonuçlar, yapılan 1:1 oranındaki dilüsyondan dolayı 2 ile çarpıldı. Bu değer PEG ile muamele edilmeden ölçülen serum prolaktini ile oranlanarak PEG-presipitasyonu sonrası süpernatanda kalan prolaktin oranı hesaplandı. %60 ve üzeri değerler gerçek hiperprolaktinemi, %40-%60 arası olanlar şüpheli ve %40'ın altındaki değerler makroprolaktinemi olarak değerlendirildi.

2.6. Lipit Profili ve Glukoz Ölçümü

Serum lipit profili ve glukoz Architech C8000 cihazında Abbott marka kitler kullanılarak ölçüldü. Serum glukoz düzeyi enzimatik (Hekzokinaz) yöntemle, total kolesterol (TK) ve TG düzeyleri enzimatik hidroliz yöntemi ile, HDL-kolesterol düzeyi ise enzimatik eliminasyon yöntemi ile ölçüldü. LDL-kolesterol düzeyleri Friedewald formülü ile hesaplandı (95).

$$\text{LDL-K (mg/dL)} = \text{Total Kolesterol} - (\text{HDL-K} + \text{TG} / 5)$$

2.7. Atherojenik İndeks Hesaplanması

Atherojenik indeks (Aİ) TG (mmol/L) / HDL-kolesterol (mmol/L) oranının logaritması alınarak hesaplandı (96). Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen veriler temelinde Aİ < 0.11: düşük risk, 0.11-0.21: orta risk ve > 0.21 ise yüksek risk olarak değerlendirildi (97, 98).

2.8. Küçük Yoğun LDL-Kolesterol (sdLDL-K) Ölçümü

Küçük yoğun LDL-K ölçümü Architech C8000 cihazında Randox marka sdLDL-K kiti ile gerçekleştirildi. Bu yöntem 2 aşamadan oluşmaktadır ve özgün sürfaktan ve enzimlerin lipoproteinlerin belli gruplarıyla seçici olarak reaksiyona girmesi temeline dayanmaktadır. İlk aşamada sdLDL dışındaki lipoproteinler (şilomikronlar, VLDL, IDL, LDL, HDL) 1. ayıraç içindeki sürfaktan ve sfingomyelinaz tarafından ayrıştırılır. Açığa çıkan kolesterol enzimatik reaksiyonlarla su ve oksijene kadar parçalanır. İkinci aşamada 2. ayıraç içinde bulunan başka bir sürfaktanla sadece sdLDL'den kolesterol açığa çıkarılarak enzimatik reaksiyona sokulur. Oluşan hidrojen peroksit 2. ayıraçtaki peroksidaz ile reaksiyon vererek mor-kırmızı bir renk oluşturur. Oluşan rengin absorbanı 548 nm'de okunarak sdLDL-K konsantrasyonu mg/dL olarak hesaplandı.

2.9. Total Antioksidan Kapasite Ölçümü

Total antioksidan kapasite Architech C8000 cihazında Randox marka Total Antioksidan Kapasite (TAK) kiti ile çalışıldı. Kullanılan kolorimetrik yöntemde 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat) (=ABTS), peroksidaz (metmiyoglobin) ve H₂O₂ ile ABTS^{•+} radikaline okside edilir, oluşan mavi-yeşil rengin absorbanı 600 nm'de tayin edilir. Örnekteki antioksidan miktarı arttıkça oluşan renk azalmaktadır. Sonuçlar mmol/L olarak hesaplandı.

3. İstatistiksel Analiz

Normal dağılıma uygunluk gösteren sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler ortalama \pm standart sapma (SS), normal dağılıma uygunluk göstermeyen sürekli değişkenler için ise ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi. Normal dağılıma uygunluk gösteren değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (ANOVA), normal dağılıma uygunluk göstermeyen değişkenlerin karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayısı ile incelendi. Kategorik verilerin analizinde Fisher-Freeman-Halton testi kullanıldı. İstatistiksel analizler IBM SPSS 20 paket programında yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya 121 hiperprolaktinematik olgu ile kontrol grubu olarak prolaktin değeri normal olan 54 kişi alındı. Çalışmaya alınanlardan 13'ünde (Hiperprolaktinematik grup: 5, makroprolaktin grubu: 2 ve kontrol grubu: 6 kişi) serum CHIT aktivitesi saptanamadı veya çok düşük düzeyde olduğu görüldü ve bu olgular değerlendirme dışında bırakıldı. CHIT aktivitesi saptanmayan olgu oranı %7.4 olarak bulundu. Değerlendirme dışında bırakılan olgulardan sonra hiperprolaktinematik grup 95, makroprolaktinematik grup 19 ve kontrol grubu 48 olgu şeklinde değerlendirmeye alındı. Olguların yaş ortalaması 37 ± 13 olup, %69.7'si kadın, %30,3'ü erkeklerden oluşmaktaydı. Yaş ve cinsiyet dağılımına göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo-5).

Tablo-5: Çalışma gruplarının demografik özellikleri

	Kontrol	H-PRL	M-PRL
N	48	95	19
Yaş (yıl)	39 ± 13	37 ± 13	32 ± 9
Erkek/Kadın	15/33	32/67	5/14
Prolaktin (ng/mL)	10.18 (1.5-28.8)	45.34 ^{a**} (18.8-924.8)	68.84 ^{a**, b*} (23.4-264.2)

Veriler ortama \pm standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi.

H-PRL: Hiperprolaktinematik grup, M-PRL: Makroprolaktinematik grup

^a Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında;

^b Hiperprolaktinematik grup ile karşılaştırıldığında;

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

Tablo-6: Kontrol ve hiperprolaktinematik gruplarda serum glukoz ve lipit parametrelerinin karşılaştırılması

	Kontrol	H-PRL	M-PRL
Glukoz (mg/dL)	85 (65-157)	85 (43-268)	93 (70-117)
TK (mg/dL)	204 ± 47	192 ± 45	186 ± 37
HDL-K (mg/dL)	48.2 ± 10.2	45.0 ± 10.5	46.1 ± 11.0
TG (mg/dL)	104 (45-346)	113 (24-581)	117 (56-241)
LDL-K (mg/dL)	124.2 ± 38.3	120.3 ± 37.0	114.6 ± 31.8
sdLDL-K (mg/dL)	18.3 (8.5-65.3)	24.0 (8.4-97.9)	19.8 (9-39.1)
Atherojenik İndeks	0.040 ± 0.289	0.065 ± 0.304	0.029 ± 0.263

Veriler ortama ± standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi.
H-PRL: Hiperprolaktinematik grup, M-PRL: Makroprolaktinematik grup, TK: Total kolesterol, HDL-K: Yüksek dansiteli lipoprotein-kolesterol, LDL-K: Düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol, TG: Trigliserit, sdLDL-K: Küçük yoğun LDL-kolesterol

Serum glukoz ve lipit parametrelerinin çalışma gruplarında benzerlik gösterdiği gözlemlendi, gruplar arasında bu parametreler bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı bulundu. sdLDL-K düzeyinin hiperprolaktinematik grupta kontrol ve makroprolaktinematik gruplara göre daha yüksek olduğu görüldü, ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı ($p>0.05$). Benzer şekilde atherojenik indeks de hiperprolaktinematik grupta daha yüksek olmakla birlikte gruplar arasında anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Tablo-6).

Kontrol ve hiperprolaktinematik gruplar arasında atherojenik indekse göre yapılan risk sınıflaması açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo-7). Kontrol grubunun %66.7'si, hiperprolaktinematik grubun %54.7'si ve makroprolaktinematik grubun %68.4'ü düşük risk grubunda bulunurken; yüksek riskli grupta bulunma oranları sırasıyla %66.7, %54.7 ve %68.4 idi.

Tablo-7: Gruplarda atherojenik indekse göre yapılan risk sınıflaması

	KONTROL	H-PRL	M-PRL	TOPLAM
Düşük, < 0.11	32 (% 66.7)	52 (% 54.7)	13 (% 68.4)	96
Orta, 0.11-0.21	3 (% 6.2)	12 (% 12.6)	1 (% 5.3)	16
Yüksek, > 0.21	13 (% 27.1)	31 (% 32.6)	5 (% 26.3)	50
TOPLAM	48	95	19	162

Veriler sayı (n) ve yüzde (%) olarak verildi.

H-PRL: Hiperprolaktinematik grup, M-PRL: Makroprolaktinematik grup

Tablo-8: Kontrol ve hiperprolaktinematik gruplarda serum kitotriozidaz düzeylerinin karşılaştırılması

	Kontrol	H-PRL	M-PRL
CHIT kütle (pg/mL)	119.2 (39.2-447.3)	85.9 ^{a**} (30.1-433.9)	118.3 ^{b*} (42.5-238.1)
CHIT aktivite (nmol/mL/s)	124.8 ± 77.7	117.5 ± 75.8	92.1 ± 60.1

Veriler ortama ± standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi.

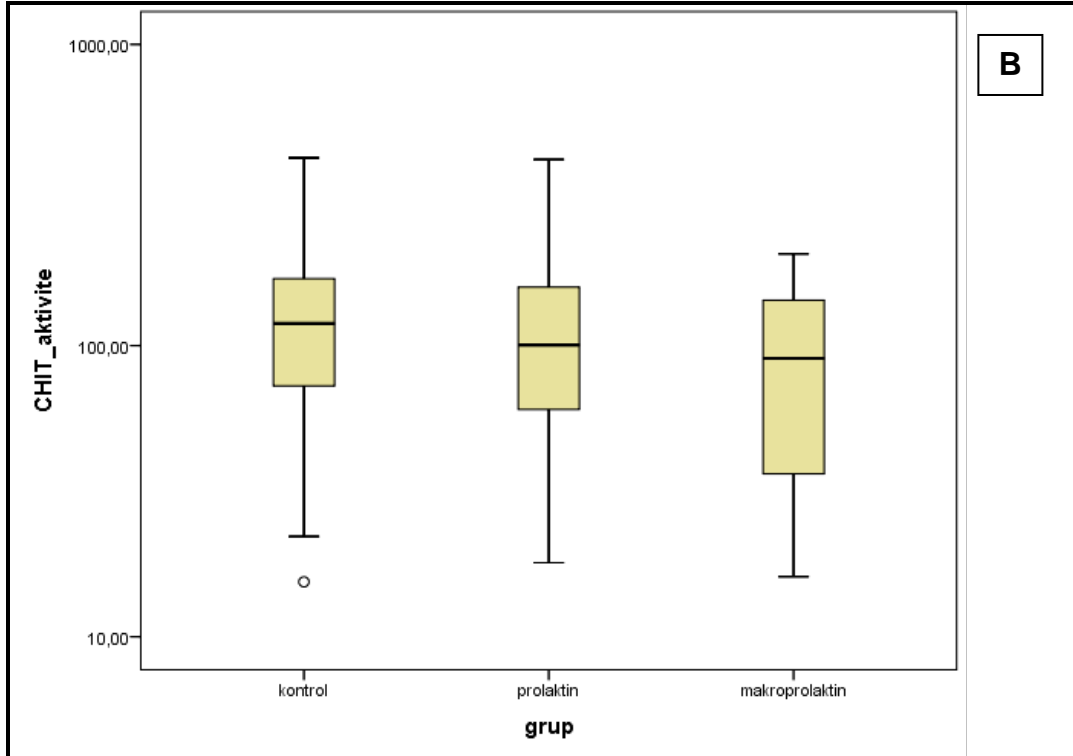
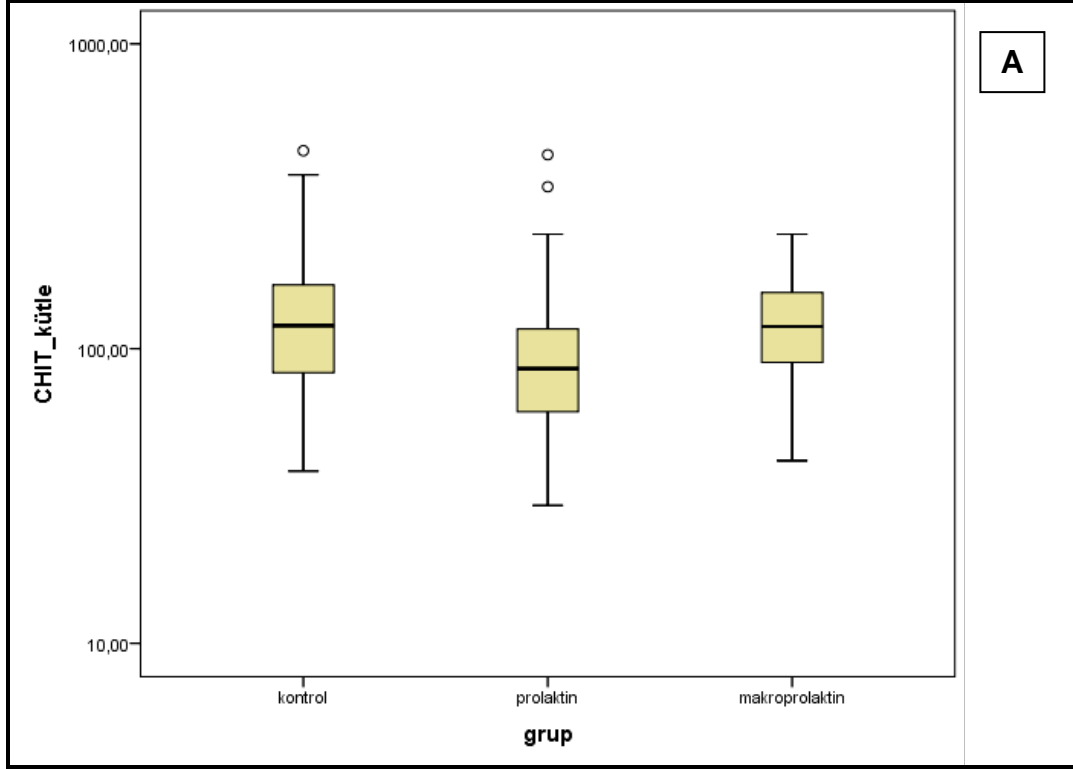
H-PRL: Hiperprolaktinematik grup, M-PRL: Makroprolaktinematik grup, CHIT: Kitotriozidaz

^a Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında;

^b Hiperprolaktinematik grup ile karşılaştırıldığında;

*p<0.05 **p<0.01

Serum CHIT düzeyinin hiperprolaktinemi grubunda (85.9 pg/mL) hem kontrol grubuna (119.2 pg/mL) hem de makroprolaktinematik gruba (118.3 pg/mL) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı (sırasıyla p<0.01 ve p<0.05) şekilde daha düşük olduğu saptandı. Makroprolaktinematik grupta CHIT düzeyinin kontrol grubu ile benzer olduğu gözlemlendi. Serum CHIT aktivitesi bakımından ise kontrol grubunun en yüksek, makroprolaktinemi grubunun ise en düşük ortalamaya sahip olduğu görüldü, ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptandı (Tablo-8, Şekil-4).



Şekil-4: Kontrol ve hiperprolaktinematik gruplarda kitotriozidaz kütle (A) ve aktivite (B) düzeyleri

*Skala logaritmik hazırlanmıştır.

Tablo-9: Kontrol ve hiperprolaktinematik gruplarda serum total antioksidan kapasite ve malondialdehit düzeylerinin karşılaştırılması

	Kontrol	H-PRL	M-PRL
TAK (mmol/L)	0.77 (0.51-1.23)	0.84 (0.53-1.51) ^{a*}	0.88 (0.73-1.26) ^{a*}
MDA (nmol/mL)	1.31 ± 0.52	1.21 ± 1.13	1.31 ± 0.95

Veriler ortama ± standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi.
H-PRL: Hiperprolaktinematik grup, M-PRL: Makroprolaktinematik grup, TAK: Total antioksidan kapasite, MDA: Malondialdehit

^a Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; *p<0.05

Serum total antioksidan kapasitenin hiperprolaktinematik (0.84 mmol/L) ve makroprolaktinematik (0.88 mmol/L) gruplarda kontrol grubuna (0.77 mmol/L) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek olduğu saptandı (Her ikisi için p<0.05). Hiperprolaktinematik ve makroprolaktinematik gruplar arasında TAK bakımından anlamlı farklılık olmadığı görüldü. Serum MDA düzeyinin hiperprolaktinematik grupta kontrol ve makroprolaktinemi grubuna göre daha düşük olmakla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı bulundu (Tablo-9).

Prolaktin, Kitotriozidaz ve Diğer Parametreler Arasındaki İlişkiler:

Çalışma gruplarında parametreler arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon analiziyle gerçekleştirildi ve Tablo-10'da sunuldu.

Serum prolaktin düzeyinin kontrol (r= -0.246) ve makroprolaktinemi (r= -0.274) gruplarında yaşla negatif korelasyon gösterdiği ancak istatistiksel olarak ilişkinin anlamlı olmadığı görüldü. Diğer parametrelerle serum prolaktin düzeylerinin ilişki göstermediği gözlemlendi.

Kontrol ve makroprolaktinemi gruplarında CHIT-kütle ve CHIT-aktivite arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon saptandı (sırasıyla r= 0.363 r= 0.537, p<0.05); hiperprolaktinematik grupta ise bu iki parametre arasındaki ilişkinin ortadan kalktığı görüldü.

Kontrol grubunda hem CHIT-kütle, hem de CHIT-aktivitesinin yaşla anlamlı pozitif ilişki gösterdiği; diğer gruplarda bu ilişkinin olmadığı saptandı.

Ayrıca, yine kontrol grubunda CHIT-kütle ile sdLDL-K ($r= 0.637$, $p<0.01$), LDL-K ($r= 0.418$, $p<0.05$) ve glukoz ($r= 0.405$, $p<0.05$) arasında anlamlı pozitif ilişki olduğu bulundu. Hiperprolaktinematik ve makroprolaktinematik gruplarda CHIT-kütle ile diğer parametrelerin ilişki göstermediği gözlemlendi. CHIT-aktivitesinin ise kontrol grubunda serum TK düzeyi ile ($r= 0.302$, $p<0.05$), makroprolaktinematik grupta serum TG konsantrasyonu ile ($r= 0.558$, $p<0.05$) anlamlı pozitif ilişki gösterdiği saptandı. CHIT-aktivitesi ile sdLDL-K arasında tüm gruplarda pozitif korelasyon olduğu, ancak korelasyonun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı gözlemlendi.

Kontrol grubunda serum MDA düzeyinin TAK ($r= 0.328$, $p<0.05$) ve AI ($r= 0.296$, $p<0.05$) ile anlamlı pozitif; LDL-K ile ($r= -0.346$, $p<0.05$) ise anlamlı negatif korelasyon gösterdiği bulundu. sdLDL-K ile MDA arasında da tüm gruplarda pozitif ilişki olduğu, ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeye erişmediği görüldü.

Kontrol ve hasta gruplarında sdLDL-K'ün AI, glukoz, TK, TG ve LDL-K ile pozitif korelasyonlar gösterdiği bulundu.

Total antioksidan kapasitenin yaşla negatif ilişkili olduğu gözlemlendi, ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeyin kontrol grubunda bulunduğu görüldü ($r= -0.341$, $p<0.05$).

Tablo-10: Kontrol ve hiperprolaktinematik gruplarda parametrelerin ilişkisi

		Prolaktin	CHIT-kütle	CHIT-aktivite	MDA	TAK	sdLDL-K	Atherojenik indeks	Glukoz	TK	HDL-K	TG	LDL-K
Yaş	Kontrol	-0.246	0.285*	0.291*	0.030	-0.341*	0.399*	0.335*	0.171	0.472**	-0.033	0.340*	0.360*
	H-PRL	-0.046	0.071	0.112	0.047	-0.161	0.100	0.130	0.229*	0.199	-0.078	0.063	0.230*
	M-PRL	-0.274	0.019	0.208	0.590**	-0.339	0.546	0.466*	0.063	0.133	-0.530*	0.382	0.191
Prolaktin	Kontrol		-0.162	-0.090	-0.118	-0.033	-0.056	0.026	-0.092	0.095	-0.012	-0.060	-0.020
	H-PRL		0.088	-0.114	-0.139	-0.056	-0.118	0.139	-0.145	-0.004	-0.125	0.051	0.000
	M-PRL		-0.285	-0.186	-0.270	-0.159	-0.127	-0.192	0.077	0.027	0.297	-0.163	-0.008
CHIT-kütle	Kontrol			0.363*	0.137	-0.111	0.637**	0.044	0.405*	0.220	-0.021	0.178	0.418**
	H-PRL			0.081	-0.108	-0.158	-0.112	0.114	-0.018	0.015	-0.075	0.024	0.023
	M-PRL			0.537*	-0.197	0.010	-0.174	0.056	0.005	0.047	-0.023	0.113	0.018
CHIT-aktivite	Kontrol				0.073	-0.031	0.333	0.120	-0.171	0.302*	0.132	0.101	0.252
	H-PRL				-0.001	-0.018	0.154	0.193	0.136	0.042	-0.110	0.159	0.004
	M-PRL				0.108	-0.172	0.489	0.326	-0.008	0.386	0.052	0.558*	0.218
MDA	Kontrol					0.328*	0.304	0.296*	0.039	-0.090	-0.217	0.256	-0.346*
	H-PRL					0.050	0.204	0.029	0.207*	0.020	0.103	0.058	-0.047
	M-PRL					0.161	0.670*	0.137	0.049	0.332	-0.134	0.196	0.357
TAK	Kontrol						-0.027	-0.119	-0.121	-0.273	-0.027	-0.102	-0.338*
	H-PRL						0.119	0.074	0.272*	0.216	0.100	0.137	0.202
	M-PRL						0.099	-0.206	0.280	0.560*	0.247	-0.265	-0.655**
sdLDL-K	Kontrol							0.717**	0.636**	0.778**	-0.186	0.884**	0.409*
	H-PRL							0.680**	0.381*	0.681**	-0.190	0.797**	0.389**
	M-PRL							0.748**	0.395	0.623*	-0.084	0.805**	0.474
Atherojenik indeks	Kontrol								0.217	0.554**	-0.590**	0.875**	0.292
	H-PRL								0.146	0.379**	-0.615**	0.885**	0.185
	M-PRL								0.335	0.220	-0.690**	0.898**	0.154

H-PRL: Hiperprolaktinematik grup, M-PRL: Makroprolaktinematik grup, CHIT: Kitotriozidaz, MDA: Malondialdehit, TAK: Total antioksidan kapasite, sdLDL-K: Küçük yoğun LDL-kolesterol, TK: Total kolesterol, HDL-K: Yüksek dansiteli lipoprotein-kolesterol, TG: Trigliserit, LDL-K: Düşük dansiteli lipoprotein-kolesterol.

İstatistiksel olarak anlamlı olan korelasyon katsayıları (Pearson) **koyu** yazılmıştır, *p<0.05, **p<0.01

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kitotriozidaz insanlarda başlıca aktive olmuş makrofajlar tarafından sentezlenen ve fizyolojik fonksiyonu tam açıklanamamış bir enzimdir. Makrofaj lizozomlarında çeşitli hastalıklarda meydana gelen birikimler bu hücrelerin aktivasyonuna yol açarak aşırı miktarda CHIT sentez ve salınımına ve sonuçta serum CHIT düzeylerinde/aktivitesinde artışa neden olmaktadır. Özellikle Gaucher hastalığı başta olmak üzere çeşitli lizozomal hastalıklarda makrofaj birikiminin ve aktivasyonunun biyokimyasal belirteci olarak kullanılabilir (99).

Çok sayıda klinik ve deneysel çalışmalarla elde edilen bulgular atherosklerozun başlangıcı, gelişmesi ve komplikasyonların oluşmasında inflamasyonun merkezi bir rol oynadığını göstermektedir. Makrofajlar atherogenezin tüm safhalarında yer alır ve atherosklerotik plak oluşumunun göstergeleridir. İnflamasyon var oldukça makrofaj ve lenfositlerin sayısı artar (6).

Atherosklerotik hastalıklarda serum CHIT aktivitesinin yüksek olduğu ve atherosklerotik lezyonun ciddiyeti ile de CHIT aktivitesi yüksekliğinin ilişkili olduğu bildirilmiştir (61,62,99). Boot ve ark. (61) atherosklerotik doku ekstraktlarında CHIT aktivitesinin çok belirgin olarak artmış olduğunu göstermişler ve insan atherosklerotik damar duvarındaki lipit-yüklü makrofajlarla CHIT ekspresyonu arasındaki ilişkiyi açık bir şekilde ortaya koymuşlardır.

Prolaktin ön hipofizdeki asidofil hücreler dışında ekstra-pitüiter olarak endotel hücreleri, nöronlar ve lenfosit, mononükleer hücreler ve timositler gibi immün hücreler tarafından da sentezlenir.

Çeşitli çalışmalar sonucu elde edilen bulgular yüksek düzeylerde ve hatta fizyolojik sınırlardaki prolaktinin atherojenik fenotipe katkıda bulunduğunu düşündürmektedir. Bu bulgu, hiperprolaktineminin bozulmuş endotel fonksiyonu, insülin duyarlılığında azalma ve düşük düzeyde inflamasyonla birlikte oluşu temeline dayandırılmaktadır. Ayrıca fizyolojik

sınırlarda bile olsa yüksek prolaktin düzeylerinin arteriyel kan basıncı ile ilişkili olduğu saptanmıştır (86). Daha da önemlisi 10-yıllık kardiyovasküler mortaliteyi öngörmeye kullanılan risk skoru ile prolaktinin ilişkili olduğu bildirilmiştir (84).

Prolaktin ve CHIT ilişkisi ile ilgili in vivo çalışmalar bulunmamaktadır. Bu çalışmada hiperprolaktinemiye serum CHIT miktarı ve aktivitesi ölçülerek prolaktin, lipid düzeyleri ve oksidatif stres parametreleri ile ilişkileri incelenmiştir.

Çalışmanın çıkış noktası makrofaj aktivasyonunun belirteci olduğu düşünülen CHIT'in in vitro şartlarda prolaktin tarafından indüklendiği (90,91) bulgusunun in vivo şartlarda değerlendirilmesidir. Çalışmada in vitro olarak saptanan bulguyla ters olarak H-PRL grubunda CHIT miktarının (CHIT kütle) anlamlı olarak kontrol grubundan ve M-PRL grubundan daha düşük olduğu bulundu. M-PRL grubunda CHIT miktarının kontrol grubunun değerlerine oldukça yakın olduğu, aralarında farklılık olmadığı gözlemlendi. Bu iki grup arasında benzer CHIT miktarının bulunması makroprolaktinemiye fizyolojik olarak etkili form olan monomerik prolaktin düzeylerinin normal düzeylerde olması ile açıklanabilir (78). H-PRL ve M-PRL grupları CHIT aktivitesi bakımından kontrol grubu ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı görüldü. İnsan monosit-makrofajlarında gerçekleştirilen çalışmada hücreler çeşitli dozlarda ve sürelerle prolaktin ile inkübe edilerek CHIT mRNA düzeyi ve CHIT aktivitesi ölçülmüştür. Prolaktinin 25 ng/mL konsantrasyonda en yüksek CHIT mRNA düzeyine neden olduğu, takip eden dozlarda giderek CHIT mRNA düzeylerinin azaldığı ve 100 ng/mL konsantrasyonda yaklaşık kontrol değerlerine ulaştığı gösterilmiştir. Hücre kültürü ortamına 10 ve 25 ng/mL konsantrasyonlarda prolaktin ekleyerek CHIT aktivitesi zamana bağlı olarak incelenmiş ve maksimum aktivite yüksekliğine 8. saatte ulaşıldığı, takiben aktivitenin azaldığı gösterilmiştir (90). Çalışma grubumuzda olguların prolaktin değerlerinin %45'inin 50 ng/mL düzeyinin altında, %20'sinin 100 ng/mL'nin üzerinde olduğu görüldü. Bu farklı bulgu, in vitro şartların farklılığından kaynaklanabileceği gibi, yüksek dozlardaki prolaktin düzeyleri CHIT ekspresyonunda azalmaya yol açmış olabilir şeklinde de yorumlanabilir.

Bu çalışmada kitotriozidaz kütle ve aktivitesinin kontrol grubunda yaşla pozitif korelasyon gösterdiği; H-PRL ve M-PRL gruplarında bu korelasyonun olmadığı saptandı. Çalışmamızın sonucuyla paralel olarak Kurt ve ark. (100) sağlıklı yaşlı ve gençlerde gerçekleştirdikleri çalışmada yaşlılarda (65-95 yaş) CHIT aktivitesinin gençlerden (20-44 yaş) anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Çeşitli lizozomal hastalıkları olan bireylerin incelendiği başka bir çalışmada da yaşla CHIT artışının ilişkili olduğu rapor edilmiştir (93).

Kitotriozidaz miktarı (kütle ölçümü) ile CHIT aktivitesi arasında kontrol ve M-PRL gruplarında istatistiksel olarak anlamlı pozitif ilişki saptandığı halde H-PRL grubunda bu ilişkinin olmadığı görüldü. Yapılan çalışmalarda CHIT kütlelerinin veya aktivitesinin ölçüldüğü; birlikte her ikisinin değerlendirildiği az sayıda çalışma olduğu görüldü. Bunlardan biri olan çalışmada, Varghese ve ark. sporadik ALS'li hastalarda BOS'da hem ELISA ile kütleli CHIT hem de CHIT aktivitesi çalışmışlar ve kontrol grubuna göre ALS'li hastalarda ELISA değerlerinin 17 kat, aktivite ölçümlerinin de 10 kat yüksek olduğunu bildirmişlerdir (29). Araştırmacılar bu ölçümler için korelasyon analizi bulgusu belirtmemişlerdir.

Daha önce belirtildiği gibi, yapılan çalışmalarda pek çok popülasyonda CHIT enziminin genetik eksikliği saptanmıştır. Türkiye ile birlikte çeşitli Akdeniz bölgesinde yer alan popülasyonların incelendiği bir çalışmada Türkiye toplumunda (n= 95) heterozigot gen defekti %29.5, homozigot gen defekti oranı ise %4.2 olarak bulunmuştur (11). Heterozigot defektli hastalarda enzim düzeyi düşük seyrederken, homozigot defektli hastalarda CHIT enzimine hiç rastlanmamaktadır. Biz de çalışmamızda genetik eksiklik olabileceğini düşündüğümüz çok düşük aktiviteye sahip vakaları değerlendirme dışında bıraktık. CHIT aktivitesi saptanmayan/çok düşük olan ve çalışma dışı bırakılan olgu oranı %7.4 olarak bulundu.

Bu çalışmada bir makrofaj aktivasyon belirteci olarak tanımlanan CHIT, bir immün sistem modülatörü olan prolaktin ile birlikte değerlendirildi ve inflamatuvar bir süreç olan atheroskleroz ile ilişkileri ortaya konmaya çalışıldı. Hiperprolaktinemi ile atheroskleroz ilişkisini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (84-89,101). Reuwer ve ark.'ları (84) çalışmalarında

prolaktinin reseptörlerini aktive ederek direkt atherosklerozu etkileyebileceği hipotezini öne sürmüşler ve prolaktin reseptörünün çeşitli izoformlarını karotid atherosklerotik plakta tespit ederek, özellikle de unstabil atherosklerotik plaklardaki makrofaj lizozomlarında daha belirgin olarak mevcut olduğunu göstermişlerdir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada premenopozal genç kadınlarda hiperprolaktinemi ile erken atheroskleroz gelişiminde risk faktörleri olan vücut kitle indeksinde artış, dislipidemi ve kan basıncı arasındaki ilişkiler araştırılmıştır. Hiperprolaktinemi grubunda serum TK, TG, HDL-K ve LDL-K düzeylerinin ve inflamasyon göstergesi olarak ölçülen plazma fibrinojen konsantrasyonunun kontrol grubuna göre farklılık göstermediği; lipit parametreleri ile prolaktin arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı saptanmıştır. İlgili çalışmada, prolaktin ile sadece diyastolik kan basıncı arasında istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon olduğu bildirilmiştir (89).

Hiperprolaktinemide belirgin dislipideminin bulunmadığı bildirilmiştir (84,89,102). Ancak tedavi ile normoprolaktinemi sağlandığında TK ve LDL-K düzeylerinde anlamlı azalma görüldüğü, bu azalmanın prolaktinden ziyade östradiol veya diğer faktörlerin etkilerine bağlanabileceği belirtilmiştir (89).

Diğer yandan Erem ve ark. (103) yüksek prolaktin düzeyine sahip olan prolaktinomali hastalarda serum TK, LDL-K ve apolipoprotein B düzeylerinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Alanbay ve ark.'ları (92) PCOS'lu hastalarda CHIT aktivitesini inceledikleri çalışmada kontrol grubuna göre hasta grubunda CHIT aktivitesinin belirgin olarak artmış olduğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada hasta grubu ve kontrol grubu arasında prolaktin düzeylerinin benzer olduğu; CHIT aktivitesi ile ne prolaktin ne de serum glukoz ve lipit parametreleri (TK, LDL-K, HDL-K, TG) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı bulunmuştur.

Hiperlipidemisi olan 90 kişi ile yapılan çalışmada lipit düşürücü tedavi öncesi ve tedavi sonrası CHIT aktivitesinin değişmediği saptanmıştır. Aynı

çalışmada CHIT aktivitesi ile TK, TG, LDL-K ve HDL-K arasında korelasyon bulunmadığı bildirilmiştir (99).

Yakın tarihli bir çalışmada endotelial disfonksiyon ve atherojenik risk faktörleri ile ilişkili olduğu düşünülen hiperprolaktinemi ile karotis intima media kalınlığı arasındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmada prolaktinomali hastalarda kontrol grubuna göre serum TG, açlık glukoz, hsCRP ve plazma fibrinojen düzeylerinin anlamlı olarak daha yüksek; TK, HDL-K ve LDL-K düzeylerinin ise farklı olmadığı saptanmıştır. Serum prolaktin düzeyinin TG, hsCRP, fibrinojen düzeyleri ve karotis intima media kalınlığı ile anlamlı pozitif, HDL-K ile ise anlamlı negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur (101).

Hiperprolaktinemi ve inflamasyon ilişkisi bakımından farklı bulgular rapor edilmiştir. Hiperprolaktinemide inflamasyonun olmadığı (89), veya hafifçe yüksek enflamasyon belirteçlerinin (hsCRP, fibrinojen) rapor edildiği çalışmalar mevcuttur (85,101,102).

Bu çalışmada serum glukoz ve lipid parametrelerinin hiperprolaktinemisi olan çalışma gruplarında kontrol grubuna göre farklı olmadığı görüldü. Serum prolaktin düzeyinin hem kontrol hem de hiperprolaktinematik gruplarda CHIT ve lipid parametreleri ile istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki göstermediği saptandı. Bu bulgu normal ve yüksek prolaktin düzeylerine sahip çeşitli gruplarda yapılmış çalışmalarda elde edilen bulgularla paralellik göstermekteydi (89,92). Bir çalışmada yüksek prolaktin düzeyine sahip olgularda prolaktinin TG ile pozitif, HDL-K ile negatif korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (101).

Çalışmamızda CHIT ile glukoz ve lipid parametreleri arasındaki ilişkiler incelendiğinde kontrol grubunda CHIT konsantrasyonu ile sdLDL-K, LDL-K ve glukozun anlamlı pozitif korelasyon gösterdiği bulundu. CHIT aktivitesinin de sdLDL-K ile tüm gruplarda istatistiksel düzeyde olmasa da pozitif ilişki gösterdiği saptandı. Ayrıca CHIT aktivitesinin kontrol grubunda TK, M-PRL grubunda TG ile pozitif ilişkili olduğu görüldü. Bu ilişkilerin incelendiği iki çalışmada serum CHIT aktivitesi ile lipid parametrelerinin korelasyon göstermediği bildirilmiştir (92,99). Bu çalışmalardan birinde hasta ve kontrol gruplarının birlikte değerlendirilerek incelendiği ve grubun yaş

ortalamasının (yaklaşık 27) çalışmamızda yer alan gruptan daha genç olduğu görüldü (92).

Klinik çalışmalarda plazmada sdLDL partiküllerinin artışının kalp-damar hastalıklarının artışıyla birlikte olduğu gösterilmiştir. sdLDL'nin arter duvarına penetrasyonu yüksek, LDL reseptörüne afinitesi düşük, plazma yarı-ömrü uzun ve oksidatif strese direnci düşüktür. sdLDL başlıca büyüklük temeline dayalı olarak ayırımın yapıldığı gradient jel elektroforeziyle tayin edilir. Bundan başka sdLDL-K'ün ölçülmesi de kalp-damar hastalıklarının incelenmesinde kullanışlı bir parametredir. Cho ve ark. 2015'te yayınladıkları çalışmalarında plazma sdLDL-K düzeyinin belirleyicileri olarak hem sağlıklı, hem de metabolik sendromlu olgularda LDL-K, TG, açlık glukoz düzeyi ve bel çevresi olduğunu bildirmişlerdir (104). Bu çalışmada araştırmacıların bulgularına benzer şekilde sdLDL-K ile glukoz, TK, TG ve LDL-K arasında anlamlı pozitif korelasyonlar olduğu saptandı. sdLDL-K ile en yüksek korelasyonun TG ile olduğu görüldü. Belirtilen çalışmada da multiple lineer korelasyon analizinde sdLDL-K konsantrasyonuna olan etkide en büyük katkının TG tarafından yapıldığı rapor edilmiştir. Plazmanın atherojenik indeksi [$\log (TG/HDL-K)$] son 20 yıldır atherosklerozun öngörülmesinde kullanılan ve LDL partikül büyüklüğünü yansıtan (ikisi arasında negatif ilişki bulunur) bir parametredir (105-107). Çalışmamızda AI ile sdLDL-K arasında hem kontrol, hem de hiperprolaktinematik grupta istatistiksel olarak anlamlı korelasyon olduğu gözlemlendi. AI'e göre düşük, orta ve yüksek risk sınıflaması yapılarak olgular incelendiğinde hiperprolaktinematik grupların kontrol grubuna benzer profile sahip olduğu bulundu ve bu bulgu hiperprolaktinematik grupların lipit parametrelerinin de kontrol grubundan farklı olmadığı ile ilişkilendirildi.

Serbest radikal üretiminde artış ve/veya antioksidan savunma kapasitesinde azalma sonucu oluşan oksidatif stres çeşitli endokrin hastalıklarla ilişkili olabilir (108). Yapılan literatür araştırmasında hiperprolaktinemi ve oksidatif stres ilişkisinin incelendiği az sayıda çalışma bulunduğu saptandı. Bunlardan birinde fertil ve infertil olgularda prolaktin ile oksidatif stres ve antioksidanların ilişkisi incelenmiştir. İki grup arasında prolaktin düzeyi bakımından fark olmadığı, infertil grupta serum MDA düzeyinin yüksek, nitrit düzeyinin düşük; antioksidan kapasitenin ise farklı

olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca antioksidan kapasite ile prolaktin arasında pozitif korelasyon saptanmış ve bu veri oksidatif strese cevap olarak antioksidan kapasitenin olduğu şeklinde yorumlanmıştır (109). Diğer bir çalışmada serum prolaktin düzeyi yüksek olan infertilite yakınması olan olgularda kontrol grubuyla kıyaslandığında oksidan parametrelerden olan konjuge çift bağlar ve konjuge dien düzeyleri yüksek, MDA düzeyi düşük olarak bulunmuştur. Antioksidan parametrelerden ise indirgenmiş glutatyon ve retinol düzeyinin anlamlı olarak daha düşük olduğu saptanmıştır (110). Çalışmamızda hem H-PRL, hem de M-PRL gruplarında TAK'nin kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu; serum MDA düzeyleri bakımından farklılık olmadığı görüldü. Çalışmamızda hem H-PRL, hem de M-PRL gruplarında TAK'nin kontrol grubundan anlamlı olarak daha yüksek olduğu; serum MDA düzeyleri bakımından farklılık olmadığı görüldü.

Sonuç olarak bu araştırma ile elde edilen bulgular, *in vitro* olarak prolaktinin CHIT indüksiyonuna yol açtığı yönündeki veriyi desteklememektedir. Hiperprolaktinematik grupta serum CHIT konsantrasyonu makroprolaktinematik gruptan ve kontrol grubundan anlamlı olarak daha düşük olduğu halde, CHIT aktivitesi gruplar arasında farklılık göstermemiştir. Hiperprolaktinematik gruplarda lipit parametrelerinin ve atherojenik indeksin kontrol grubuna göre farklı olmaması hiperprolaktineminin belirgin dislipidemi ile birlikte olmadığı bulgusunu destekler nitelikteydi. Oksidatif stres ve antioksidan kapasite ile hiperprolaktinemi ilişkisinin daha ileri araştırmalarla incelenebileceği görüşüne varıldı.

KAYNAKLAR

1. Eide K, Norberg A, Heggset E et al. Human chitotriosidase-catalyzed hydrolysis of chitosan. *Biochemistry* 2012; 51: 487-95
2. Funkhouser JD, Aronson NN Jr. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. *BMC Evol Biol* 2007; 7: 96-111.
3. Renkema GH, Boot RG, Muijsers AO, Donker-Koopman WE, Aerts JM. Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *J Biol Chem* 1995; 270(5): 2198-202.
4. Aerts JM, Hollak CE, Van Breemen M et al. Identification and use of biomarkers in Gaucher disease and other lysosomal storage diseases. *Acta Paediatr Suppl* 2005; 94(447): 43-6.
5. Hollak CE, van Weely S, van Oers MH, Aerts JM. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest* 1994; 93: 1288-92.
6. Malaguarnera L. Chitotriosidase: The yin and yang. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 3018-29.
7. Boot RG, Renkema H, Strijland A, Van Zonneveld AJ, Aerts JMFG. Cloning of a cDNA encoding chitotriosidase, a human chitinase produced by macrophages. *J Biol Chem* 1995; 270: 26252-6.
8. Renkema H, Boot RG, Strijland A et al. Synthesis, sorting, and processing into distinct isoforms of human macrophage chitotriosidase. *Eur J Biochem* 1997; 244: 279-85.
9. Eijk M, Van Roomen C, Renkema GH et al. Characterization of human phagocyte-derived chitotriosidase, a component of innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1505-12.
10. Boot RG, Renkema GH, Verhoek M et al. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 1998; 273: 25680-5.
11. Piras I, Melis A, Ghiani ME et al. Human CHIT1 gene distribution: new data from Mediterranean and European populations. *J Hum Genet* 2007; 52: 110-6.
12. Boven LA, Van Meurs M, Boot RG et al. Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *Am J Clin Pathol* 2004; 122(3): 359-69.
13. Baughman RP, du Bois RM, Lower EE. Sarcoidosis. *Lancet* 2003; 361: 1111-8.
14. Kanneganti M, Kamba A, Mizoguchi E. Role of chitotriosidase (chitinase 1) under normal and disease conditions. *J Epithel Biol Pharmacol*. 2012; 5: 1-9.
15. Reich JM. Mortality of intrathoracic sarcoidosis in referral vs population-based settings. *Chest* 2002; 121: 32-9.
16. Bargagli E, Bennett D, Maggiorelli C et al. Human chitotriosidase: a sensitive biomarker of sarcoidosis. *J Clin Immunol* 2013; 33: 264-70.

17. Bargagli E, Bianchi N, Margollicci M et al. Chitotriosidase and soluble IL-2 receptor: comparison of two markers of sarcoidosis severity. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 479–83.
18. Bargagli E, Margollicci M, Nikiforakis N et al. Chitotriosidase activity in the serum of patients with sarcoidosis and pulmonary tuberculosis. *Respiration* 2007; 74: 548-52.
19. Bargagli E, Margollicci M, Luddi A et al. Chitotriosidase activity in patients with interstitial lung diseases. *Respir Med* 2007; 101(10): 2176-81.
20. Barone R, Di Gregorio F, Romeo M A, Schiliro G, Pavone L. Plasma chitotriosidase activity in patients with β -thalassemia. *Blood Cells Mol. Dis.* 1999; 15: 1–8.
21. Altarescu G, Rudensky B, Abrahamov A. Plasma chitotriosidase activity in patients with thalassemia. *American Journal of Hematology* 2002; 71: 7–10.
22. Barone R, Simporé J, Malaguarnera L, Pignatelli S, Musumeci S. Plasma chitotriosidase activity in acute Plasmodium falciparum malaria. *Clin Chim Acta* 2003; 331(1-2): 79-85.
23. Sonmez A, Haymana C, Tapan S et al. Chitotriosidase activity predicts endothelial dysfunction in type-2 diabetes mellitus. *Endocr* 2010 ; 37: 455–9.
24. Kabaroğlu C, Onur E, Barutçuoğlu B et al. Inflammatory marker levels in obese adolescents with glucose intolerance: Increased chitotriosidase activity. *Clinical Biochemistry* 2012; 45: 281–4.
25. Kurt İ. Kitotriozidaz: Yeni bir makrofaj/fagosit aktivasyon göstergesi *J LSD* 2011; 3(1): 8-15.
26. Mattsson N, Tabatabaei S, Johansson P et al. Cerebrospinal fluid microglial markers in alzheimer's disease: Elevated chitotriosidase activity but lack of diagnostic utility. *Neuromol Med* 2011; 13: 151–9.
27. Sotgiu S, Piras MR, Barone R et al. Chitotriosidase and alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2007; 4: 295–6.
28. Sotgiu S, Barone R, Arru G et al. Intrathecal chitotriosidase and the outcome of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006; 12: 551–7.
29. Varghese AM, Sharma A, Mishra P et al. Chitotriosidase - a putative biomarker for sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Clinical Proteomics* 2013; 10: 19-27.
30. Uluç K, İşak B, Tanrıdağ T, Us Ö. Als patofizyolojisi: neyi, ne kadar biliyoruz? *Marmara Medical Journal* 2008; 21(1): 102-11.
31. İşman FK, Kacira T, Küçür M et al. Cerebrospinal fluid and serum chitotriosidase levels in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: Preliminary results. *Turkish Neurosurgery* 2007; 17(4): 235-42.
32. Sotgiu S, Barone R, Zanda B et al. Chitotriosidase in patients with acute ischemic stroke. *Eur Neurol* 2005; 54(3): 149-53.
33. Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2006 ; 6(7): 508-19.
34. Zengin H. Ateroskleroz patogenezi. *J. Exp. Clin. Med.* 2012; 29: 101-6.

35. Cordan J, Yeşilbursa D, Güllülü S. Kardiyoloji 1.baskı. Bursa:Uludağ Üniversitesi Basımevi; 2005.
36. Steinberg D. Oksidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997; 95: 1062-71.
37. Parthasarathy S. Low density lipoproteins in atherogenesis. In Wilson PWF. Atlas of atherosclerosis. 2nd ed. Philadelphia; Current Medicine; 2000; 91-109.
38. Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J. Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: Role of extracellular lipid, macrophage and smooth muscle cell content. *BHJ* 1993; 69: 377-81.
39. Stocker R, Keaney JF Jr. Role of Oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381–478.
40. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993 ; 362(6423): 801-9.
41. Başkal N. Lipid Metabolizması Bozuklukları. In Erdoğan G (ed). Koloğlu Endokrinoloji, Temel ve Klinik, 2nd ed. Ankara, MN Medikal&Nobel 2005, 755 – 73.
42. National Cholesterol Education Program. Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *Circulation* 1994; 89:1333 – 445.
43. McKenney JM. Pharmacotherapy of dyslipidemia. *Cardiovasc Drugs Ther* 2001; 15(5): 413-22.
44. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 223-61.
45. Brown G, Albers JJ, Fisher LD et al. Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 1990; 323(19): 1289-98.
46. Sviridov D, Mukhamedova N, Remaley AT, Chin-Dusting J, Nestel P. Antiatherogenic functionality of high density lipoprotein: how much versus how good. *J Atheroscler Thromb* 2008; 15(2): 52-62.
47. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ et al. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation* 1989; 79(1): 8-15.
48. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 1991; 88: 1785-92.
49. Kaplan LA, Pesce AJ, Kamierczak SC. *Clinical Chemistry*, chapter 33, 4th Edition, New York: Mosby Publishers; 2003.
50. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani B, Cantin S. Small dense low-density lipoprotein particles as a predictor of ischemic heart disease in men. *Circulation* 1997; 95: 69-75.
51. Landray MJ, Sagar G, Muskin J et al. Association of atherogenic low density lipoprotein subfractions with carotid atherosclerosis. *Q J Med* 1998; 91: 345-51.
52. Packard CJ. Triacylglycerol- rich lipoproteins and the generation of small, dense low - density lipoprotein. *Biochemical Society Transactions* 2003; 31(5): 1066-9.

53. Onat A, Uğur M, Çiçek G ve ark. TEKHARF 2009 taraması: Kırsal kesim ve kentlerde benzer kardiyovasküler ölüm riski Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol 2010; 38(3): 159-63.
54. Hermans MP, Ahn SA, Rousseau MF. Log(TG)/HDL-C is related to both residual cardiometabolic risk and b-cell function loss in type 2 diabetes males. Cardiovasc Diabetol 2010; 9: 88-97.
55. Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. Türk Biyokimya Dergisi 2006; 31 (2); 51–6.
56. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. Am J Med 1991; 91: 11-2.
57. Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I. Lipid peroxidation cannot be used As a universal criterion Of oxidative Stress. Progres in Lipid Research 2004; 43: 200-27.
58. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. Biochemical Pharmacology 1995; 49: 1341-8.
59. Bustamante J, Guerra L.N, Bredeston J, Mordoh J, Boveris A. Melanin content and hydoperoxide metabolism in human melonoma cells. Exp Cell Res 1991; 196: 172-6.
60. Tuma DJ. Role of malondialdehit- asetaldehit adducts in liver injury. Free Radical Biology & Medicine 2002; 32: 303-8.
61. Boot RG, Van Achterberg TAE, Van Aken BE et al. Strong Induction of Members of the Chitinase Family of Proteins in Atherosclerosis Chitotriosidase and Human Cartilage gp-39 Expressed in Lesion Macrophages Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999; 19: 687-94.
62. Artieda M, Cenarro A, Ganan A ve ark. Serum chitotriosidase activity is increased in subjects with atherosclerosis disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003; 23(9): 1645-52.
63. Artieda M, Cenarro A, Ganan A et al. Serum chitotriosidase activity, a marker of activated macrophages, predicts new cardiovascular events independently of C-reactive protein. Cardiology 2007; 108: 297–306.
64. Karadag B, Kucur M, Isman FK et al. Serum chitotriosidase activity in patients with coronary artery disease. Circ J 2008; 72: 71–5.
65. Kasum M, Oreskovic S, Zec I et al. Macroprolactinemia: new insights in hyperprolactinemia. Biochemia Medica 2012; 22(2): 171–9.
66. Jameson LR. Anterior Pituitary . In J.C. Bennett (ed). Cecil Textbook of medicine. 20th edition. Philadelphia;WB Saunders co: 1996. 1212-5.
67. Becker KL, Kahn CR, Rebar RW. Prolactin and its disorders (chapter 13). Principles and practice of endocrinology and metabolism. 2002; Third edition on cd-rom: 37.
68. Marano RJ, Ben-Jonathan N. Minireview: Extrapituitary prolactin: An update on the distribution, regulation, and functions. Molecular Endocrinology 2014; 28: 622–33.
69. Biller BM. Hyperprolactinemia. Int J Fertil Womens Med 1999; 44: 74–7.
70. Burtis C, Ashwood E, Bruns D. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics 5th edition. St. Louis, USA: Elsevier; 2012.
71. Suh HK, Frantz AG. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. J Clin Endocrinol Metab 1974; 39: 928–35.

72. Yücel N, Eren N, Serin E. Klinik bulgularla uyumsuz prolaktin düzeyleri ve makroprolaktin. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 2007;17(1): 33-9.
73. Hattori N, Ishihara T, Ikekubo K et al. Autoantibody to human prolactin in patients with idiopathic hyperprolactinemia. *J Clinical Endocrinol Metabol* 1992; 75: 1226–9.
74. Bjoro T, Makrid L, Wergerland R et al. Frequency of hyperprolactinemia due to large molecularweight prolactin (150-170 kD PRL) *Scand J Clin Lab Invest* 1995; 55: 139-47.
75. Fahie-Wilson MN, Soule SG. Macroprolactinemia contribution to hyperprolactinemia in a district general hospital and evaluation of a screening test based on precipitation with polyethylene glycol. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 252-8.
76. Suliman AM, Smith TP, Gibney J, McKenna TJ. Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia. *Clin Chem.* 2003; 49(9): 1504-9.
77. Hattori N, Inagaki C. Anti-prolactin (prolaktin) antibodies cause asymptomatic hyperprolactinemia: bioassay and clearance studies of prolaktin-Immunoglobulin G complex. *J Clin Endocrinol-Metab* 1997; 82(9): 3107-10.
78. Shimatsu A, Hattori N. Macroprolactinemia: Diagnostic, clinical, and pathogenic significance. *Clinical and Developmental Immunology Volume* 2012: 107-13.
79. Walker SE, Jacobson JD. Roles of prolactin and gonadotropin-releasing hormone in rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am.* 2000; 26(4): 713-36.
80. Yılmaz F, Ataoğlu H, Tuna M ve ark. Prolaktin ve immün sistem. *Haseki tıp bülteni* 2009; 47(3): 105-9.
81. Matera L, Mori M, Geuna M, Buttiglieri S, Palestro G. Prolactin in autoimmunity and antitumor defence. *J Neuroimmunol.* 2000; 109: 47-55.
82. Chikanza IC, Petrou P, Chrousos G, Kingsley G, Panayi GS. Excessive and dysregulated secretion of prolactin in rheumatoid arthritis: immunopathogenetic and therapeutic implications. *Br J Rheumatol.* 1993; 32(6): 445-8.
83. Russell DH, Larson DF, Cardon SB, Copeland JG. Cyclosporine inhibits prolactin induction of ornithine decarboxylase in rat tissues. *Mol Cell Endocrinol.* 1984; 35(2-3): 159-66.
84. Reuwer AQ, van Eijk M, Houttuijn-Bloemendaal FM et al. The prolactin receptor is expressed in macrophages within human carotid atherosclerotic plaques: a role for prolactin in atherogenesis? *J Endocrinol.* 2011; 208(2): 107-17.
85. Yavuz D, Deyneli O, Akpınar I et al. Endothelial function, insulin sensitivity and inflammatory markers in hyperprolactinemic premenopausal women. *European Journal of Endocrinology* 2003; 149: 187–93.
86. Stumpe KO, Kolloch R, Higuchi M, Kruck F, Vetter H. Hyperprolactinaemia and antihypertensive effect of bromocriptine in

- essential hypertension. Identification of abnormal central dopamine control. *Lancet* 1977; 2: 211–4.
87. Georgiopoulos GA, Stamatelopoulos KS, Lambrinouadaki I et al. Prolactin and preclinical atherosclerosis in menopausal women with cardiovascular risk factors. *Hypertension* 2009; 54: 98–105.
 88. Reuwer AQ, Twickler MT, Hutten BA et al. Prolactin levels and the risk of future coronary artery disease in apparently healthy men and women. *Circ Cardiovasc Genet.* 2009; 2(4): 389-95.
 89. Stojanoska MM, Icin T, Pletikotic I et al. Risk factors for accelerated atherosclerosis in young women with hyperprolactinemia. *Medical Hypotheses* 2015; 84: 321-6.
 90. Malaguarnera L, Musumeci M, Licata F et al. Prolactin induces chitotriosidase gene expression in human monocyte-derived macrophages. *Immunology Letters* 2004; 94: 57–63.
 91. Di Rosa M, Zambito AM, Marsullo AR, Volti GL, Malaguarnera L. Prolactin Induces Chitotriosidase Expression in Human Macrophages Through PTK, PI3-K, and MAPK Pathways. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009; 107: 881–9.
 92. Alanbay İ, Ercan CM, Sakinci M et al. A macrophage activation marker chitotriosidase in women with PCOS: does low-grade chronic inflammation in PCOS relate to PCOS itself or obesity?. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 286:1065–71.
 93. Guo Y, He W, Boer AM et al. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1995; 18: 717–22.
 94. Young IS, Trimble ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem.* 1991; 28 :504-8.
 95. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein-cholesterol in plasma without use of preparative ultracentrifugation. *Clin Chem.* 1972; 18: 499–502.
 96. Dobiasova M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). *Clin Biochem* 2001; 34: 583-8.
 97. Akbas EM, Timuroglu A, Ozcicek A et al. Association of uric acid, atherogenic index of plasma and albuminuria in diabetes mellitus. *Int J Clin Exp Med* 2014; 7(12): 5737-43.
 98. Raslova K, Dobiasova M, Hubacek JA et al. Association of metabolic and genetic factors with cholesterol esterification rate in HDL plasma and atherogenic index of plasma in a 40 years old Slovak population. *Physiol Res* 2011; 60: 785-95.
 99. J. Canudas, A. Cenarro, F. Civeira et al. Chitotriosidase genotype and serum activity in subjects with combined hyperlipidemia: Effect of the lipid-lowering agents, atorvastatin and bezafibrate. *Metabolism* 2001; 50(4): 447-50.
 100. Kurt I, Abasli D, Cihan M et al. Chitotriosidase levels in healthy elderly subjects. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 4: 185-8.

101. Jiang XB, Li CL, He DS et al. Increased carotid intima media thickness is associated with prolactin levels in subjects with untreated prolactinoma: a pilot study. *Pituitary*. 2014; 17(3): 232-9.
102. Serri O, Li L, Mamputu JC et al. The influences of hyperprolactinemia and obesity on cardiovascular risk markers: effects of cabergoline therapy. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 366–70.
103. Erem C, Kocak M, Nuhoglu I et al. Blood coagulation, fibrinolysis and lipid profile in patients with prolactinoma. *Clin Endocrin (Oxf)* 2010; 73(4): 502–7.
104. Cho Y, Lee SG, Jee SH, Kim JH. Hypertriglyceridemia is a Major Factor Associated With Elevated Levels of Small Dense LDL Cholesterol in Patients With Metabolic Syndrome. *Ann Lab Med*. 2015; 35(6) :586-94.
105. Dobiasova M, Frohlich J. The plasma parameter log (TG/HDL-C) as an atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein-depleted plasma (FER(HDL)). *Clin Biochem* 2001; 34: 583-588.
106. Dobiasova M. AIP--atherogenic index of plasma as a significant predictor of cardiovascular risk: from research to practice. *Vnitr Lek* 2006; 52: 64-71.
107. Dobiasova M, Frohlich J, Sedova M, Cheung MC, Brown BG. Cholesterol esterification and atherogenic index of plasma correlate with lipoprotein size and findings on coronary angiography. *J Lipid Res* 2011; 52: 566-71.
108. Kolesnikova LI, Darenskaya MA, Grebenkina LA et al. Gender differences in parameters of lipid metabolism and of level of antioxidants in groups of juveniles-the even and the Europeans. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 2014; 50(1): 34-41.
109. Bhaskar S, Upadhya S, Adiga SK, Kumar PN. Evaluation of oxidative stress, antioxidants and prolactin in infertile women. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 2008; 23(2): 186-90.
110. Kolesnikova LI, Semyonova NV, Grebenkina LA et al. Integral indicator of oxidative stress in human blood. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2014; 157(6): 715-7.

TEŞEKKÜR

Biyokimya ihtisasım boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyerek yetişmemde ve eğitimimde en büyük paya sahip olan her zaman örnek aldığım Prof. Dr. Melahat DİRİCAN'a her konuda desteği, öğrettikleri ve emeği için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Esmâ GÜR'e, değerli hocalarımız Prof. Dr. Asuman TOKULLUGİL'e, Prof. Dr. Engin ULUKAYA'ya, Prof. Dr. Zehra SERDAR'a, Prof. Dr. Yeşim ÖZARDA'ya, Prof. Dr. Emre SARANDÖL'e teşekkürlerimi sunarım.

Bilgisi, deneyimleri, dostluğu, sevecenliği ve her zaman ablalığı ile yanımda olan sevgili Doç. Dr. Arzu YILMAZTEPE ORAL'a, beraber görev yaptığım birbirinden değerli asistan arkadaşlarıma, her daim kahrımızı çeken personellerimize, ayrıca Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez ve Acil Laboratuvarı'nda görevli tüm teknisyen arkadaşlara yardımları ve destekleri için teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Tezimi hazırlamamdaki destekleri için Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Erdinç ERTÜRK'e teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en çok emeği geçen, her daim yanımda olan anneme ve keşke hayatta olup bu günleri görebilseydi dediğim canım babama, bana gerçek birer anne ve baba olan kayınvalidem ve kayınpederime, hiçbir zaman sevgi ve desteğini esirgemeyen eşim Volkan Tüysüz'e, mutluluk kaynağım kızım Duru'ya, yine her zaman sevgi ve desteği ile yanımda olan herkese teşekkür ederim. Son olarak bu çalışmaya katılmayı kabul eden tüm kişilere teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında İstanbul'da doğdum. İlkokulu Atatürk İlkokulu'nda, ortaokul Atatürk Ortaokulu'nda ve liseyi Lüleburgaz Süper Lisesi'nde tamamladım. 2001 yılında Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başladım ve 2007 yılında mezun oldum. 2009 yılından beri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimime halen devam etmekteyim.