

جداسازی HDL2 و HDL3 و مقایسه غلظت کلسترول آنها بین گروه شاهد و مبتلایان به آترواسکلروز

دکتر محمود دوستی - عضو هیأت علمی گروه بیوشیمی - دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

Isolation of HDL2 and HDL3 and Assessment of Concentration of Cholesterol ABSTRACT

The major Lipoprotein classes are heterogenous. Human serum High-Density-Lipoproteins (HDL) are separated into two major subfractions (HDL2, $d = 1.063 - 1.125$ g/ml, HDL3, $d = 1.125-1.210$ g/ml) by a simple double precipitation method.

There was a strong inverse relation between HDL-Cholesterol (HDL-C) and subfractions HDL2-C and HDL3-C with atherosclerosis.

This study demonstrated that HDL-C ($P < 0.001$) and both HDL2-C ($P < 0.001$) and HDL3-C ($P < 0.01$) levels are significantly lower (HDL-C = -35%, HDL2-C = -52%, and HDL3-C = -26%) in the atherosclerosis patients (Coronary-Heart-Disease) than normal subjects. This data supports the proposal that the latter surfation is the major contributor to the anti atherogenic role of serum HDL-C, HDL2-C and HDL3-C.

Key Words: Lipoproteins, HDL, Atherosclerosis.

مقدمه

آترواسکلروز که در اثر تنگی و انسداد شریانهای قلبی بوسیله لیپیدهای خون (بخصوص کلسترول) حاصل می‌شود، یکی از بیماریهای قلبی عروقی بوده و از مهمترین عوامل مرگ و میر در جوامع صنعتی و شهری می‌باشد، لذا مطالعه همه جانبه آترواسکلروز بصورت یک ضرورت و یک طرح ملی و پر اهمیت برای اغلب کشورهای صنعتی درآمده است (۱، ۲). عوامل زمینه‌ساز بیماریهای قلبی عروقی بسیارند که از میان آنها می‌توان فشار خون، چاقی، افزایش لیپیدهای خون، دیابت، ارت، جنس، سن، استرس را نام برد ولی عامل اصلی که باعث تنگی و انسداد عروق قلبی می‌گردد، کلسترول منتقل شده از کبد به بافتهای محیطی (بافت چربی و بافت ماهیچه‌ای) می‌باشد (۳).

مطالعات تجربی بر روی شریانهای قلبی تنگ و مسدود یا پلاک آتروم نشان داده است که ترکیب اصلی تشکیل دهنده آن کلسترول می‌باشد، لذا به هر علتی، ارثی و اکتسابی، که کلسترول خون افزایش یابد می‌تواند تشکیل پلاک آتروم را تشدید و تسریع نموده و مرگ زودرس را بوجود آورد (۴، ۵).

کلسترول یک ترکیب عمدتاً آندوژن بوده و برای کلیه بافتهای بدن ضروری است، آنابولیسیم و کاتابولیسیم آن خصوصاً در کبد

خلاصه

لیپوپروتئینهای سرم و بخصوص لیپوپروتئین سنگین یا HDL (High-density-Lipoprotein) دارای اجزاء مختلفی می‌باشند، به طوری که HDL بوسیله روش ساده دوبار رسوبگیری به صورت HDL2 (وزن مخصوص ۱/۱۲۵-۱/۰۶۳ گرم بر میلی‌لیتر) و HDL3 (وزن مخصوص ۱/۲۱۰-۱/۱۲۵ گرم بر میلی‌لیتر) از همدیگر جدا می‌شوند.

مطالعات نشان داده است که یک رابطه کاملاً معکوس بین غلظت سرمی کلسترول موجود در لیپوپروتئین سنگین (HDL-C) و اجزاء آن (HDL2-C و HDL3-C) و بیماریهای قلبی عروقی (آترواسکلروز) وجود دارد.

در این مطالعه، نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که غلظت سرمی HDL-C ($P < 0.001$) و نیز HDL2-C ($P < 0.001$) و HDL3-C ($P < 0.01$) در بیماران قلبی عروقی نسبت به افراد شاهد کاهش معنی‌داری (HDL-C = ٪-۳۵، HDL2-C = ٪-۵۲ و HDL3-C = ٪-۲۶) دارد. این داده‌ها نشان می‌دهد که HDL-C، HDL2-C و HDL3-C به عنوان اجزائی بوده که نقش ضدبیماریهای قلبی عروقی (Anti-Atherogenic) می‌باشند.

روش و مواد

الف - نمونه

خون وریدی دو گروه (شاهد و بیماران مبتلا به آترواسکلروز) پس از ۱۴-۱۲ ساعت ناشتا بودن در لوله بدون ماده ضدانعقاد جمع‌آوری گردید و پس از نیم ساعت (در حرارت آزمایشگاه)، بوسیله سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه سرم آنها جدا گردید. از بین ۱۶۰ نفر مرد که دارای غلظت کلسترول، تری‌گلیسرید، قند، اوره طبیعی بودند و هیچگونه علائم کلینیکی خاصی نداشتند، ۸۲ نفر (۱۰ ± ۳۵ سال) به عنوان شاهد انتخاب شدند. از این افراد یک pool سرم (۱۰۰ میلی‌لیتر) تهیه شد که در ۱۰۰ لوله به مقدار مساوی تقسیم شد و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه نگهداری گردید. تعداد ۳۵ نفر مرد (۱۰ ± ۴۰ سال) که مبتلا به آترواسکلروز بودند نیز با روش فوق انتخاب شدند.

ب - مواد

- هپارین ۴۰۰۰۰ U/ml (پلی‌آنیون)

- $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (فلز دو ظرفیتی یا کاتیون دی‌والان) با غلظت‌های نهایی به ترتیب $1/26 \text{ mg/ml}$ و $0/091 \text{ M}$
- سولفات دکستران (وزن مولکولی ۱۵۰۰۰ دالتون) و $4H_2O$ و $MnCl_2$ با غلظت‌های نهایی به ترتیب $0/65 \text{ g/dl}$ و $0/2 \text{ M}$

پ - روش جداسازی HDL

لیپوپروتئین‌های مختلف خون (VLDL, LDL, HDL) به علت اختلافی که در ترکیبات تشکیل دهنده خود دارند، دارای وزن مخصوص (d) مختلفی نیز می‌باشند و به همین علت می‌توان آنها را بوسیله روش رسوبی و برحسب وزن مخصوص از همدیگر جدا نمود (۱۲).

در این مطالعه بوسیله ترکیبات پلی‌آنیون - کاتیون دی‌والان (هپارین و $MnCl_2$) لیپوپروتئین‌های حلالی (apo B, LDL, VLDL) در pool سرم و سرم بیماران مبتلا به آترواسکلروز را رسوب داده و در نتیجه HDL صاف شده بدست آمد.

برای جداسازی HDL، از جمله محلول هپارین و $MnCl_2$ را به ۱ حجم از سرم اضافه نموده، به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار دادیم تا واکنشها کاملاً صورت گیرد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه در سانتریفوژ ۴ درجه سانتیگراد قرار دادیم تا عمل جداسازی انجام گیرد. قسمت رویی

صورت می‌گیرد، لذا باید یک مسیر یا انتقال خونی رفت (مستقیم) و یک مسیر یا انتقال خونی برگشت (عکس) برای کلسترول خون وجود داشته باشد. مسیر رفت کلسترول در خون از محل سنتز (کبد) به بافت‌های هدف بوسیله حاملی بنام لیپوپروتئین سبک (LDL) انجام می‌شود و بدین صورت LDL باید کلسترول (LDL-C) را به بافت‌های محیطی (ماهیچه‌ای و چربی ...) رسانیده، تا بتواند اعمال حیاتی خود را انجام دهند. مسیر رفت در اثر افزایش غلظت خونی کلسترول یک مسیر خطرناک خواهد بود، چون کلسترول را بوسیله مکانیسم خاصی (Scavenger System) در دیواره شریانها بخصوص شریانهای قلبی رسوب می‌دهد، به همین علت عوامل موجود در این مسیر را عوامل خطر آترواسکلروز نام نهاده‌اند. مقداری از کلسترول بافت‌های محیطی برای کاتابولیسم باید به کبد بازگشته و در تشکیل نمک‌های صفاوی وارد گردند و بدین روش مقداری از کلسترول بدن را بوسیله مدفوع دفع نمایند، که این عمل توسط لیپوپروتئین سنگین (HDL3) و اجزاء آن HDL3 و بخصوص HDL2 که دارای گیرنده اختصاصی در سطح سلولهای کبد می‌باشند، صورت می‌گیرد که آترا مسیر برگشت و یا انتقال معکوس کلسترول گویند. این انتقال چون کمک به خروج کلسترول از بافت‌های محیطی نموده و مانع رسوب آن می‌گردد ضدخطر آترواسکلروز نامیده می‌شود. در نتیجه یک رابطه مستقیم بین غلظت خونی LDL-C و آترواسکلروز و یک رابطه عکس بین غلظت خونی HDL-C و HDL3-C و عمدتاً HDL2-C و آترواسکلروز وجود دارد (۷،۶).

HDL که دارای وزن مخصوص بین $1/21 - 1/063 \text{ g/ml}$ می‌باشد در کبد سنتز شده و به خون می‌ریزد، در خون تغییرات ساختمانی نموده و به صورت HDL2 با وزن مخصوص $1/125 - 1/063 \text{ g/ml}$ و HDL3 با وزن مخصوص $1/21 - 1/125 \text{ g/ml}$ در می‌آید، نقش انتقال معکوس کلسترول را عمدتاً HDL2 به عهده دارد، لذا HDL2 مهمترین فاکتور ضدخطر آترواسکلروز می‌باشد (۹،۸).

جداسازی HDL از بقیه لیپوپروتئین‌های خون و جداسازی اجزاء آن بخصوص HDL2، سپس اندازه‌گیری ترکیبات لیپیدی (عمدتاً کلسترول) و پروتئینی (apoA, C) آن می‌تواند کمک زیادی به تشخیص، درمان و پیشگیری بیماریهای قلبی عروقی نماید. به همین علت امروزه اندازه‌گیری HDL2-C از اهمیت بیشتری از اندازه‌گیری خود HDL-C دارا می‌باشد.

نتایج

الف - تکرارپذیری روش جداسازی HDL و مقایسه روشهای اندازه‌گیری کلسترول موجود در آن

در این مرحله ۵۰ بار آزمایش (بصورت جفت و دوتایی) بر روی pool سرم صورت گرفت تا بتوان قابلیت تکرارپذیری روش و صحت آزمایش را تعیین نمود.

در این مرحله از روش رسوبی هپارین و $MnCl_2$ (غلظت نهایی 0.5 g/l) برای جداسازی HDL از بقیه لیپوپروتئین‌ها (LDL و VLDL) و سپس دو روش اندازه‌گیری کلریمتری Abell و Roschlau برای کلسترول موجود در HDL استفاده گردید.

نتایج حاصل در جدول ۱ نشان می‌دهد که ضریب تغییرات (CV) بین دو روش همبستگی دارند و اختلاف معنی‌داری بین آنها دیده نمی‌شود (NS).

جدول ۱- نتایج تکرارپذیری روش جداسازی HDL و مقایسه روشهای

اندازه‌گیری کلسترول موجود در آن (HDL-C)

مشخصات آماری	روش	Abell	Roschlau
$\bar{X} \pm SD \text{ (g/l)}$		0.55 ± 0.020	0.55 ± 0.026
CV (%)		۳/۸	۴/۲
Pv		NS	

ب - تکرارپذیری روش جداسازی زیرواحدهای HDL

پس از جداسازی HDL از بقیه لیپوپروتئین‌های خون بوسیله روش رسوبی HDL3 و HDL2 بوسیله سولفات دکستران و $MnCl_2$ (غلظت نهایی 0.5 g/l) ۵۰ بار (بصورت دوتایی و جفت) از همدیگر جدا گردید. بدین صورت که زیرواحد HDL2 رسوب نموده و در قسمت صاف شده زیرواحد HDL3 باقی مانده و سپس بوسیله روش Abell کلسترول موجود در HDL3 نیز ۵۰ بار (جفت) اندازه‌گیری گردید و غلظت HDL2-C از اختلاف بین غلظت HDL-C و HDL3 بدست آمد.

نتایج موجود در جدول ۲ نشان می‌دهد که روش جداسازی زیرواحدهای HDL از تکرارپذیری خوبی برخوردار بوده و نیز ضریب تغییرات (CV) وابسته و همسوئی در بین آنها وجود دارد.

جدول ۲- تکرارپذیری روش جداسازی زیرواحدهای HDL-C

مشخصات آماری/زیرواحدهای HDL	Abell	Roschlau
$X \pm SD \text{ (g/l)}$	0.38 ± 0.014	0.17 ± 0.029
CV (%)	۴/۹	۵/۴

لوله سانتریفیوژ که حاوی HDL تام بود، دو قسمت شد یک قسمت جهت جداسازی زیرواحدهای آن (HDL2, HDL3) و قسمت دیگر برای اندازه‌گیری کلسترول موجود (HDL-C) در آن بکار رفت (۱۳).

ج - روش جداسازی زیرواحدهای HDL

زیرواحدهای اصلی HDL (HDL2, HDL3) بوسیله ترکیب پلی‌آنیون (سولفات دکستران) و فلز دوظرفیتی یا کاتیون دی‌والان ($MnCl_2$) از همدیگر جدا شدند، بطوری که HDL2 رسوب نموده و HDL3 در قسمت صاف شده باقی ماند (۱۰، ۱۱).

برای جداسازی HDL2 و HDL3 از همدیگر ۰/۱ حجم از سولفات دکستران و $MnCl_2$ و ۱ حجم از ترکیب حاوی HDL که در قسمت "ب" جداسازی شده بود را مخلوط نموده، به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار دادیم تا واکنش‌ها کاملاً صورت گیرد، سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار (۴ درجه سانتیگراد) قرار دادیم تا زیرواحدها (HDL2 و HDL3) از همدیگر جدا شدند (۱۴). جزء صاف شده رویی حاوی HDL3 بود که برای اندازه‌گیری کلسترول موجود در آن (HDL3-C) مورد استفاده قرار گرفت. سپس غلظت HDL3-C از غلظت HDL-C کم شد و غلظت HDL2-C بدست آمد.

د - اندازه‌گیری کلسترول

اندازه‌گیری کلسترول تام موجود در HDL و HDL3 بوسیله دو روش زیر بر روی pool سرم به عنوان شاهد و سپس فقط بوسیله روش Abell کلسترول موجود در HDL و HDL3 در مبتلایان به آترواسکلروز انجام شد:

۱- روش کلریمتری استخراجی Abell (۱۵).

۲- روش کلریمتری آنزیمی Roschlau (۱۶).

کلیه اندازه‌گیری‌ها در گروه شاهد به صورت دوتایی و جفت انجام شد تا تکرارپذیری روش بررسی گردد.

ه - محاسبات آماری

میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات HDL-C و HDL3-C محاسبه گردید و برای مقایسه میانگین دو روش با همدیگر از Student's t-test استفاده گردید.

در این بررسی مقدار α برابر ۰/۰۵ انتخاب شد.

می‌شود.

همانطور که مشاهده می‌شود افراد مبتلا به آترواسکلروز ۳۵٪ کاهش در غلظت HDL-C، ۲۶٪ کاهش در غلظت HDL3-C و ۵۲٪ کاهش در غلظت HDL2-C را نشان دادند که در هر سه مورد اختلاف آنها با گروه شاهد معنی‌دار بود.

پ-مقایسه غلظت HDL-C و زیرواحدهای آن در گروه شاهد و بیماران مبتلا به آترواسکلروز
روش جداسازی HDL و زیرواحدهای آن و اندازه‌گیری کلسترول آنها به روش Abell در سرم گروه شاهد و افراد مبتلا به آترواسکلروز صورت گرفت.
در جدول ۳ مقایسه غلظتهای HDL-C، HDL3-C و HDL2-C در گروه شاهد و بیماران مبتلا به آترواسکلروز دیده

جدول ۳- مقایسه غلظت HDL-C و زیرواحدهای آن (HDL2-C, HDL3-C) در گروه شاهد و بیماران مبتلا به آترواسکلروز

HDL2-C	HDL3-C	HDL-C	تعداد	$\bar{X} \pm SD$ (g/l)
0.17 ± 0.029	0.38 ± 0.014	0.55 ± 0.20	۸۲	گروه شاهد
0.08 ± 0.00	0.28 ± 0.021	0.36 ± 0.016	۳۵	آترواسکلروز
-۵۲	-۲۶	-۳۵	-	اختلاف
< ۰/۰۰۱	< ۰/۰۱	< ۰/۰۰۱	-	P

استفاده می‌کنند روش معمول و قابل اطمینانی می‌باشند، لذا اندازه‌گیری کلسترول تام موجود در HDL و زیرواحدهای آن بوسیله روش کلریمتری Abell و Roschlau صورت گرفت که اختلاف معنی‌داری بین دو روش وجود نداشت که روش Abell برای ادامه کار (مطالعه بیماران) مورد استفاده قرار گرفت (۱۵، ۱۶). اهمیت اینکه تحقیقات در زمینه روشها، عمدتاً به سوی روشی ساده، قابل تکرار، ارزان و روتین می‌باشد این است که امروزه مرگ و میر ناشی از بیماریهای قلبی عروقی بصورت قابل توجهی در جوامع شهری و صنعتی در حال افزایش می‌باشد، بطوری که این بیماریها در ردیف اولین علت مرگ و میرهای میانسالی و ناگهانی جای دارد. لذا ضرورت روشی روتین که کلیه افراد به سادگی بتوانند این آزمایش را در کلیه آزمایشگاهها و با ضریب اطمینان بالا از نتایج بدست آمده انجام دهنده وجود دارد تا بتوان با تشخیص و درمان از مرگ و میر زودرس پیشگیری نمود (۱۲).

مطالعات زیادی نشان داده است که کاهش غلظت HDL-C و بخصوص HDL2-C از مهمترین عوامل ایجاد کننده آترواسکلروز می‌باشد. مکانیسم این عمل بدین صورت است که HDL و بخصوص HDL2 کلسترول آزاد موجود در غشاهای سلولهای بافتیهای مختلف را از غشاء جدا کرده و در خود فرو می‌برد و در اثر آنزیم لسیتین - کلسترول - اسیل - ترانسفراز (LCAT) که در جریان خون وجود دارد کلسترول آزاد را استریفیه می‌نماید (۱۳). در این زمان HDL2 که حاوی مقداری کلسترول استریفیه بافتیهای مختلف می‌باشد، بوسیله گیرنده اختصاصی موجود در سطح سلولهای کبد بوسیله اندوسیتوز بدخل سلولهای کبد انتقال یافته و کاتابولیزه می‌گردد. کلسترول موجود در HDL2 نیز وارد مسیرهای مختلف

بحث و نتیجه گیری

روش رسوبی برای جداسازی HDL و روش دو رسوب‌گیری پی در پی برای جداسازی HDL3، HDL2 از سرم بوسیله ترکیبات شیمیایی پلی‌آنیون (هپارین، سولفات دکستران) و فلزات دوظرفیتی یا کاتیون دی‌والان (MnCl2) روشی است تکرارپذیر و اختلاف معنی‌داری نیز مشاهده نمی‌گردد (۱۰، ۱۱). در این روشها به علت اینکه از مواد و وسایل خیلی پیچیده و گران‌قیمت استفاده نمی‌شود و روشهای دستی و آسانی هستند، می‌توانند بصورت روشهای روتین آزمایشگاهی در آیند، در حالی که امروزه روش رسوبی فقط برای جداسازی HDL بصورت روتین وجود دارد، ولی هنوز برای جداسازی و اندازه‌گیری لیپدهای HDL3، HDL2 روشی روتین وجود نداشته و مطالعات در حال انجام می‌باشد.

بوسیله روشهای رسوبی در مرحله اول لیپوپروتئینهای حاوی آپولیپوپروتئین B (apoB) که در ساختمان VLDL و LDL وجود دارد با پلی‌آنیون هپارین با غلظت نهایی ۱/۲۶ mg/ml و کاتیون دی‌والان یا فلزات دوظرفیتی MnCl2 (غلظت نهایی ۰/۰۹۱ مول) پیوند نموده و بوسیله سانتریفوژ ۳۰۰۰ دور در دقیقه در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد رسوب نموده، بطوری که اگر روش درست انجام شود فقط HDL در قسمت روئی و صاف شده باقی می‌ماند. در مرحله دوم برای جداسازی اجزاء HDL (HDL3، HDL2) نیز می‌توان از پلی‌آنیون (سولفات دکستران) با وزن مولکولی ۱۵۰۰۰ دالتون) و کاتیون دی‌والان (MnCl2) استفاده نموده و HDL2 را رسوب داده و HDL3 را بدست آورد.
امروزه روشهای اندازه‌گیری کلریمتری که از اسپکتروفتومتر

قلب و مغز را سبب می‌شود، از طرف دیگر HDL و بخصوص HDL2 کلسترول بافتهای محیطی را به کبد منتقل نموده و کاتابولیزه می‌نماید. لذا HDL و عمدتاً HDL2 را یک فاکتور آنتی آتروژن نام نهاده‌اند. در نتیجه یک رابطه مستقیم و مثبت بین LDL و بیماریهای قلبی عروقی از آنجمله آترواسکلروز و یک رابطه معکوس بین HDL2 عمدتاً HDL و بیماریهای قلبی عروقی وجود دارد. به همین علت اندازه‌گیری HDL، LDL، HDL2 و کلسترول موجود در آنها برای تشخیص و پیشگیری بیماریهای قلبی عروقی از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد(۶).

در این مقاله، نتایج حاصل نیز نشان داد روشهای رسوبی برای جداسازی HDL و زیرواحدهای آن (HDL2 و HDL3) و روش کلریمتری برای کلسترول موجود در آنها قابلیت تکرارپذیری را دارا می‌باشند و اختلاف معنی‌داری نیز بین آنها وجود ندارد. مقایسه نتایج گروه شاهد و بیماران مبتلا به آترواسکلروز نیز یک کاهش معنی‌دار در HDL-C (۳۵- درصد) و اجزاء آن بخصوص HDL2-C (۵۲- درصد) را نشان می‌دهد که با دیگر نتایج کاملاً منطبق می‌باشد(۱۷). نتایج قسمت دوم این بررسی در مطالعات دیگر نیز تأیید شده است(۱۸، ۱۹).

متابولیسمی و بخصوص در سنتز نمکهای صفراوی وارد می‌شود. نمکهای صفراوی مسیر کبدی - روده‌ای را در پیش گرفته و مقداری از کلسترول بصورت نمکهای صفراوی از مدفوع دفع می‌گردد و لذا بدین وسیله مقداری از کلسترول بدن دفع شده تا هموستاز آن به صورت طبیعی باقی بماند. حال به هر علتی کلسترول افزایش یابد و همچنین HDL بخصوص HDL2 کاهش یابد، زمینه را برای ایجاد پلاک آتروم بوجود می‌آورد، که به مرور زمان تنگی و انسداد عروق خونی و بخصوص عروق قلبی را سبب می‌شود که آترواسکلروز نامیده می‌شود. به علت تنگی و انسداد عروق قلبی بر حسب درصد گرفتگی و نوع عروق، شخص به دردهای قفسه صدی متفاوت مبتلا می‌گردد. لذا باید فاکتورهای آتروژن در زمینه‌های مختلف مورد مطالعه و بررسی قرار گیرند(۴، ۵).

مطالعات و تحقیقات نشان داده است که از بین لیپوپروتئین‌های خون عمدتاً LDL نقش آتروژن داشته و در بیماران مبتلا به آترواسکلروز افزایش معنی‌داری می‌نماید و علت آن هم این است که LDL کلسترول سنتز شده در کبد را به بافتهای محیطی و عمدتاً قلب و مغز انتقال می‌دهد و کلسترول به علت وضعیت ساختمانی که دارد می‌تواند با یک مکانیسم خاص (Scavenger System) در ماکروفاژ قرار گرفته و سلولهای کفی را ایجاد نماید که انسداد عروق

منابع

- 1- Frickel J. Cholesterol: pour qui sonne le glas. La Recherche. 1989, 20, 1544-1546.
- 2- Thompson G. New hopes for the treatment of coronary heart disease. Nature. 1986, 324, 412-413.
- 3- Brown M and Goldstein J. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. Scientific American. 1984, 251, 58-66.
- 4- Miller N.E, Hammett F, Saltissi S et al. Relation of angiographically defined coronary - artery - disease to plasma lipoprotein subfractions and apolipoproteins. Br. Med. J. 1981, 282, 1741-1744.
- 5- Navab M, Fogelman A.M, Berliner J.A, et al. pathogenesis of atherosclerosis. Am.J. Cardiol. 1995, 76, 1c-7c.
- 6- Schaefer E.J, Eisenberg S, Levy R.I. Lipoprotein apoprotein metabolism. J.Lipid. Res. 1978, 19, 667-687.
- 7- Tall A.R. Plasma cholesterol ester transfer protein. J. Lipid. Res. 1993, 34, 1255-1274.
- 8- Alger V, Malom D, Bertiere M.C. et al. Cholesterol distribution between HDL subfractions HDL2 and HDL3 determination in serum by discontinuous gradient gel electrophoresis. Clin. Chem. 1991, 37, 1149-1152.
- 9- Eisenberg S. HDL metabolism. J.Lipid. Res. 1984, 25, 1017-1045.
- 10- Burstein M, Scholinc H.R, and Morfin R. Rapid method for the isolation of lipoprotein from human serum by precipitation with polyanions. J. Lipid. Res 1970, 11, 583-595.
- 11- Gidez L.I, Miller G.J, Burstein M et al. separation and quantitation of subclasses of human HDL by a simple precipitation procedure. J.Lipid. Res. 1982, 23, 1206-1223.
- 12- Roche D, Miguere M.L, Lequang N.T et al. Concentration of HDL subfraction HDL2 and LpA1 in a random population of healthy subjects. Clin. Chem. 1991, 37, 2111-2113.
- 13- Fruchart J.C, Ailhaud G. apolipoprotein A-I containing lipoprotein particles: physiological role, quantification, and clinical significance. Clin. Chem. 1992, 38, 793-797.
- 14- Kirstein p, Carlson K. Determination of HDL-C subfractions, HDL2 and HDL3 without contamination of Lp(a) in human plasma. Clinica. Chimica. Acta. 1981, 113, 123-134.
- 15- Abell L.L, Levy B.B, Brodrie B.B. et al. A Simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and determination of its specificity. J. Biol. Chem. 1952, 195, 357-366.

- 16- Roschlau p, Bernt E, Gruber W. Enzymatische Bestimmung des Gesam Cholesterins in serum Z.Klin. Chem. Klin. Biochem. 1974. 12, 226-232.
- 17- Shepherd J, Packard C.J, Stewart J.M. The relationship between the cholesterol content and subfraction distribution of plasma HDL. Clinica. Chimica. Acta. 1980, 101, 57-62.
- 18- Berliner J.A, Navab M, Fogelman A.M. et al. Atherosclerosis: Basic Mechanisms. Circulation. 1995, 91, 2488-2496.
- 19- Ballantyne F.C, Clark R.S, Simpson H.S et al. HDL and LDL subfractions in survivors of myocardial infarction and in control subjects. metabolism 1982, 31, 433-438.