

Ailevi Hiperkolesterolemili Hastaların Mutasyon Analiz Sonuçlarının Simone-Broome Kriterleriyle Değerlendirilmesi

The Evaluation of Mutation Analysis Results of Familial Hypercholesterolemia Patients by Simone-Broome Criteria

Hayrettin Hakan AYKAN, Rıza Köksal ÖZGÜL, Ayşegül GÜZEL, Turgay COŞKUN, Ali DURSUN

Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye



ÖZET

Amaç: Ailevi hiperkolesterolemi (AH), Düşük dansiteli lipoprotein reseptör (LDLR) genindeki defektler sonucu bozulmuş kolesterol yıkımı ve hiperkolesterolemi ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. Kesin tanısı mutasyon analizi ile konulur. Ancak rutin uygulamada mutasyon analizinin pratik olmaması nedeniyle bazı tanılarda kriterler geliştirilmiştir. Bunlardan birisi de Simone-Broome tanıl kriterleridir. Çalışmada, AH'li hastaların mutasyon analiz sonuçlarının Simone-Broome kriterleriyle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Metabolizma ve Beslenme Ünitesinde izlenen primer hiperlipidemili hastalarının dosyaları değerlendirildikten sonra tüm hastalar Fredrickson sınıflandırma sistemine göre sınıflandırıldı. Buna göre hiperlipoproteinemi tip IIa grubuna giren hastalar AH tanısı açısından Simone-Broome kriterleriyle değerlendirildi. Tip IIa hasta grubunda mutasyonların en sık görüldüğü 2 ekzonda (9 ve 12) denatüre edici yüksek performanslı likit kromatografisi (DHPLC) ve DNA dizi analiz yöntemleri kullanılarak mutasyon analizi yapıldı. Yeni ve eski çalışmalara ait mutasyon analiz sonuçları tanı uyumluluğu açısından Simone-Broome kriterleri sonuçlarıyla karşılaştırıldı.

Bulgular: Değerlendirmeye alınan 163 primer hiperlipidemi hastasından 118'i Fredrickson sınıflamasına göre tip IIa grubunda idi. Simone Broome kriterlerine göre bu hastaların %48'inin muhtemel AH, %26'sının kesin AH grubunda olduğu, %17'sinin AH kriterlerini karşılamadığı ve %9'unda bilgi yetersizliği nedeniyle sınıflandırma yapılamadığı görüldü. Çalışma kapsamında taranan Ekzon 9 ait PCR ürünleri DHPLC cihazında yürütüldükten sonra farklı elüzyon grafiği elde edilen hastalara DNA dizi analizi yapıldı. Mutasyon analizi sonucuna göre 2 hastada heterozigot I420N (C.1322 T>A) mutasyonu, 2 hastada heterozigot ve homozigot W556R (C.1729 T>C) mutasyonu saptandı. Kliniğimizde daha önceki çalışmalarda mutasyon taranan 29 hasta ile birlikte değerlendirildiğinde; "kesin AH" grubunda mutasyon analizi yapılan 10 hastanın 10'unda (%100), "muhtemel AH" grubunda analiz yapılan 16 hastanın 12'sinde (%75), "AH yok" grubundaki 3 hastanın 1'inde (%33) mutasyon saptandığı görüldü.

Sonuç: Simone-Broome kriterleri rutin mutasyon taramasının mümkün olmadığı veya selektif tarama yapılacak şartlarda olguların tespitinde kullanılabilecek uygun bir yöntemdir. Ancak AH tanısını kesin ekarte etmeyeceği akılda tutulmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Çocuk, Fredrickson sınıflama sistemi, Genetik tarama, Hiperlipoproteinem Tip IIa, LDL reseptör, Simone-Broome kriterleri

ABSTRACT

Objective: Familial hypercholesterolemia (FH) is an autosomal dominant disease characterised by defective cholesterol removal from the circulation and hypercholesterolemia caused by mutations in the low density lipoprotein receptor gene (LDLR). Although the definitive diagnosis is made by mutation analysis, some diagnostic criteria have been described due to the impracticality of routine mutation analysis. This study aims to compare the mutation status of familial hypercholesterolemia patients and their diagnosis according to the Simone-Broome criteria (SBC).

Material and Methods: All patients with primary hyperlipidemia followed at the Metabolism and Nutrition Unit of Hacettepe University Faculty of Medicine were classified according to the Fredrickson classification system. Patients with type IIa hyperlipoproteinemia were assessed by SBC for the diagnosis of FH. Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) and DNA sequencing were performed on the most frequently mutated exons (9 and 12). Mutation analyses of this and previous cohorts were compared with SBC in terms of diagnostic compatibility.

Results: 118 of 163 patients with primary hyperlipidemia were type IIa hyperlipoproteinemia according to Fredrickson classification. According to the SBC, 48% of these patients were in the "probable FH", 26% in the "definite FH", and 17% in the "no FH" group, and 9% could not be classified due to lacking data. A heterozygous I420N (C.1322T>A)

mutation on exon 9 was detected in 2 patients and a W556R (C.1729T>C) mutation on exon 12 was detected as heterozygous in one and homozygous in one patient. Evaluation of mutation analysis results of patients with a mutation analysis including the 29 patients who were previously analysed revealed, a mutation in 10 out of 10 patients (100%) in the definite FH, 12 out of 16 (75%) patients in the probable FH and in 1 out of 3 (33%) patients in the no FH group.

Conclusion: The use of Simone-Broome criteria is a practical and reliable method in the diagnosis of familial hypercholesterolemia as routine mutation screening is not a feasible choice and is usually performed in selected cases.

Key Words: Child, Fredrickson classification system, Genetic Screening, Hyperlipoproteinemia Type IIa, LDL Receptor, Simone-Broome criteria

GİRİŞ

Hiperlipidemi, plazma lipoprotein konsantrasyonlarının, etnik kökene, yaşa ve cinsiyete göre belirlenmiş sınır değerlerin üzerine çıkmasıyla karakterize tablodur. Lipoproteinlerin bir veya daha fazla grubunun üretiminde veya dolaşıma salınımında artış, plazmadan uzaklaştırılmasında azalma veya her iki mekanizma sonucu oluşabilmektedir. Günümüzde hiperlipidemiler için birçok sınıflandırma sistemi mevcuttur. Lipoproteinleri elektroforetik mobilitesine göre sınıflandıran Fredrickson sınıflandırması bunlardan biridir (1). Fredrickson sınıflandırmasına göre tip IIa olarak bilinen ailevi hiperkolesterolemi (AH), LDLR genindeki defektler sonucu bozulmuş kolesterol yıkımı ve hiperkolesterolemi ile karakterize otozomal dominant bir hastalıktır. Kesin tanısı mutasyon analizi ile konulsa da, rutin mutasyon analizinin pratik olmaması nedeniyle bazı tanılarda kriterler geliştirilmiştir. Bunlardan birisi de Simone-Broome tanıl kriterleridir (2).

Bu çalışmada, Fredrickson sınıflandırma sistemine göre hiperlipoproteinemi tip IIa grubuna giren çocuk hastalar, tanı uyumluluğu açısından Simone-Broome kriterleri (SBK) ve LDLR geni mutasyon analiz sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmiştir.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Beslenme ve Metabolizma Bölümünde izlenen hastalardan kayıtlarına ulaşılabilen primer hiperlipidemi hastaları incelemeye alınmıştır. Bu proje (LUT 09/120) Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmış, ayrıca Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 010 D02 101 001). Beslenme ve Metabolizma bölümü indeks olgu kartları ve hasta kayıt sistemi incelendikten sonra 240 primer hiperlipidemili hastanın kaydına, bunlardan 163 hastanın dosyasına ulaşılmış ve çalışma kapsamına alınmıştır. Mutasyon analizi için kan örneği alınan hastalar ve/veya ebeveynleri çalışma hakkında kapsamlı olarak bilgilendirilmiş ve aydınlatılmış onamları alınmıştır.

Hasta dosyaları incelendikten sonra, izlemde elde edilen klinik, laboratuvar verilerinin yanı sıra tedavi ve komplikasyonları da içerecek şekilde hazırlanmış olan dijital veri formu her bir hasta için ayrı ayrı dolduruldu. Form içerisinde Fredrickson ve AH Sınıflandırması (Simone-Broome kriterleri) için gerekli olan bilgiler

yer verildi. Hastaların tanı anındaki vücut kitle indeksleri (VKİ) kilo ve boy ölçümleri kullanılarak hesaplandı. Bölümümüzde izlenen ve daha önceki yıllarda yapılan analizlerle mutasyonları belirlenen hastaların mutasyon sonuçları çalışmamızda yapılan mutasyon analizi sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmek üzere kaydedildi. Veri toplama işleminin ardından hastaların vücut kitle indekslerinin (VKİ) Z skorları hesaplanarak kaydedildi (3, 4). Tüm hastalarda hiperlipoproteinemi durumu lipoproteinlerin elektroforetik mobilitesine göre (Fredrickson sınıflandırması) sınıflandırıldı. Sınıflandırmada kullanılan Fredrickson sistemi, laboratuvar bulguları ve mekanizmayla birlikte Tablo I'de özetlenmiştir (1).

Fredrickson sınıflandırma sisteminde göre tip IIa grubuna giren hastalar Simone-Broome ailesel hiperkolesterolemi tanı kriterlerine göre tekrar değerlendirildi ve "muhtemel AH", "kesin AH" veya "AH yok" olarak sınıflandırıldı. Total ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) düzeylerini çocuk ve erişkinler için ayrı ayrı kriterize ederek sınıflandırma yapan Simone Broome kriterleri Tablo II'de verilmiştir (2).

Mutasyon Analizi

Mutasyon analizi Fredrickson sınıflandırmasına göre tip IIa grubundaki hastalara uygulandı. Daha önce bölümümüzde yapılan çalışmalarla heterozigot veya homozigot mutasyon saptanan hastalara tekrar mutasyon analizi yapılmadı. Mutasyon analizi yapılan hastalardan EDTA'lı tüplere yaklaşık 10 ml kan alındı. Bu kandan Tıbbi Biyoloji Bölümü laboratuvarlarında izole edilen DNA örnekleri çalışılmak üzere Beslenme ve Metabolizma Bölümü laboratuvarına alındı. Mutasyon analiz çalışması; polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), agaroz jel elektroforezinde kontrol işlemi, DHPLC (denatüre edici yüksek performanslı sıvı kromatografisi), PCR ürünlerinin pürifikasyonu ve otomatik DNA dizi analizi aşamalarıyla gerçekleştirildi.

Çalışmamızın ilk aşamasında elde edilen genomik DNA'da LDLR geninin mutasyonların en sık görüldüğü 4, 9 ve 12. ekzonlar PCR metoduyla çoğaltıldı. Bu üç ekzona ait PCR ürünleri %1.5'lik agaroz jel elektroforezinde kontrol edildi. 4. ekzona ait primer ile uygun reaksiyon elde edilemediği için çalışmanın diğer aşamalarına 9 ve 12. Ekzonların analizi ile devam edildi.

DHPLC aşamasında, homozigot klinikteki hastalarda heterodupleks oluşturmak amacıyla bu hastalara ait PCR ürünüyle kontrol bireye ait PCR ürünü 1:1 oranında karıştırıldı, heterozigot kliniğe sahip olan hastalarda ise PCR ürünleriyle normal bireye

ait PCR ürünleri karıştırılmadan direkt DHPLC ile analiz edildi. LDLR geninin 9. ve 12. ekzonlarına özgül metotlar Navigator Software© (Transgenomic, Inc) programı ile tasarlandı. Metot oluşturulacak ekzon dizisi Navigator Software© (Transgenomic, Inc) programına girildi, uygun bir gradient profili ve örneğin yürütüleceği sıcaklık seçildi. Yürüme sonrası farklı elüsyon grafiği gösteren hastalar için çalışılan ekzonlar DNA dizi analizi için ayrıldı.

Dizi analizi yapılacak PCR ürünleri ortamdaki kullanılmamış dNTP'lerden ve primerlerden temizlenmesi için MinElute 96 UF Plate (Qiagen) kullanılarak pürifiye edildi. Örnekler 96 kuyucuklu örnek kabına yüklenerek 10 dakika vakum pompasında (KnFLab) 800 mbar'da vakumlandı. Süre sonunda 30 µl dH2O ilave edilerek tekrar 10 dakika 800 mbar'da vakumlandı. Örneklerin üzerine 30 µl su ilave edilerek, PCR ürünlerinin çözünmesi için 10 dakika yavaşça çalkalandıktan sonra örnekler toplandı.

DHPLC sonuçlarına göre farklı elüsyon grafiği sergileyen ve nükleotit değişikliği olduğu düşünülen ekzonlar, pürifikasyon işlemi sonrasında ABI 3130 sekans cihazında DNA dizi analizi ile nükleotit düzeyinde okunarak mutasyonlar açısından kontrol örnekleriyle karşılaştırıldı.

İstatistiksel Analiz

Hasta verileri ve mutasyon analizi sonrası elde edilen veriler "Statistical Package for Social Science (SPSS) 16.0 for Windows" paket programına girildi. Sonuçların değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel yöntemler kullanıldı. Normal dağılımın belirlenmesi için "One-Sample Kolmogorov-Smirnov" testi kullanıldı. Normal dağılım gösteren parametreler ortalama ± standart sapma, normal dağılım göstermeyen parametreler ortanca (aralık) olarak verildi.

Tablo I: Lipoproteinlerin elektroforetik mobilitesine göre hiperlipidemi sınıflaması (Fredrickson sınıflaması).

Tip	Elektroforez	Laboratuvar Bulguları	Mekanizma
I	Şilomikron artışı	Yüksek TG, Düşük HDL	LPL veya Apo CII eksikliği/yokluğu
Ila	Pre-Beta artışı	Yüksek LDL	Azalmış LDL katabolizması Reseptör defekti, poligenik
Ilb	Pre-Beta ve Beta artışı	Yüksek LDL ve VLDL	Artmış VLDL üretimi Bozulmuş LDL katabolizması
III	Geniş Beta bandı	Yüksek Kolesterol ve TG	Anormal ApoE Bozulmuş IDL katabolizması
IV	Pre-Beta artışı	Yüksek VLDL Sıklıkla düşük HDL	Bozulmuş VLDL katabolizması Diyetle aşırı alım
V	Şilomikron ve Pre-Beta artışı	Yüksek TG ve VLDL, Düşük HDL	Azalmış LPL aktivitesi VLDL aşırı üretimi

TG; trigliserit, **HDL;** yüksek yoğunluklu lipoprotein, **LPL;** lipoprotein lipaz, **LDL;** düşük yoğunluklu lipoprotein, **VLDL;** çok düşük yoğunluklu lipoprotein, **IDL;** ara yoğunluklu lipoprotein.

Tablo II: Ailevi Hiperkolesterolemi tanısında Simone-Broome Kriterleri.

Simone-Broome Kriterleri
<p>Kesin Tanı</p> <p>a) 16 yaşından küçüklerde total kolesterolün > 260 mg/dL veya LDL kolesterolün > 155 mg/dL olması veya 16 yaşından büyüklerde total kolesterolün > 290 mg/dL veya LDL kolesterolün > 190 mg/dL olması EK OLARAK</p> <p>b) Kendisinde, birinci (ebeveyn, kardeş, çocuk) veya ikinci (büyükbaba-anne, amca, dayı, teyze, hala) derece akrabalarında tendon ksantoma öyküsü VEYA</p> <p>c) DNA bazında, LDLR geni, Ailesel defektif Apo-B100 veya PCSK9 gen mutasyonunun gösterilmesi</p>
<p>Muhtemel Tanı</p> <p>a) Maddesine ek olarak d) veya e)'den birinin olması</p> <p>d) 60 yaş altı 1. derece akrabalarında, 50 yaş altı 2. derece akrabalarında miyokardiyal enfarktüs öyküsünün olması</p> <p>e) Ailede kolesterol yüksekliği öyküsü;</p> <ul style="list-style-type: none"> Birinci veya ikinci derece yetişkin akrabalarında > 290 mg/dL veya 16 yaş altı çocuk veya kardeşte > 260 mg/dL olması

BULGULAR

Hastaların Genel Özellikleri

Çalışmaya alınan 163 hastanın genel özellikleri Tablo III'te verilmiştir. Hastaların hiperlipidemilerinin saptandığı sağlık kuruluşuna başvuru nedenleri değerlendirildiğinde %49'unda rastlantısal veya rutin kontroller sırasında hiperlipidemi saptandığı, %25'inde ailesinde hiperlipidemi öyküsü olması nedeniyle yapılan tarama sırasında, %26'sında ise hiperlipidemiye ait klinik bulgular nedeniyle incelenirken hiperlipidemi saptandığı görüldü. Rastlantısal veya rutin tarama sırasında hiperlipidemi saptanan 80 hastanın, 45'inin (%56) ebeveynlerinde hiperlipidemi, 14'ünde (%17) ailede erken yaşta koroner kalp hastalığı (KKH) öyküsü mevcuttu. Tüm tip IIa hastalarının 54'ünün (%45), tip I, IV ve V hastalarının 24'nün (%66) ise rastlantısal saptandığı görüldü. Tip I ve V grubundaki hastalarının tanı yaşlarının diğer gruplara göre belirgin erken olduğu (sırasıyla ortanca 4 ve 8 ay), tip IIa grubunda ortalama tanı yaşının ortalama 89±50 ay olduğu saptandı.

Klinik bir yakınma veya tanı ile başvurup hiperlipidemi tanısı alan hastaların ayrıntıları Tablo IV'te özetlenmiştir. Ksantoma nedeniyle başvuran hastalardan birinde ksantotezma birinde de arkus korneanın ksantomaya eşlik ettiği görüldü. Tüm hastaların %40'ında tanı sürecinde tiroid fonksiyon testlerinin de değerlendirildiği yapıldığı görüldü.

Tablo III: Hastaların genel özellikleri.

Parametre	Sayı (%)
Cinsiyet	
Erkek	91 (56)
Kız	72 (44)
Tanı Yaşı	
Ortalama±SS, ay, aralık	79.4±56.5, (1-192)
Vücut kitle indeksi	
Ortalama Z-skoru, aralık	0.33±1.22, ((-2.4)-2.71)
Başvuru nedeni	
Rastlantısal-Rutin tarama	80 (49)
Aile öyküsü	41 (25)
Klinik Bulgu	42 (26)

Tablo IV: Hiperlipidemili hastalarda, başvuru yakınma ve tanıları.

Başvuru Yakınması veya Tanısı	Sayı (%)
Ksantoma	21 (50)
Obezite	12 (29)
Pankreatit	5 (12)
Organomegali	2 (5)
Hipertransaminazemi	1 (2)
Hipotiroidi	1 (2)
Toplam	42 (100)

Çalışma kapsamında hiperlipidemi tanısı ile izlenen hastaların tanıları Fredrickson sınıflandırma sistemine göre değerlendirildiğinde tanı dağılımlarının 11 (%7) hastada tip I, 118 (%72) hastada tip IIa, 8 (%5) hastada tip IIb, 1 (%0,6) hastada tip III, 6 (%4) hastada tip IV ve 19 (%12) hastada tip V olduğu görüldü.

Hastaların VKİ Z skorları değerlendirildiğinde hastaların %23'ünün kilolu (Z-skoru 1-2 arası), %11'inin başvuru anında obez (Z-skoru > 2) olduğu ve %13'ünün hafif-orta malnütrisyonu olduğu görüldü. Hastaların %53'ünün VKİ-Z skorları normal sınırlar (-1 ile 1 arası) içindeydi.

Ailevi Hiperkolesterolemi Simone-Broome Sınıflandırması

Fredrickson sınıflandırmasına göre tip IIa tanısı alan 118 hasta Simone-Broome kriterlerine göre ailevi hiperkolesterolemi açısından tekrar gruplandırıldığında hastaların %48'inin muhtemel AH, %26'sının kesin AH grubunda olduğu, %17'sinin kriterleri karşılamadığı (AH yok) ve %9'unda bilgi yetersizliği nedeniyle sınıflandırma yapılamadığı görüldü (Şekil 1). Kesin AH grubuna alınan 31 hastanın; 27'sinin kendisinde, 4'ünün ise birinci veya ikinci derece akrabalarında ksantoma öyküsü vardı.

Mutasyon Analizi Sonuçları

Çalışma kapsamında yapılan mutasyon analizlerinde 2 hastada 9. ekzonda, I420N (C.1322 T>A) heterozigot, 12. ekzonda W556R (C.1729 T>C) bir hastada heterozigot ve bir hastada ise homozigot olarak saptandı. Saptanan mutasyonlar literatürde daha önceden tanımlanmış olan mutasyonlardı.

Kliniğimizde daha önceki çalışmalarda mutasyon analizi yapılan 29 hasta ile birlikte bizim çalışmamızda mutasyonunu gösterdiğimiz 4 hastanın mutasyon verileri bu hastaların SBK'ye göre aldıkları tanıları ile birlikte değerlendirilerek fenotip genotip ilişkisi irdelenmiştir. Bu verilere göre "kesin AH" grubunda mutasyon analizi yapılan 10 hastanın 10'unda (%100) mutasyon saptandığı ve bu mutasyonların %90'ının (9 hasta) homozigot olduğu, "muhtemel AH" grubunda analiz yapılan 16 hastanın 12'sinde (%75) mutasyon saptandığı ve bu mutasyonların %83'ünün (10 hasta) heterozigot olduğu, "AH yok" grubundaki 3 hastanın 1'inde (%33) heterozigot mutasyon saptandığı görüldü. Ayrıca yetersiz veri nedeniyle SBK sınıflandırması yapılamayan 4 hastanın 3'ünde (%75) mutasyon saptandığı ve bu mutasyonların tamamının heterozigot olduğu görüldü. Mutasyon analizi yapılan hastaların SBK'ye göre dağılımı Tablo V'de özetlenmiştir. Çalışmanın özeti niteliğinde akış çizelgesi Şekil 2'de verilmiştir.

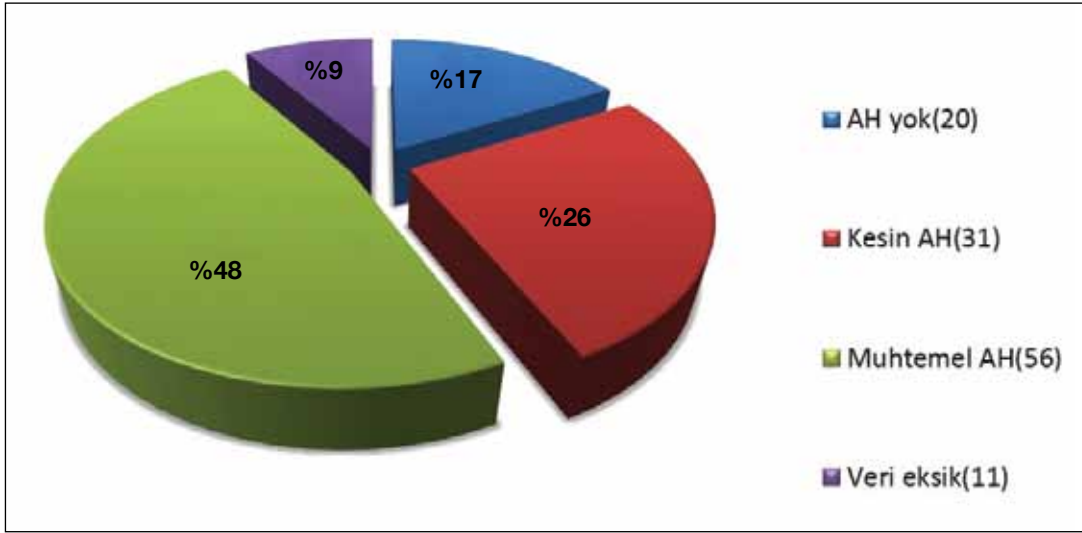
Tedavi ve Komplikasyon

Değerlendirmeye alınan 163 hastanın 75'i sadece diyet tedavisi ile izlenirken, 88'nin tekli, ikili veya üçlü antihiperlipidemik tedavi ile izlendiği görüldü. Ayrıca tip IIa grubundan 6 hastanın, ilaç tedavilerine ek olarak lipit aferezi programına alındığı görüldü. Tedavide kullanılan antihiperlipidemik ilaç gruplarına bakıldığında monoterapi veya kombine halde tüm tedavi protokollerinin %47'sinde statinlerin olduğu görüldü.

Tablo V: LDLR geninde mutasyon analizi yapılmış olan hastaların Simone-Broome kriterlerine göre dağılımları.

	Kesin AH	Muhtemel AH	AH yok	Veri yetersiz	Toplam
Mutasyon yok	0	4	2	1	7
Heterozigot	1	10	1	3	14
Homozigot	9	2	0	0	12
Toplam	10	16	3	4	33

AH; Ailevi hiperkolesterolemi.



Şekil 1: Hiperlipoproteinemi tip IIa hastalarının Simone-Broome kriterlerine göre gruplandırılması AH; ailevi hiperkolesterolemi. Parantez içinde hasta sayıları verilmiştir.

Hasta dosyaları komplikasyonlar açısından değerlendirildiğinde, tüm hastaların %88'inde saptanmış ve kayıtlara geçmiş bir komplikasyona rastlanmadı. Ancak bu hastaların izlem durumları incelendiğinde, 26 (komplikasyonsuz olanların %18'inin) hastanın takipsiz olduğu görüldü. Hiperlipidemi komplikasyonu olarak kayıtlara geçmiş 20 olgu saptandı. Bunlardan 15'inde koroner arter hastalığı, 4'ünde pankreatit geliştiği, 1 hastada hipertrigliseridemiye sekonder hepatosteatoz olduğu bilgisine ulaşıldı. Koroner arter hastalığı olan 15 olgunun 4'ünün koroner by-pass operasyonu geçirdiği, 3'ünün miyokart enfarktüsü sonrası kaybedilmiş olduğu görüldü.

TARTIŞMA

Hiperlipidemilerin, çağımızın en önemli morbidite ve mortalite nedeni olması dolayısıyla olgu tespiti, tanı ve tedavinin önemi her geçen gün biraz daha artmaktadır. Çocukluk yaş grubunda ciddi bir mortalite nedeni olmamasına rağmen, mortalite ve morbiditeye zemin hazırlayan morfolojik değişikliklerin erken çocukluk döneminde başladığının gösterilmesiyle, özellikle koroner kalp hastalığına neden olduğu bilinen yüksek kolesterol düzeyine sahip olguların tespiti ve koruyucu önlemler adına çocukluk yaş grubu için kılavuzlar oluşturulmuştur. Ailesinde erken yaşta kardiyovasküler hastalık öyküsü veya aile bireylerinden en az birinde kolesterol yüksekliği mevcut olan çocuk ve adolesan-

ların, yüksek kolesterol düzeyine sahip olma ve erişkin dönemde KKH risklerinin artmış olması nedeniyle, Amerikan Pediatri Akademisi ve NCEP (National Cholesterol Education Program) bu hastalarda, rutin sağlık kontrolleri sırasında 2 yaşından sonra seçici tarama yapılmasını önermektedir (5-7). Halen ülkemizde riskli hastalarda tarama yapılması ile ilgili ulusal bir politika yoktur. Çalışmamızda, primer hiperlipidemi tanısıyla izlenen hastaların yarısının, risk faktörü gözlemlenmeden yapılmış olan rutin kontrol sırasında saptanması, bu hastaların yarısından fazlasının ebeveynlerinde de hiperlipidemi öyküsünün bulunması ülkemizde de riskli grupta tarama yapmanın önemini ve gerekliliğini ortaya koymuştur.

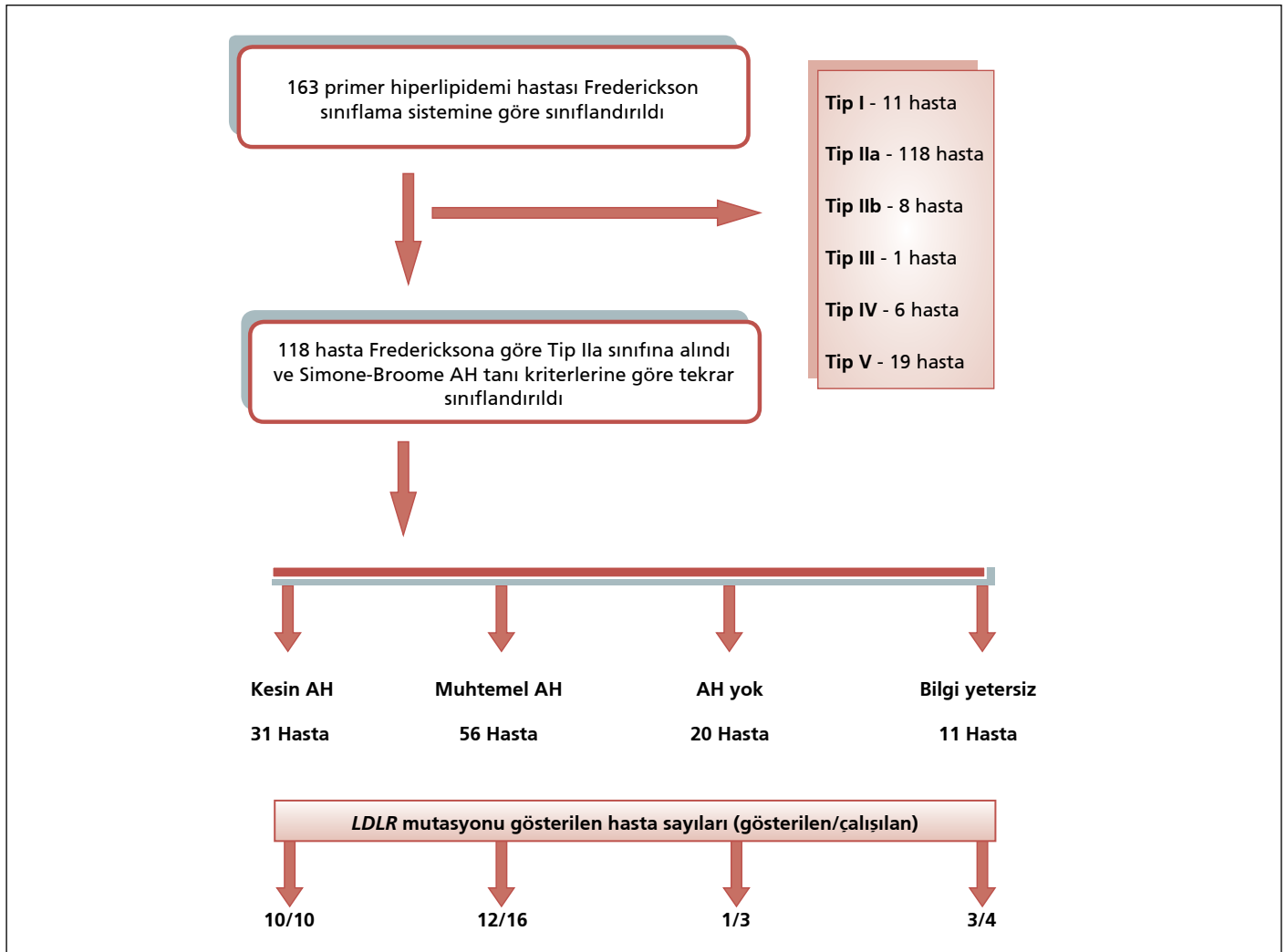
Çalışmamızda, tip IIa olgularının %45'i rastlantısal olarak saptanırken, trigliserit (TG) yüksekliği ile giden tip I, IV ve V olgularının %66'sı, tip I olgularının %73'ü rastlantısal olarak saptanmıştır. Bu üç gruptan (tip I, IV ve V) sadece 4 (%11) hasta aile öyküsü nedeniyle başvurmuştur. TG yüksekliği ile giden tiplerin aile öykülerinde belirgin morbidite veya mortalite olmamasına rağmen daha erken yaşlarda ve yüksek oranda rastlantısal olarak saptanmış olmalarının nedeni, dosyalarda başvurularının "rastlantısal" diye kaydedilmesine rağmen daha erken yaşlarda ortaya çıkabilen bazı yönlendirici bulguların varlığına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bu bulgular arasında TG yüksekliği ile giden tiplerde çocukluk çağında görülebilen, organomegali, kilo alamama, tekrarlayan karın ağrıları ve rutin tetkiklerde serumun lipemik olduğunun fark edilmesi sayılabilir.

Özellikle heterozigot AH olgularının çocukluk çağında fizik muayene veya klinik bulgularının genellikle olmaması bu hastaların seçici tarama programları dışında saptanmasını ve tedavisini zorlaştırmaktadır.

Hiperlipidemi olgularının tanı, tedavi ve izlem sürecinde sekonder hiperlipidemi nedenlerinin tespiti ve sağaltımı önemli rol oynamaktadır. Özellikle aile öyküsü olmadan hiperlipidemisi olan, primer hiperkolesterolemi hastası olup lipit profilinde beklenmedik bozulma görülen, tedaviye dirençli hiperlipidemisi olan veya hafif hiperlipidemisinin hayatı tehdit eden boyuta dönüştüğü hastalarda sekonder nedenlerin dışlanması ve tedavisi kritik öneme sahiptir. Çalışmamız hastalarının tanı ve rutin izlemlerinde; hemogram, karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri, ilaç kullanımı ve obezite açısından düzenli olarak izlendiği görüldü. Bu izlemler sekonder nedenlerin büyük bölümünü kapsamakla birlikte hiperkolesterolemi ve hipertrigliseridemiye yol açarak tip II veya IV benzeri tablo oluşturabilen hipotiroidinin, hastaların sadece %40'ında ekarte edilmiş olduğu görüldü (1, 8). Bu konuda yapılan çalışmalar, görünüşte sağlıklı olan hiperkolesterolemi hastalarının %4-6'sında hipotiroidi, %9'unda subklinik hi-

potiroidi saptandığını göstermiştir (9). Subklinik hipotiroidi dahil olmak üzere bu hastaların tiroit hormon replasman tedavisiyle kolesterol ve apo B düzeylerinde belirgin düşüş sağlanmış olması da hiperlipidemi hastalarının tiroit fonksiyon testleri açısından değerlendirilmesinin önemini ortaya koymuştur (10).

Ailesel hiperkolesterolemi ilk kez 1970'lerde, 500 kişiden birinde görülen, erken KKH ile seyreden genetik bir bozukluk olarak tanımlanmıştır (11). AH patogenezi anlamaya yönelik ilk büyük adım, 1974'te Brown ve Goldstein tarafından, LDL reseptörünün keşfi ile olmuştur (12, 13). Bu keşiften sonra LDL geninin tanımlanması 1985 yılında ikiliye Nobel ödülünü getirmiştir (14). LDL reseptörü (LDLR), glikoprotein yapısında olup, başta karaciğer olmak üzere hücrelerin büyük çoğunluğunun yüzeyinde bulunur. Başlıca fonksiyonları; üzerlerinde taşıdıkları apo B ve apo E aracılığıyla LDL, şilomikron kalıntıları, VLDL, VLDL kalıntıları, IDL ve HDL gibi lipoproteinlerin hücre içine alınmasıdır (15, 16). LDL reseptörünü kodlayan LDLR geni, 19. kromozom üzerinde yer alır. Gen yaklaşık 45 kilobaz uzunlukta olup ve 18 ekzondan oluşur. 18 ekzondan 13'ü, başka



Şekil 2: Çalışmanın özet akış çizelgesi.

proteinlerle homoloji gösteren aminoasit dizilerine sahiptir (14). Dünya genelinde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, LDLR geninin her türlü mutasyon tipini içerdiği görülmüştür. Son veriler ışığında ve geniş mutasyon spektrumu içinde 1600'den fazla tanımlı mutasyon olduğu bilinmektedir (17).

AH, otozomal dominant kalıtılan, LDLR geninde fonksiyon defektine yol açan mutasyonlar sonucu oluşan, monogenik primer hiperlipidemi tipidir. LDL kolesterol yüksekliği, erken KKH ve ksantomalarla karakterize tablonun klinik olarak apo B ve PCSK9 gen defektlerine bağlı klinik tablodan ayrımı mümkün değildir. Hastalığın tartışmasız kesin tanısı mutasyon analizi ile mümkündür. 2005 yılında İngiliz Kalp Birliğinin yaptığı çalışmada 1707 AH hastasının LDLR mutasyonları incelendiğinde, 4. ve 9. ekzonlarda mutasyon saptanma oranlarının daha yüksek olduğu görülmüştür (18). Bu çalışmada sırasıyla mutasyonların %19.2 ve %8.2'sini içeren 2 ekzon dışındaki ekzonlarda mutasyon saptanma oranları ortalama %4.5 (aralık; %0.2-%7.3) olarak saptanmıştır (18). Bölümümüzde 2004 yılında yapılan bir çalışmadaki 37 hastanın mutasyon analizleri değerlendirildiğinde ise mutasyonların %21.4 oranıyla 12. ekzonda yoğunlaştığı görülmüştür (19). Çalışmamızın mutasyon tarama aşamasında dünya genelinde ve Türkiye'de yapılan çalışmalarda LDLR geni mutasyonlarının en yoğun görüldüğü 3 ekzonun (ekzon 4, 9 ve 12) DHPLC yöntemi ile taranması ve heterodupleks saptanan hastalarda DNA dizi analizi yapılması planlanmıştır. Ancak 4. ekzona ait primer ile yapılan PCR çalışmalarında nonspesifik ürünler elde edilmesi nedeniyle 4. ekzon çalışmaya alınmadı. Dolayısıyla DHPLC yöntemi ile ön eleme yapıldıktan sonra sınırlı sayıda hastaya dizi analiz yapılabilmektedir. Sadece çalışmamız verileri dikkate alınarak mutasyon saptanma oranları ile ilgili yorum yapılması uygun değildir.

Ailesel hiperkolesterolemi hastalarında yapılan çalışmalarda mutasyon saptama oranı, daima %100'ün altında olmuştur. Bir veya birkaç mutasyonun yoğun olarak gözleendiği toplumlarda moleküler tanı yöntemlerinin kullanımı görece daha kolay olmakla birlikte, LDL mutasyonlarının dünya çapında ve aynı toplum bireylerinde yüksek derecede heterojenite gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle klinik olarak AH tanısı alan hastalarda yapılan mutasyon tarama çalışmaları genel olarak başarısız olmakta ve mutasyon saptama oranları %30-70'larda kalmaktadır (19-22). Örneğin, Birleşik Krallık'ta SSCP (tek zincir konformasyon polimorfizmi), Southern blot, DNA dizi analizi ve RNA analizi kullanılarak yapılan bir çalışmada, hastaların yalnız %66'sının mutasyonu saptanabilmiştir (22). SSCP analizinin mutasyon saptamadaki duyarlılığının %75-85 arası olduğu göz önüne alındığında hastalardan %15-25'inin mutasyonlarının teknik nedenlerden dolayı belirlenememiş olabileceği öngörülmektedir (23).

AH olgularının ve ailedeki etkilenmiş bireylerin erken saptanması ve tedavileri KKH'nın önlenmesi açısından uygulanabilecek en temel yaklaşımdır. Rutin mutasyon analizinin mümkün olmaması nedeniyle, AH olgularının tanımlanmasına yönelik değişik tanısal kriterler geliştirilmiştir. Bunlardan biri de bizim çalışmamızda da

kullandığımız Simone-Broome tanısal kriterleridir (2). Bu kriterlerde anahtar noktayı hastanın kendisinde veya 1. ve 2. derece akrabalarındaki ksantom öyküsü oluşturmaktadır. Ailede erken yaşta koroner arter hastalığının olması veya dislipidemi öyküsünün olması, mevcut bir monogenik dislipidemi doğrulamayaacağı, aile öyküsünün spesifitesinin toplumda KKH prevalansına bağlı olarak değişeceği de unutulmamalıdır. Örneğin, aile öyküsü; KKH prevalansının düşük olduğu Akdeniz ülkelerinde yüksek spesifiteye sahipken, kuzey Avrupa gibi KKH prevalansının yüksek olduğu bölgelerde düşük spesifiteye sahiptir. Ayrıca kadın akrabalarındaki, prematür KKH öyküsü, erkek akrabalarından daha güçlü bir belirleyicidir (24). Çalışmamızdaki hastalara bakıldığında 31 hastanın ksantom öyküsü nedeniyle "kesin AH" grubuna alındığı görülmektedir. Oysaki özellikle heterozigot hastalarda tendon ksantomaların 3-4. dekattan önce görülmemesi, akrabalarındaki ksantom varlığının sorgulanmasını daha önemli kılmaktadır. Ailesinde tendon ksantoma bulunan bir hasta "muhtemel AH" grubundan "kesin AH" grubuna geçmekte ve AH olma olasılığı 3 kat kadar artmaktadır (20).

Çalışmaya alınan 118 AH hastasından 29'unda daha önce yapılan çalışmalarda LDLR geninin tüm ekzonlarının tarandığı ve 22'sinde çeşitli mutasyonlar saptandığı görüldü. Bu mutasyonlar ve çalışmamızda saptanan 4 mutasyon, hastaların SBK'ye göre gruplandırılmış halleriyle değerlendirildiğinde; "kesin AH", "muhtemel AH" ve "AH yok" gruplarındaki mutasyon saptama oranları sırasıyla %100, %75 ve %33 olarak bulunmuştur. Genel olarak SBK'yi karşılayan hastaların %84'ünde mutasyon saptanmıştır. Olgu sayısı az olmakla birlikte bu veriler SBK'nin AH olgularının klinik olarak tanımlanmasında kullanılabilirliğini göstermiştir. Öte yandan AH kriterlerinin karşılamadığı halde heterozigot mutasyon saptanan 1 hastanın olması "AH yok" grubundaki mutasyon saptama oranını %33 olarak belirlemiştir. Bu durum 2 önemli hususa dikkat çekmektedir, bunlardan birincisi SBK'nin AH olgularını kesin ekarte etmeyeceği, kriterlerini karşılamayan hastalarda da mutasyon saptanabileceğinin akıldan tutulmasıdır. İkinci husus ise, fenotipin her zaman genotiple korele olmayabileceğidir.

Erişkinlerde ve çocuklarda LDL kolesterol yüksekliğinin en önemli nedenlerinden birisi poligenik hiperkolesterolemidir. Birden çok genin çevresel faktörlerin etkisiyle oluşturduğu hiperkolesterolemi tipidir. Esas neden genetik yatkınlık zemininde yüksek yağlı diyet ve obezitedir (25). Mutasyon taramalarındaki mevcut düşük saptama oranları; kullanılan yöntemin hassasiyet eksikliğine veya LDLR, apoB ve PCSK9 genlerinin tamamının taranmamış olmasının yanı sıra bazı olguların poligenik özellikte olması ile açıklanabilmektedir. Poligenik hiperkolesterolemi olgularında tendon ksantoma beklenen bir bulgu değildir. Simone-Broome Kriterlerine göre ksantomun eşlik ettiği "kesin AH" grubunda, "muhtemel AH" grubuna göre 3 kat daha fazla mutasyon saptama oranlarının olması bunun göstergesidir (20).

Sonuç olarak çalışmamız verileri dikkate alındığında Simone-Broome kriterlerinin, klinik hasta takibinde, mutasyon analizinin mümkün olmadığı durumlarda veya selektif mutasyon taraması

planlanan çalışmalarda, olgu saptama ve tanımı için kullanımının uygun olacağı ancak AH varlığını ekarte edemeyeceği görülmüştür. Daha sağlıklı veriler elde edebilmek için tüm DNA dizi analizlerinin yapılacağı geniş çaplı çalışmalara gereksinim vardır.

TEŞEKKÜR

Çalışma projesi finansal anlamda Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: O10 D02 101 001).

KAYNAKLAR

1. Beaumont JL, Carlson LA, Cooper GR, Fejfar Z, Fredrickson DS, Strasser T. Classification of hyperlipidaemias and hyperlipoproteinaemias. *Bull World Health Organ* 1970;43:891-915.
2. Risk of fatal coronary heart disease in familial hypercholesterolaemia. Scientific Steering Committee on behalf of the Simon Broome Register Group. *BMJ* 1991; 303: 893-6.
3. Fredriks AM, van Buuren S, Wit JM, Verloove-Vanhorick SP. Body index measurements in 1996-7 compared with 1980. *Arch Dis Child* 2000;82:107-2.
4. Cole TJ, Freeman JV, Preece MA. Body mass index reference curves for the UK, 1990. *Arch Dis Child* 1995;73:25-9.
5. American Academy of Pediatrics. Committee on Nutrition. Cholesterol in childhood. *Pediatrics* 1998;101:141-7.
6. Kavey RE, Daniels SR, Lauer RM, Atkins DL, Hayman LL, Taubert K. American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Circulation* 2003;107:1562-6.
7. Baumer JH, Shield JP. Hypercholesterolaemia in children guidelines review. *Arch Dis Child Educ Pract Ed* 2009;94:84-6.
8. Alwaili K, Alrasadi K, Awan Z, Genest J. Approach to the diagnosis and management of lipoprotein disorders. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2009;16:132-40.
9. Ball MJ, Griffiths D, Thorogood M. Asymptomatic hypothyroidism and hypercholesterolaemia. *J R Soc Med* 1991;84:527-9.
10. Arem R, Patsch W. Lipoprotein and apolipoprotein levels in subclinical hypothyroidism. Effect of levothyroxine therapy. *Arch Intern Med* 1990;150:2097-100.
11. Kwiterovich PO. Primary and secondary disorders of lipid metabolism in pediatrics. *Pediatr Endocrinol Rev* 2008;5:727-38.
12. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29:431-8.
13. Goldstein JL, Brown MS. Expression of the familial hypercholesterolemia gene in heterozygotes: Model for a dominant disorder in man. *Trans Assoc Am Physicians* 1974;87:120-31.
14. Sudhof TC, Goldstein JL, Brown MS, Russell DW. The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science* 1985; 228: 815-22.
15. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: Apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res* 1984; 25:1277-94.
16. Kronenberg H, Williams RH. Williams textbook of endocrinology. Mahley, Weisgraber, Bersot. Disorders of lipid metabolism. 11th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier,2008.
17. Guardamagna O, Restagno G, Rolfo E, Pederiva C, Martini S, Abello F, et al. The type of LDLR gene mutation predicts cardiovascular risk in children with familial hypercholesterolemia. *J Pediatr* 2009;155:199-204.
18. Fokkema IF, den Dunnen JT, Taschner PE. LOVD: Easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach. *Hum Mutat* 2005; 26:63-8.
19. Sozen MM, Whittall R, Oner C, Tokatli A, Kalkanoglu HS, Dursun A, et al. The molecular basis of familial hypercholesterolaemia in Turkish patients. *Atherosclerosis* 2005;180: 63-71.
20. Heath KE, Gudnason V, Humphries SE, Seed M. The type of mutation in the low density lipoprotein receptor gene influences the cholesterol-lowering response of the HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin in patients with heterozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1999; 143:41-54.
21. Romano M, Di Taranto MD, D'Agostino MN, Marotta G, Gentile M, Abate G, et al. Identification and functional characterization of LDLR mutations in familial hypercholesterolemia patients from Southern Italy. *Atherosclerosis* 2010;210:493-6.
22. Sun XM, Webb JC, Gudnason V, Humphries S, Seed M, Thompson GR, et al. Characterization of deletions in the LDL receptor gene in patients with familial hypercholesterolemia in the United Kingdom. *Arterioscler Thromb* 1992; 12:762-70.
23. Jensen HK, Jensen LG, Hansen PS, Faergeman O, Gregersen N. High sensitivity of the single-strand conformation polymorphism method for detecting sequence variations in the low-density lipoprotein receptor gene validated by DNA sequencing. *Clin Chem* 1996; 42:1140-6.
24. Marks D, Thorogood M, Neil HA, Humphries SE. A review on the diagnosis, natural history, and treatment of familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 2003; 168: 1-14.
25. Durrington P. Dyslipidaemia. *Lancet* 2003;362:717-31.