

ATEROSKLEROZDA APOLİPOPROTEİN E, OKSİDE-LDL VE LİPİD PROFİLİ İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Bedia AĞAÇHAN¹ Hülya YILMAZ¹ Oğuz ÖZTÜRK¹ H.Arzu ERGEN¹ C.Selim İSBİR²

¹İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Moleküler Anabilim Dalı, İstanbul – TÜRKİYE

²Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul – TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 27.06.2005 Kabul Tarihi: 11.10.2005

ÖZET

Bu çalışmada lipoprotein metabolizmasındaki önemli görevlerinden dolayı, Apolipoprotein E gen polimorfizmi ve ateros gelişindeki önemi sebebiyle okside LDL (Ox-LDL) düzeyleri kontrol grubu ve myokard infarktüsü (MI) geçirmiş bireylerde saptanarak, bu hastalıkların gelişimi ile ilişkileri araştırılmıştır.

12 kontrol ve 49 myokard infarktüsü tanısı konmuş hastada Ox-LDL ELİSA yöntemiyle tayin edildi. Periferik kan lökositlerinden elde edilen DNA örneklerinden apo E gen polimorfizmini saptamak için Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR), Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) ve agaroz jel elektroforezi teknikleri kullanıldı. İstatiksel analiz için SPSS paket programı kullanılarak yapıldı.

Çalışmamızda myokard infarktüs tanısı konmuş olgularda apoε4 allelinin frekansı (%14.3) sağlıklı gruba göre (%8.3) yüksek bulunmuş, fakat istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca hasta grubunda okside LDL düzeylerinin ($275.40+240.44$ mU/ml) kontrol grubuna ($190.71+60.15$ mU/ml) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). HDL dışında ($p=0.033$) lipid profillerinin gruplar arasındaki değişimi istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çalışma sonucunda Apo ε4 allelinin ve okside LDL düzeylerinin aterosklerozda etkili olduğu izlenimi edinilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Myokard infarktüsü, okside LDL, Apolipoprotein E, polimorfizm, lipid profili.

ABSTRACT

Investigation of Apolipoprotein E gene polymorphism, Oxidized-LDL and Lipid Profiles Atherosclerosis

Because of the important function in lipoprotein metabolism and in the development atherosclerosis, apolipoprotein E (apo E) and oxidized-LDL (ox-LDL) levels were determined in sera of patients with myocardial infarction (MI) and healthy controls and also the relation between disease development and ox-LDL levels were investigated.

Ox-LDL levels were measured with ELISA. PCR (Polymerase Chain Reaction), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), and agarose gel electrophoresis techniques were used to determine the Apo E genotypes in 49 patients with MI and 12 healthy controls. SPSS packet program was used for statistical analysis.

We found that the frequencies of the apoε4 alleles was increased in patients with myocardial infarction compared with the control group (14.3% vs 8.3%), but not statistically significant ($p>0.05$). Ox-LDL levels in patients with MI were statistically higher than control group ($275.40+240.44$ mU/ml vs $190.71+60.15$ mU/ml) ($p<0.05$). There was no significant differences in lipid profiles between two groups, except HDL ($p=0.033$).

We found an interaction between apoε4 alleles, ox-LDL levels and atherosclerosis.

Key Words: Myocardial infarction, oxidized-LDL, apolipoprotein E, polymorphism, lipid profiles.

GİRİŞ

Son yıllarda ateroskleroz patogenezinde rol oynayan genetik ve çevresel faktörler üzerindeki çalışmalar, araştırmacıların odak noktası haline gelmiştir. Ateroskleroz, hayatın erken evrelerinde başlayarak orta yaş ve sonrasında koroner arter hastalığı (KAH) ile sonuçlanan bir hastalık olarak tanımlanmakta ve endüstrileşmiş toplumlarda ölüm nedenlerinin başında yer aldığı rapor edilmiştir (1).

Genetik faktörler, lipoprotein düzeylerini etkileyerek aterosklerozun oluşumunda önemli bir rol oynar (2). Lipoproteinlerin plazma düzeyleri ve metabolik hızları, yüzeylerinde bulunan apolipoproteinler tarafından kontrol edilmektedir. Apolipoproteinlerdeki genetik değişimlerin, KAH'nın gelişiminde bireylerarası farklılıkları belirleyen en önemli faktörlerden biri olduğu bir çok araştırmacı tarafından gösterilmiştir (3-4).

Apolipoprotein E (apo E) düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörleri için ligand olarak görev yapan ve bu reseptörlerle etkileşimi sonucu çeşitli vücut hücrelerindeki kolesterol ve diğer lipidlerin taşınmasına katılan bir plazma proteini olduğu bildirilmiştir (5). Apolipoprotein E geni 19. kromozom üzerinde yer almaktadır ve apoprotein CI (apo CI) ve bir apo CI pseudogenine bağlıdır. LDL reseptör geni ve apo CII geni de bu kromozomda yer almaktadır. Apo E'nin üç esas izoformunun, tek bir gen lokusunda üç allelin ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$, $\epsilon 4$) ürettiği Apo E2, E3 ve E4 olduğu kabul edilmiştir (5-7).

Çeşitli toplumlarda yapılan çalışmalarda, apoE4'ün yüksek plazma total ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterolü ve koroner arter hastalığı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (8). Apo $\epsilon 2$ allelinin ise serum trigliserid düzeylerinde artışa neden olduğu öne sürülmüştür (5). Koroner arter hastası erkeklerde izoelektrik odaklama ve Western Blotlama ile yapılan apo E fenotipleme çalışmalarında, plazma total ve LDL-kolesterol düzeyi apoE fenotipi izleyen şu sıraya göre arttığı gösterilmiştir: E3/2 < E3/3 < E3/4 < E4/4. Myokard infarktüsülü hastaların rölatif sıklığının da aynı sıraya göre arttığı bildirilmiştir (9,10). ApoE4 alleleline sahip bireylerin koroner arter hastalığının daha ciddi tiplerine sahip oldukları ayrıca bu hastaların daha sık infarktüs geçirdikleri gözlenmiştir. Bu çalışmalar ApoE alleli $\epsilon 4$ 'ün ateroskleroz için bir risk faktörü olduğunu ayrıca apoE4 allelinin koroner arter hastalığının şiddetini belirlediğini göstermektedir (10,11).

Aterosklerotik lezyonların meydana geldiği endotelial hücrelerinde, düz kas hücrelerinde makrofajlarda ve lenfositlerde LDL okside olabilmeye özelliğine sahiptir İlk çalışmalarda okside-LDL (ox-LDL)'nin makrofajlarda kolesterol toplanmasına neden olarak proaterojenik özellik gösterdiği bildirilmiş ve aterosklerotik oluşumda LDL oksidasyonun önemli bir basamak oluşturduğu hipotezi kurulmuştur (12,13). Daha sonraki çalışmalarda ox-LDL'nin aterosklerozda buna ek olarak pek çok katkıları olduğu saptanmıştır (14). LDL'nin kültüre endotel hücrelerinde oksidatif modifikasyonundan dolayı sitotoksik olduğu ve bunun kesinlikle aterosklerotik olduğunu gösterilmiştir (15). Ox-LDL'nin makrofajlardan makrofaj koloni stimulan faktör (M-CSF) ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) serbestleşmesini stimüle ettiği ve bu maddelerin monositlerin toplanmasına neden olarak yağ çizgi lezyonlarının oluşumunu kolaylaştırdığı tespit edilmiştir (16,17). Biyokimyasal ve immünohistokimyasal çalışmalarda LDL'nin aterosklerotik lezyonlarda okside olduğu gösterilmiştir (15).

Apo $\epsilon 4$ eksik C57BL/6 sıçanlarda yapılan çalışmalarda okside LDL'nin hiperkolestorelemiye bağlı olarak şiddetli aterosklerozize sahip hastalarda relatif olarak yüksek antikor düzeyleri gösterdiği saptanmıştır (16,17). Ancak bunun kesinlik kazanması ve karanlık noktaların aydınlatılması için daha kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır. Bu bilgilerin ışığı altında myokard infarktüsü geçirmiş olgularda apo E genine ait polimorfizm ile okside LDL düzeylerinin araştırılması planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Seçilen örneklerin tanımı: Bu çalışmada iki örnek grubu kullanılmıştır. Birinci grupta yüksek tansiyon ve kalp rahatsızlığı hikayesi olmayan 12 sağlıklı birey kontrol grubuna alınmıştır.

İkinci grup 49 myokard infarktüsü geçirmiş hastadan oluşmaktadır. İlgili birimlerce hastaların seçiminde izlenen kriterler aşağıda özetlenmiştir.

Kontrol Grubu: Herhangi bir iskemik kalp hastalığı bulgusu, hipertansiyon, lipid anomali, metabolik rahatsızlık (DM, böbrek yetersizliği, karaciğer (KC) yetersizliği vs., ailede bilinen erken yaş iskemik kalp hastalığı lipid metabolizma bozukluğu ve hipertansiyon bulgusu olmayanlar kontrol grubuna alınır.

İskemik kalp hastalığı: Eğer hasta myokard infarktüsü geçirmişse veya anjina var fakat myokard infarktüsü geçirmemişse tanı amacıyla farmakolojik stres testi veya MIBI ile myokard perfüzyonuna bakılır. Eğer negatifse çalışma grubuna dahil edilmemiştir. Eğer pozitifse hasta Koroner kalp hastası kabul edilip anjiyografi önerilmiş (tanıyı koyan birim tarafından), çalışma grubuna alınmıştır.

Kan örneklerinin alınması: DNA izolasyonu için kan örnekleri steril EDTA'lı tüplere alınmış ve en geç bir gün içinde çalışmak üzere oda ısısında saklanmıştır. Serum lipid profili tayinleri için üç gruba ait kan örnekleri 16 saat açlık sonrası kuru tüpe alınmış ve 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrılmıştır. Serum örnekleri analizleri yapılabilmek için -20 oC'de saklanmıştır. Periferik kandan DNA saflaştırılması için steril EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınmış ve en geç bir gün içinde çalışmak üzere oda ısısında saklanmıştır (18).

PCR Yöntemiyle DNA'da Apo E Gen Bölgesinin Çoğaltılması: Üç gruba ait DNA örneklerinden Apolipoprotein E gen bölgesinin çoğaltılması için 50 µl hacminde PCR karışımı hazırlandı. 32.625 µl ddH₂O , 1.5 ünite Taq polimeraz enzimi , 5µl Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10 x Reaksiyon çözeltisi , Apo gen bölgesine özgü 50 pmol primer çifti, 200 mM

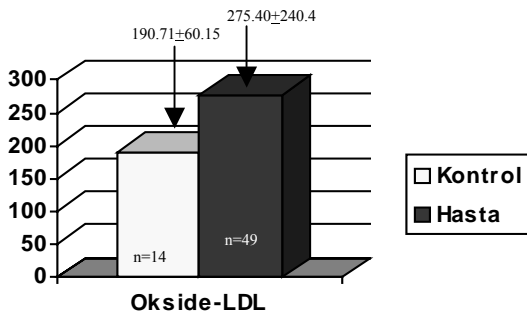
deoksiniükleotid trifosfat karışımı (dNTP) kullanılarak PCR'ları gerçekleştirildi. Amplifiye olan PCR ürünleri Hha I Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile kesildi. Kesim ürünlerinin %4'lük Metaphor agaroz'da elektroforezi tamamlandıktan sonra jel UV altında incelendi ve Polaroid kamera ile fotoğrafı çekildi (19).

Serumda okside LDL düzeylerinin ELISA yöntemi ile tayini: Çalışmada OLAB firması tarafından geliştirilen ELISA kiti kullanılmıştır. Okside LDL düzeyleri Esterbauer (1989) (20) ve Tatzber (1991) (21) tarafından önerilen yöntemle saptanmıştır. Sonuçlar ELISA okuyucusunda 450 nm dalga boyunda okunduktan sonra çizilen standart eğriden mU/ml olarak hesaplanmıştır.

Tablo 1. Gruplararası Yaş ve Vücut-kütle indekslerinin karşılaştırılması

Grup	Yaş (Yıl)	Vücut Kütle İndeksleri (Kg / M ²)
Sağlıklı Grup N=12	56.86 ±13.28	24,24 ±2.33
Myokard İnfarktüsü Hasta Grubu N=49	56.76 ±9.29	26.05 ±2.74

Tablodaki değer ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir (n= örnek sayısı) p>0.05

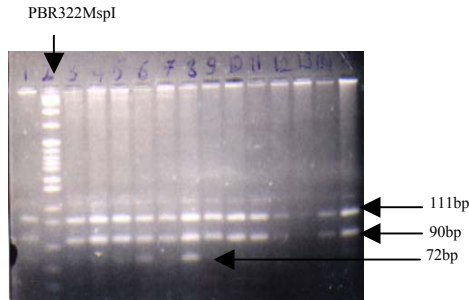


Şekil 1. Gruplar Arası Okside LDL Düzeyleri Şekildeki değerler ortalama değer ± standart sapma ($X \pm SD$) olarak verilmiştir. Gruplararası karşılaştırmalar student t testi ile yapılmıştır, n : örnek sayısı p=0.029

Tablo 2. Apo E genotiplerinin gruplara göre dağılımı

Grup	Apo E Genotipleri					
	2/2	2/3	2/4	3/3	3/4	4/4
Sağlıklı	-	N=1 (%8.3)	-	N= 10 (%83.3)	-	N= 1 (%8.3)
Myokard İnfarktüsü	N= 1 (%2.0)	N= 5 (%10.2)	-	N= 36 (%73.5)	N= 6 (%12.2)	N= 1 (%2.0)

Tablodaki değerler n=örnek sayısı ve yüzde olarak verilmiştir. Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2=3.037$, p>0.05).



Şekil 2. Apo E genotiplerinin metaphor agar jel elektroforezindeki görünümü

Sonuçların Değerlendirilmesinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SSPS 10.0 paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı p<0.05 olarak alınmıştır.

BULGULAR

Sağlıklı ve myokard infarktüsü geçirmiş olgulara ait yaş ortalamaları ve gruplar arası vücut kütle indekslerinin karşılaştırılması tablo 1'de gösterilmiştir. Yaş ve vücut kütle indekleri açısından iki grup arasında fark olmadığı tespit edilmiştir (p>0.05).

Myokard infarktüsü tanısı konmuş olgularda okside LDL düzeyleri 275.40±240.44 mU/ml ve kontrol grubunda ise 190.71±60.15 mU/ml olarak saptanmıştır (Şekil 1). İstatistiksel açıdan hasta grubunda okside-LDL düzeyleri anlamlı derecede yükseldiği gözlenmiştir (p=0.029).

Apo E fenotiplerinin 14 sağlıklı ve 49 myokard tanısı konmuş hastada yapılan gruplar arası karşılaştırmasında anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 2) (Şekil 2).

Ayrıca apo ε4 alleli taşıma açısından gruplararası karşılaştırılması Tablo 3 te verilmiştir. Myokard infarktüsü geçirmiş grupta apo ε4 alleli taşıyanların frekansı kontrol grubuna göre artmış fakat istatistiksel anlamlılığa ulaşmamıştır ($\chi^2=0.300$; p>0,05).

Tablo 3. Apo ε4 alleli taşıma açısından sağlıklı gruba myokard infarktüsü geçirmiş hasta grubunun karşılaştırılması

GRUPLAR	ε4	
	Alleli taşımayanlar	Alleli taşıyanlar
Sağlıklı Grup	% 91.7 (n= 11)	% 8.3 (n=1)
Myokard infarktüsü geçirmiş grup	% 85.7 (n= 42)	% 14.3 (n= 7)

Gruplararası farklılık Kikare testi ile gösterilmiştir ($\chi^2=0.300$; p>0,05).

Tablo 4. Apo ε4 alleli taşıyanlar ile Okside LDL Düzeylerinin Karşılaştırılması

GRUP	Apo ε4 alleli taşıyanlar Okside LDL Düzeyi	Apo ε4 alleli taşımayanlar Okside LDL Düzeyi
Sağlıklı Grup	255.00±0.00	177.27±55.51
Myokard İnfarktüsü Hasta Grubu	252.14±170.97	279.28±251.58

Tablodaki değerler ortalama değer ± standart sapma (X±SD)olarak verilmiştir.

Tablo 5. Gruplararası ve Genel Lipid Profili Dağılımı

GRUP	KOLESTEROL (mg/dl)	TRİGLİSERİD (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	VLDL (mg/dl)
Sağlıklı Grup	195.21±66.19	116.21±50.76	42.80±15.90	132.86±68.56	22.50±9.62
Myokard İnfarktüsü Hasta Grubu	212.63±58.99	133.51±59.78	37.00±14.56	139.16±49.45	25.59±12.32

Bulgular yaş ve cinsiyet farkı alınmadan ifade edilmiştir. Tablodaki değerler ortalama değer ± standart sapma (X +SD)olarak verilmiştir. HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein , VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein. Gruplararası karşılaştırmalar student t testi ile yapılmıştır, n : örnek sayısı

Tablo 4 te ise apo ε4 alleli taşıyanlar ile taşımayan bireylerin ox-LDL düzeyleri verilmiştir. Gruplara düşen örnek sayısı az olduğundan istatistiki çalışmaya yapılamamıştır.

Sağlıklı bireyler ile myokard infarktüsü geçirmiş olgulara ait serum lipid düzeyleri ise tablo 5'de verilmiştir. HDL dışında (p=0.033) lipid profillerinin gruplar arasındaki değişim istatistiki açıdan anlamlı değildir (p>0.05).

TARTIŞMA

Plazma lipid düzeylerini etkileyen çok önemli faktörlerden biri olarak çalışma protokolümüze aldığımız apolipoprotein E 19. kromozomda yer alan üç yaygın alleli olan 34.000 dalton molekül ağırlıklı bir lipoprotein bileşenidir (22,23). Üç yaygın izoform olan apo E2, E3 ve E4 arasında 112. veya 158. pozisyonda yer alan tek bir aminoasit kalıntısında farklılık vardır. Çalışmamızda sağlıklı grupta apolipoprotein E allel frekansları sonuçları (E4/4 % 8.3, E3/4 % 0 , E3/3 % 83.3 , E2/3 % 8.3 , E2/2 % 0 , E2/4 % 0) hasta grubunda ise (E4/4 % 2.0, E3/4 % 12.2 , E3/3 % 73.5 , E2/3 % 10.2 , E2/2 % 2.0 , E2/4 % 0) olarak bulunmuştur. Çalışma gruplarımızdaki apo E genotip frekansları arasında anlamlı fark elde edilememiştir.

Apo ε4 alleli taşıyan sağlıklı grupta okside LDL düzeyi taşımayanlara oranla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Myokard infarktüsü geçirmiş olgularda ise önemli bir değişim gözlenmemiştir. Bu bulgumuzun nedeninin örnek sayımızın azlığından kaynaklandığı izlenimi elde edilmiştir. Ancak myokard infarktüsü geçirmiş grupta apo ε4 alleli taşıyan grup sağlıklı apo ε4 alleli taşıyan grup ile kıyaslandığında hasta grupta okside LDL

düzeylerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu bulgumuz endotelial hücrelerin okside LDL artan monosit makrofaj ve T lenfosit gibi ajanların (14) yapışması yanında apo ε 4 allellerinde zedelenmede ve fonksiyonlarının bozulmasının da rol alabileceği izlenimini uyandırmaktadır.

Apo ε4 alleli taşıyan bireylerde total kolesterol, LDL kolesterol ve VLDL kolesterol düzeyleri düşük trigliserid düzeyleri ise yüksek olduğu gözlenmiştir. Apo ε4 alleli taşıyan bireylerde ise total kolesterol, VLDL kolesterol, HDL kolesterol apo ε2/3 ve ε 3/3'e oranla yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu bulgumuz Mahley ve ark.(24) ile uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir.

Okside LDL düzeyleri genel HDL ve LDL değerleri esas alınarak yapılan sınıflamada değişken bir dağılım göstermiştir. Bu bulgumuzun örnek sayısı azlığından kaynaklandığı görüşündeyiz.

Sonuç olarak; myokard infarktüsü tanısı konmuş hasta grubunda apo ε4 allelinin serum lipid profilinde neden olduğu değişiklikler yanında okside LDL ile olan muhtemel bağlantının bu hastalığa yakınlıkta önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre apo ε4 alleli ile okside LDL düzeyleri arasındaki ilişkisinin daha geniş bir popülasyonda araştırılmasının aterosklerotik koroner hastalıklara yakınlığın aydınlatılması bakımından önemli olduğu kanısına varılmıştır.

Teşekkür

Bu çalışma İ.Ü. Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No : 1211/181298

KAYNAKLAR

1. Farmer JA., Gotto A. Risk factor for coronary artery disease. In: Braunwald Heart Disease A Textbook of cardiovascular medicine. 4th ed An HBJ International Edition, 1992; Volume 1, Chapter 37, 1125-55.
2. Castelli WP. Lipids, risk factors and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis* 1996;124 Suppl.: S1-S9.
3. Azad K, Court S, Parkin JM, Laker MF, Alberti KG. Lipid levels in schoolchildren in North East England : effects of feeding and age. *Ann Clin Biochem* 1994;31 : 233-9.
4. PDAY Research Group: Relationship of atherosclerosis in young men to serum lipoprotein cholesterol concentrations and smoking. *JAMA* 1990; 264 : 3018-24.
5. Mahley RW. Apolipoprotein E : Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240 : 622-30.
6. Weisgraber KH., Innerarity TL., Harder KJ, etal. The receptor-binding domain of human apolipoprotein E . Monoclonal antibody inhibition of binding. *J Biol Chem* 1983; 258 / 20: 12348-54.
7. Zannis VI, Breslow JL. Human very low density lipoprotein Apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry* 1981;20 : 1033-41.
8. Lenzen HJ., Assman G, Buckwalsky R, Schulte H. Association of apolipoprotein E polymorphism , low density lipoprotein cholesterol, and coronary artery disease. *Clin Chem* 1986;32 / 5 : 778-81.
9. Braeckman L, De Bacquer D, Rosseneu M, De Bacquer G. Apolipoprotein E polymorphism in middle-aged Belgian men : phenotype distribution and relation to serum lipids and lipoproteins. *Atherosclerosis* 1996;120 : 67-73.
10. Davignon J, Greeg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis . *Atherosclerosis* 1988;8: 1-21.
11. Hixson JE and the Pathological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY) Research Group: Apolipoprotein E polymorphism affect atherosclerosis in young males. *Arterioscler Thromb* 1991;11 :1237-44.
12. Raitaki OT, Pitkanen OP, Lethimaki T, etal. In vivo low density lipoprotein oxidation relates to coronary reactivity in young men. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:97-102,
13. Holvoet P, Collen D. Oxidation of low density lipoprotein in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998;137 suppl:S33-S38.
14. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362 : 801-9.
15. Mark T, Quin SP, Loren G, Fong DS. Oxidatively modified low density lipoproteins:A potential role in recruitment and retention of monocyte /macrophages during atherogenesis. *Proc.Natl Acad Sci USA* 1987;84: 29995-98.
16. David SL. Does an acidic PH explain why low density lipoprotein is oxidised in atherosclerotic lesions? *Atherosclerosis* 1997;129; 149-157.
17. Joseph LW. Immunological response to oxidized LDL. *Atherosclerosis* 1997;131 suppl,S9-S11.
18. Miller SA, Dykes DD, Polesky HS. Simples salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988;16 / 3 : 1215.
19. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jrgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Rad Biol Med* 1992;13:341-390.
20. Tatzber F, Rabl H, Koriska K et al: Elevated serum neopterin levels in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1991;89: 203-208.
21. Mahley RW. Apolipoprotein E : Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988;240 : 622-30.
22. Mahley RW, Weisgraber KH, Innerarity TL, Rall SC. Genetic defects in lipoprotein metabolism. Elevation of atherogenic lipoproteins caused by impaired catabolism. *JAMA* 1991;265 / 1 : 78-83.
23. Mahley RW, Paloğlu KA, Atak Z, Dawson-Pepin J, Langlois AM: Turkish heart study. Lipids lipoproteins and apolipoproteins. *J Lipid Res* 1995;36, 839-59.