

← Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



← Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ)**

**ANAKARDİK ASİDİN TNF- $\alpha$  İLE İNDÜKLENMİŞ İNSAN  
SAFEN VEN GREFT ENDOTEL KÜLTÜRÜNDE ICAM-1,  
VCAM-1 VE NF- $\kappa$ B ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**BURAK ÖNAL**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. SİBEL ÖZYAZGAN**

**TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIBBİ FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ PROGRAMI**

**İSTANBUL-2015**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tıbbi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Programında 2702110008 Burak Önal tarafından hazırlanan "Anakardik asidin TNF ile indüklenmiş insan safen ven greft endotel kültüründe ICAM-1, VCAM-1 ve NFκβ üzerine etkilerinin araştırılması" başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

23 / 10 / 2015

Tez Sınav Jürisi

- | <u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>                        | <u>İmzası</u>   |
|--|---|
| 1.Prof. Dr. A. Gökhan Akkan İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı     |    |
| 2.Prof. Dr. Sibel Özyazgan İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı      |   |
| 3.Prof. Dr. Atilla Karaalp Marmara Üniversitesi Tıp Fak. Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı |  |
| 4.Doç. Dr. Matem Tunçdemir İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak. Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı         |  |
| 5.Yard. Doç. Dr. Mehtap Nisari Erciyes Üniversitesi Tıp Fak. Anatomi Anabilim Dalı       |  |

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Burak Önal



## İTHAF

Rahmetli Anneannem Hanife Keskin'e ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Sonsuz desteği ile Doktora eğitimime başlamama, çalışmalarımı kesintisiz olarak tamamlamama, bu tezin ortaya çıkmasına; ayrıca en kıymetlisi olan, hayatı, akademik duruşu, disiplini öğreten hocam Prof. Dr. Sibel Özyazgan'a; Doktora eğitimim boyunca yanımda olan, Anabilim Dalımızın aile vasfının korunmasında büyük rolü olan ve tüm bilimsel olanakları kullanmamı sağlayan, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. A. Gökhan Akkan'a; Hayata dair ve bilimsel olarak destekleri için Zeliha Yazıcı'ya; Tüm destek ve birliktelikleri için Anabilim Dalımızın diğer öğretim üyeleri, asistanları ve personeline;

Bana olan güveni, öğretileri ve kaliteli duruşu ile her daim yanımda olan Prof. Dr. Fatış Altındaş'a; gerek hayatımda, bilimsel konularda ve temel konularda engin bilgisi ile beni aydınlatan Prof. Dr. Selma Yılmaz'ı'e; gerek tezimde benden yardımlarını, her zaman doğru olan nasihatlerini esirgemeyen, dik durabilmeyi ve azmetmeyi öğreten Doç. Dr. Matem Tunçdemir'e; disiplini, çalışma azmi, gösterdiği doğru yollar ve bana karşı gösterdiği sabrı için Doç. Dr. Duygu Gezen-Ak'a, bilgisiyle beni aydınlatan, problemlere akılcı çözüm yolları üretebilmesiyle örnek olan Doç. Dr. Erdinç Dursun'a; bilimsel alanda ve hayatta her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen ağabeyim, dostum Uzm. Dr. Bülent Demir'e;

Tez çalışmamın temelinde, misafirperverliğiyle ve engin bilgi birikimleriyle yanımda olan Erciyes Üniversitesi Anatomi AD Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehtap Nisari'ye;

Yine çalışmalarımdaya yardımlarını esirgemedi her daim yanımda olan, alternatif çözümlere ulaşmamı sağlayan, motivasyonumun her an yüksek kalmasını sağlayan kadim dostlarım Uzm. Mol. Biy. Caner Demir ve Mol. Biy. Tuğhan Karaburçak'a; tez çalışmalarımdaya yardımlarından ve özverisinden ötürü Mol. Biy. Özge Kamacı'ya; laboratuvar çalışmalarım ve tez yazımdaki yardımlarından ötürü Mol. Biy. Cemre Kandaz ve Deniz Özen'e; Tez içerisindeki şekillerin yapılandırılmasında yardımları ile birlikte her daim yanımda olan kadim dostum Uzm. Filolog Emrah Nihat Erel'e;

Bugün buralara gelmemi sağlayan, her konuda yardımlarını esirgemeyen, ayrıca her daim arkamda olduklarını bildiğim kıymetli babam M. Atilla Önal' a ve değerli annem Zübeyde Önal'a; desteği ve varlığı ile bana gurur kaynağı olan kardeşim Burçin Önal'a;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 45910

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİİ
ÖZET .....	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Ateroskleroz .....	3
2.1.1. Ateroskleroz Patogenezi .....	3
2.1.1.1. Erken Aterosklerotik Lezyon Oluşumu .....	5
2.1.1.2. Yağlı Çizgilerin Oluşumu .....	7
2.1.1.3. Yağlı Çizgi Lezyonlarının Gelişimi .....	7
2.2. Ateroskleroz ve İnflamasyon .....	8
2.2.1. Ateroskleroz Patogenezinde İnflamasyon Tetikleyicileri .....	17
2.2.2. Aterosklerozda Tedavi Hedefi Olarak İnflamasyon .....	18
2.3. Bağlantı Kompleksleri ve Ateroskleroz .....	19
2.3.1. ICAM-1 .....	19
2.3.2. VCAM-1 .....	22
2.4. NF-κB .....	25
2.4.1. NF-κB ve Ateroskleroz .....	28
2.5. Anakardik Asit .....	30
2.5.1. Etnofarmakoloji .....	30
2.5.2. Histon Asetil Transferaz (HAT) İnhibitör Etkisi .....	31
2.5.3. NF-κB ve İnflamasyon Yolağına Etkisi.....	32
2.6. Safen Ven.....	33

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. İnsan Safen Ven Endotel Kültürü Deneyleri .....	38
3.1.1. İnsan Safen Ven Endotel Hücrelerinin Ekileceği 25 cm <sup>2</sup> kültür şişelerinin Hazırlanması .....	39
3.1.2. Endotelyal Hücre Büyüme Medyumunun Hazırlanması .....	39
3.1.3. İnsan Safen Ven Endotel Hücrelerinin kültür şişelerine ekimi.....	40
3.1.4. İnsan Safen Ven Endotel Hücrelerinin Pasajlanması.....	41
3.2. İnsan Safen Ven Endotel hücreleri Üzerine Yapılan Uygulamalar .....	43
3.2.1. Anakardik Asit ve TNF- $\alpha$ Çözeltilerinin Hazırlanması .....	43
3.3. İmmünfluoresan Boyama Protokolü .....	44
3.4. İnsan Safen Ven Endotel Hücrelerinden RNA İzolasyonu.....	46
3.4.1. Örneklerin RNA Saflık ve Miktarlarının Tayin Edilmesi.....	46
3.4.2. Normalizasyon .....	47
3.4.3. cDNA Sentezi .....	47
3.4.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR).....	47
3.4.5. 2. Normalizasyon .....	48
3.4.6. Deneylerde Kullanılan qRT- PCR Primerleri ve Taqman Problemleri .....	48
3.4.7. qRT- PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması .....	48
3.4.8. qRT PCR Sıcaklık Döngüsü .....	49
3.5. Sitotoksosite Ölçümü.....	49
3.6. İstatistiksel yöntem: .....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Mikroskopik Değerlendirme .....	51
4.2. Sitotoksosite Ölçüm Sonuçları.....	52
4.3. 1 saat Anakardik asit uygulandıktan sonra, TNF- $\alpha$ uygulanan ve 6 saat inkübasyona bırakılan gruplara ait göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri değişimleri.....	54
4.3.1. ICAM-1 mRNA Seviyelerindeki Değişimler .....	54
4.3.2. VCAM-1 mRNA Seviyelerindeki Değişimler .....	56
4.3.3. NF- $\kappa$ B mRNA Seviyelerindeki Değişimler .....	58
4.4. Floresan mikroskopik değerlendirme .....	60
4.4.1. ICAM -1 için immünfluoresan boyama sonuçları .....	60
4.4.2. NF- $\kappa$ B için immünfluoresan boyama sonuçları .....	61
4.5. İmmünfluoresan Resimlere Ait Analiz Sonuçları.....	67



4.5.1. ICAM-1 ImageJ Floresan Yoğunluğu Sonuçları .....	67
4.5.2. NF-κB ImageJ Floresan Yoğunluğu Sonuçları.....	69
5. TARTIŞMA.....	71
KAYNAKLAR .....	77
ÖZGEÇMİŞ .....	88

**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 3-1: cDNA sentezinde kullanılan karışım .....	47
Tablo 3-2: qRT- PCR Reaksiyon Karışımının Hazırlanması .....	48
Tablo 3-3: qRT PCR Sıcaklık Döngüsü .....	49
Tablo 4-1: 1 saat Anakardik asit uygulandıktan sonra, TNF- $\alpha$ uygulanan ve 6 saat inkübasyona bırakılan gruplara ait sitotoksisite (LDH) ölçümleri. (Kontrol grubu LDH salınımı 0 olarak kabul edilmiştir.) .....	53
Tablo 4-2: qRT-PCR yöntemi ile saptanan ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.....	55
Tablo 4-3: qRT-PCR yöntemi ile saptanan VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.....	57
Tablo 4-4: qRT-PCR yöntemi ile saptanan NF- $\kappa$ B göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.....	59
Tablo 4-5: ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B için immün boyama sonuçlarının semikantitatif olarak değerlendirilmesi. ....	67
Tablo 4-6: ICAM-1 ImageJ Floresan yoğunluğu sonuçları.....	68
Tablo 4-7: NF- $\kappa$ B ImageJ Floresan yoğunluğu sonuçları .....	70

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Aterosklerozda Mononükleer Fagosit. ....	9
Şekil 2-2: Mast Hücrelerinin Aterogenezdaki Toplanması ve Fonksiyonları. ....	11
Şekil 2-3: Ateromun Yaşam Döngüsünün Şematik Gösterimi. ....	14
Şekil 2-4: Transmigrasyonun Dört Adımı .....	20
Şekil 3-1: Endotelial Hücre Büyüme Medyumu hazırlanışı .....	40
Şekil 3-2: İlk Ekimden Sonra Endotel .....	41
Şekil 3-3: %70-%80 Arası Konfluense Ulaştıktan Sonra Pasajlanan Hücrelerin Görüntüsü.....	41
Şekil 3-4: İnsan Safen Ven Endotel hücrelerinin tripsin/EDTA ile muamele edildikten sonraki görüntüsü.....	42
Şekil 4-1: 2. Günün Sonunda %70-80 Arası Konfluense Ulaşan Hücreler. Büyütme 5X.....	51
Şekil 4-2: 1 saat Anokardik asit uygulandıktan sonra, TNF- $\alpha$ uygulanan ve 6 saat inkübasyona bırakılan gruplara ait LDH değerleri. ....	53
Şekil 4-3: qRT-PCR yöntemi ile saptanan ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.....	55
Şekil 4-4: qRT-PCR yöntemi ile saptanan VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.....	57
Şekil 4-5: qRT-PCR yöntemi ile saptanan NF- $\kappa$ B mRNA seviyeleri. ....	59
Şekil 4-6: A1 (5 $\mu$ M AA) uygulanan endotel kültüründe ICAM-1(yeşil)ve NF- $\kappa$ B (kırmızı) için immünfluoresan boyama görüntüleri ve iki görüntünün karşılaştırma sonuçları. ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B nin birlikte yerleşim gösterdiği hücre bölümleri turuncu renkte görülmektedir. Büyütme 20X .....	63
Şekil 4-7: A2 (1 $\mu$ M AA) ve (1 $\mu$ M AA) +TNF- $\alpha$ uygulanan endotel kültüründe ICAM-1(yeşil)ve NF- $\kappa$ B (kırmızı) için immünfluoresan boyama görüntüleri ve iki görüntünün karşılaştırma sonuçları. ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B nin birlikte yerleşim gösterdiği hücre bölgeleri turuncu renkte görülmektedir. Büyütme 20X .....	64
Şekil 4-8: A3 (0,5 $\mu$ M AA) uygulanan endotel kültüründe ICAM-1(yeşil)ve NF- $\kappa$ B (kırmızı) için immünfluoresan boyama görüntüleri ve iki görüntünün karşılaştırma sonuçları.ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B nin birlikte yerleşim gösterdiği hücre bölgeleri turuncu renkte görülmektedir. Büyütme 20X .....	65

Şekil 4-9: A4 (0,1 $\mu$ M AA) uygulanan endotel kültüründe ICAM-1(yeşil)ve NF- $\kappa$ B (kırmızı) için immünfluoresan boyama görüntüleri ve iki görüntünün çakıştırma sonuçları. ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B nin birlikte yerleşim gösterdiği hücre bölgeleri turuncu renkte görülmektedir. Büyütme 20X .....	66
Şekil 4-10: ICAM-1 ImageJ Fluoresan yoğunluğu.....	69
Şekil 4-11: NF- $\kappa$ B ImageJ Fluoresan yoğunluğu. ....	70

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- AA - Anakardik Asit  
AKS - Akut Koroner Sendrom  
APC - Antijen Sunan Hücreler  
ARB - Anjiyotensin Reseptör Blokeri  
CCR - C-C motif Reseptör  
CRP - C Reaktif Protein  
GMCSF - Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör  
HDL - Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein  
HSV - İnsan Safen Veni  
ICAM-1 - Hücrelerarası Adezyon Molekülü-1  
IFN- $\gamma$  - İnterferon Gamma  
IKB - İnhibitör KB  
IKK - İnhibitör KK  
IL - İnterlökin  
LDL - Düşük Yoğunluklu Lipoprotein  
MCP - Monosit Kemoattractan Protein  
M-CSF - Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör  
MHC - Majör Histokomplabilite Kompleksi  
MMP - Matriks Metalloproteinaz  
NF- $\kappa$ B - Nükleer Faktör Kappa B  
NO - Nitrik Oksit  
NOS - Nitrik Oksit Sentaz  
oxLDL - Okside LDL  
PDGF - Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü  
SR - Schavenger Reseptör  
TCR - T Hücre Reseptörü  
TGF - Transforme Edici Büyüme Faktörü  
TNF - Tümör Nekrozis Faktör  
VCAM-1 - Vasküler Hücre Adezyon Molekülü  
VLDL - Çok Düşük Yoğunluklu Protein

## ÖZET

Önal B. (2015). Anakardik Asit'in TNF- $\alpha$  ile indüklenmiş insan safen ven greft endotel kültüründe ICAM-1, VCAM-1 ve NF- $\kappa$ B üzerine etkilerinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji AD. Doktora Tezi. İstanbul.

Anahtar Kelimeler : Ateroskleroz, İnflamasyon, Safen Ven, Restenoz, Anakardik Asit.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 45910

Ateroskleroz, hücrel ve hümoral immün yanıtların katıldığı, orta ve daha büyük boyutlardaki arterlerin kalınlaşması ve sertleşmesi sonucunda damar lümeninin aterosklerotik plaklarla daralması ile oluşan kronik inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Aterosklerotik süreçte yer alan hücreler, sitokinleri salgıladıkları gibi, sitokinler tarafından da aktive edilebilme özelliğine sahiptirler. İnflamasyonun, endotel aktive olduktan sonra adezyon moleküllerinin, sitokinlerin ve kemokinlerin (MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin ve P-selektin) ekspresyonuyla monositlerin ve/veya lenfositlerin toplanmasına ve subendotelyumda infiltrasyona yol açtığı bildirilmiştir.

Anakardik asit (AA), *Anacardium occidentale* (kaju fıstığı) kabuğunda bulunan biyoaktif bir fitokimyasal maddedir. AA, oksidatif hasardan kansere kadar birçok patofizyolojik bozukluk için iyi bir koruma sağlayabilir. AA kullanılarak NF- $\kappa$ B aktivasyon yolağı ve NF- $\kappa$ B düzenleyici gen ürünlerinin apoptoz ve inflamasyon mekanizmaları üzerine yapılan çalışmalarda AA'nın, büyüme faktörleri ve inflamatuvar yanıtlarla aktiflenen NF- $\kappa$ B yi baskıladığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda, AA'nın insan safen ven endotel kültüründe, TNF- $\alpha$  ile uyarımı sonucu oluşturulan inflamasyon modelinde ICAM-1, VCAM-1 ve NF- $\kappa$ B arasındaki ilişkiyi araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda endotel hücreleri üzerine kısa süreli AA uygulamasının ardından TNF- $\alpha$  uygulaması yapılarak, AA'in adezyon molekülleri ve NF- $\kappa$ B üzerine olan akut etkisi saptanmıştır. Daha sonra gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile ICAM-1, VCAM-1 ve NF- $\kappa$ B genlerinin mRNA seviyelerindeki değişiklikler saptanmıştır. NF- $\kappa$ B ve ICAM-1 proteinleri için ise ikili immünfluoresan boyama prosedürü uygulandı. Tüm gruplara sitotoksisite testi uygulandı. Çalışmamızın sonuçlarına göre AA'nın, safen ven greft hastalığının gelişmesinin önlenmesinde ve tedavisinde NF- $\kappa$ B yolağı üzerinden, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu etkileyerek etkin olabileceği düşünülebilir.

## ABSTRACT

Önal Burak (2015). Investigation of the effect of Anacardic Acid on ICAM-1, VCAM-1 and NF- $\kappa$ B in human saphenous vein graft endothelial culture induced with TNF- $\alpha$ . İstanbul University, Institute of Health Science, Medical Pharmacology Dept. PhD Thesis. İstanbul.

Key Words: Atherosclerosis, Inflammation, Saphenous Vena, Restenosis, Anacardic Acid.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 45910

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease, which the cellular and humoral immune responses are included, caused by the constriction of the vessel lumen because of the atherosclerotic plaques as a result of the thickening and hardening of medium and larger arteries. The cells going through the atherosclerotic process secrete cytokines and they also have the ability of being activated by the cytokines. It is demonstrated that inflammation generates accumulation of the monocytes and/or lymphocytes as a result of the expression of adhesion molecules, cytokines and chemokines (MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and P-selectin) after activation of the endothelium, which consequently results in infiltration of the subendothelium.

Anacardic acid (AA) is a bioactive phytochemical found in the nutshell of the *Anacardium occidentale* (cashew apple). AA may provide better protection against several pathophysiological disorders, such as oxidative damage or cancer. Several studies on NF- $\kappa$ B activation pathways by using AA and on apoptosis and inflammation mechanisms of NF- $\kappa$ B regulatory gene products suggest that AA suppresses NF- $\kappa$ B, which is activated by the growth factors and inflammatory responses.

In our study, we aimed to investigate the relation between AA and ICAM-1, VCAM-1 and NF- $\kappa$ B, which are associated with atherosclerotic process and with formation of atheroma plaque, by using the inflammation model of human saphenous vein endothelial culture constituted by TNF- $\alpha$  stimulation.

In our study, the acute effect of the AA on adhesion molecules and on NF- $\kappa$ B has been determined by applying TNF- $\alpha$  on endothelial cells after acute application of AA. Afterwards, changes in mRNA levels of ICAM-1, VCAM-1 and NF- $\kappa$ B genes have been determined by using qRT-PCR method. Double immunofluorescence procedure has been applied to NF- $\kappa$ B and to ICAM-1 proteins. The cytotoxicity test has been applied to all groups. As a consequence of our study, it is considered that AA can be effective on prevention of the development of saphenous vein graft disease and on its treatment by altering the expression of adhesion molecules through NF- $\kappa$ B pathway.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ateroskleroz, hücrel ve hümorale immün yanıtların katıldığı, orta ve daha büyük boyutlardaki arter duvarlarının kalınlaşması ve sertleşmesi sonucunda damar lümeninin aterosklerotik plaklarla daralması ile oluşan kronik inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Ross tarafından öne sürülen hipoteze göre, endotelin zedelenmesi sonucunda görülen bölgesel inflamasyon, ateroskleroz başlangıcında önemlidir. İnflamasyon, aterosklerozun her aşamasında önemli roller üstlenmektedir. Endotel hücrelerinin aktive olmasının ardından; sitokin, kemokin ve adezyon moleküllerini salgılamaya başlamaktadır. Bu sürecin sonucunda da monositlerin/lenfositlerin toplanarak subendotelyuma infiltrasyonu neticesinde gelişen erken yağlı çizgilerin oluşumu da inflamasyonun aterosklerotik süreçte önemli rolü olduğu izlenimini vermektedir. Aterosklerotik süreçte yer alan hücreler, sitokinleri salgıladıkları gibi, sitokinler tarafından da aktive edilebilme özelliğine sahiptirler. Sağlıklı endotel, normal olarak lökositlerin bağlanmalarına olanak sağlamamaktadır. Ancak, aterogenez oluşumunun indüklenmesini takiben arter endotel hücreleri üzerinde çeşitli lökosit sınıflarına bağlanmaya olanak tanıyan seçici adezyon molekülleri görülmeye başlamaktadır. İnflamasyonun, endotel aktive olduktan sonra adezyon moleküllerinin, sitokinlerin ve kemokinlerin (MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin ve P-selektin) ekspresyonuyla monositlerin ve/veya lenfositlerin toplanmasına ve subendotelyumda infiltrasyona yol açtığı bildirilmiştir.

6-Pentadesil salisilik asit olarak da bilinen Anakardik asit (AA), Anacardium occidentale (kaju fıstığı) kabuğunda ve bazı diğer bitkilerde bulunan biyoaktif bir fitokimyasal maddedir. Ayrıca; kardanol, kardol, 2-metil kardol gibi AA ile ilişkili bileşikler de bulunmaktadır. AA, oksidatif hasardan kansere kadar birçok patofizyolojik bozukluk için iyi bir koruma sağlayabilir. Diğer taraftan, kardanol ve kardol gibi bileşikler, AA'ya göre daha az biyolojik aktivite sunarlar. AA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 'nin neden olduğu hücre hasarını etkin bir biçimde önlemektedir. Bunu, metal iyonları varlığında ROS ve hidroksil radikalleri dönüştürerek yapar. AA, çeşitli pro-oksidan enzimlerin inhibisyonu da dahil olmak üzere iyi bir antioksidan olarak görev yapmaktadır. AA'in bu kadar büyük antioksidan kapasiteye sahip olmasının diğer bir nedeni, salisilik aside benzer biçimde fenolik halka yapısının yanında bir de phetyl yan



zincirinin varlığındandır. AA'nın, inflamasyon ile ilişkisinin araştırıldığı çalışmalarda ise, NF- $\kappa$ B aktivasyon yolağı ve NF- $\kappa$ B düzenleyici gen ürünlerinin, AA kullanılarak etkisi araştırılmıştır. AA, büyüme faktörleri ve inflamatuvar yanıtla aktiflenen NF- $\kappa$ B yi baskılamaktadır. Bunu, IKK aktivasyonu, IKB fosforilasyonu, IKB degradasyonu, p65 fosforilasyonu ve NF- $\kappa$ B reporter gen ekspresyonunu inhibe ederek gerçekleştirir. AA, NF- $\kappa$ B blokajını, doğrudan DNA ya müdahale ederek değil, IKB fosforilasyonunu ve degradasyonunu baskılayarak IKK inhibisyonu aracılığıyla gerçekleştirir.

Çalışmamızda, İnsan safen ven endotel hücrelerine, kültür ortamında TNF- $\alpha$  ile uyarım sonucu inflamatuvar ateroskleroz modeli oluşturulacak, sonrasında ise, inflamasyon üzerine AA'nın olası etkileri araştırılacaktır. Ateroskleroz ile ilişkisi bilinen ICAM-1, VCAM-1 ve NF- $\kappa$ B gen ekspresyonlarının belirlenmesi, immünfluoresan boyama ile de söz konusu proteinlerin lokasyonları ve kantitatif olarak miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırmamız, hem insan safen ven greftlerinde oluşturulan inflamasyon modelinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak, hem de doğal bir fitokimyasal olan AA' in ateroskleroz patogenezi ve moleküler mekanizması üzerine etkinliğinin anlaşılmasına katkıda bulunacaktır. Böylelikle koroner by-pass ameliyatlarından sonra, safen ven greftlerinde gelişebilecek olan ateroskleroza bağlı greft oklüzyonunun azaltılmasına yönelik tedavi edici hedeflere zemin oluşturacaktır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz, hücrel ve hümorale immün yanıtların katıldığı, orta ve daha büyük boyutlardaki arterlerin kalınlaşması ve sertleşmesi sonucunda damar lümeninin aterosklerotik plaklarla daralması ile oluşan kronik inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Ross tarafından öne sürülen hipoteze göre, endotelin zedelenmesi sonucunda görülen bölgesel inflamasyon aterosklerozun başlangıcında önemlidir [1]. Ateroskleroz, gelişmiş ülkelerde morbidite ve mortalitenin en önemli kaynağı olarak gösterilmektedir [2]. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2012 yılı raporuna göre, ölüm nedenlerinin ilk sırasında kardiyovasküler hastalıklar (KVH) bulunmakta ve KVH nedeni ile ölüm oranları giderek artmaktadır. Türkiye'de "Türk Erişkinlerde Kalp Hastalığı ve Risk Faktörleri (TEKHARF) çalışmasında, Türk toplumunda yıllık yaklaşık 230 bin yeni koroner olayın gerçekleştiği, yılda 160 bin erkek ile 120 bin kadının öldüğü, KVH temelli ölümlerin yaklaşık 66.000 erkek ile 61.000 kadında meydana geldiği bildirilmiştir [3].

Ateroskleroz, yavaş ilerleyişli lezyonların oluşumu ve luminal daralma ile kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıkların oluşumuna yol açar. Plak rüptürü ve tromboz sonucunda Akut Koroner Sendrom (AKS), Miyokard Enfarktüsü (MI) ya da inme gibi kardiyovasküler hastalıklar ortaya çıkabilir [4].

#### 2.1.1. Ateroskleroz Patogenezi

Ross'un hipotezine göre, aterosklerozun başlamasında rol oynayan mekanizma, damarda herhangi bir hasar oluşumu sonucu görülen inflamasyona yanıt olarak aterosklerozun geliştiğidir [5]. İnflamasyon; enfeksiyon ya da başka bir nedenle oluşmuş olan doku hasarına karşı hücrel ve hümorale cevapları içeren olguların bütünüdür. İnflamasyon gelişimindeki amaç, hasarlanmış olan dokunun onarılması ve yenilenmesini sağlamaktır. Bu hipoteze göre ateroskleroz, damar lümeninde meydana gelen bir hasara karşı iyileşme sürecinde gelişen olayların bütünü olarak nitelendirilebilir. Ateroskleroza karşı gelişen ilk koruma, damarın iç yüzeyini kaplayan epitel hücre yapısında olan endotel hücreleri tarafından yapılır. Bu nedenle ateroskleroz gelişiminde endotel bütünlüğü anahtar rol oynamaktadır [6, 7]. Endotel, yassı ve tek sıralı hücrelerden oluşan damar iç yüzeyini kaplayan ve normal koşullarda kan

elemanları için geçirgen yapıda olmayan bir yapıdır. Arteriyal sistemde kesintisiz ve düzenli bir yüzey oluşturarak kan ve arter duvarı arasında bariyer oluştururlar. Bu bariyer aktif bir yapıdadır ve otokrin, endokrin ve parakrin fonksiyonları bulunur. Hemostaz aracılığıyla vasküler fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rol oynar [8].

Ateroskleroz, ağırlıklı olarak arteriyal dallanma ve çatallaşma noktalarında laminal akımın yavaşlamasıyla seyreden ilerleyici bir hastalıktır. Aterogenezin erken aşamalarının belirlenmesi için yapılan morfolojik ve fonksiyonel insan ve hayvan çalışmalarında, aterogenez sürecini başlatıcı etkinin, apolipoprotein-B içeren lipoproteinlerin subendotelial alanda birikmesi olduğu bildirilmiştir [9].

Yapılan çalışmalarda, aterogenezde damarlarda bir takım değişiklikler belirlenmiş, bu değişikliklerde özellikle monosit ve makrofajların önemli bir role sahip olduğu bildirilmiştir. Endotel ve monosit/makrofajlarda yapılan hücre kültürü çalışmaları ile hastalığın başlangıcı ve ilerlemesiyle ilgili farklı yollar öne sürülmüştür. İnflamasyon oluşma mekanizmasında endoteliumun önemli bir rolü olduğu bildirilmiştir. Endoteller arasındaki adezyonlar, albuminden daha büyük moleküllerin geçişine izin vermeyecek kadar sıkı yapıdadır. Lipoproteinler, albuminden daha büyük olduklarından dolayı, endotelial bariyeri ancak plazma veziküllerinin aracılığı ile geçebilirler. Endotel hasarı olduğunda damar permeabilitesi artmaktadır. Böylelikle LDL, endotel engelini daha kolay aşabilir. LDL modifikasyonlarının da bu aşamada olduğu bildirilmiştir [10]. İntimaya yerleşen LDL moleküllerine ilk modifikasyonları endotel hücreleri gerçekleştirir. Ateroskleroz patogenezindeki önemli yer tutan okside LDL oluşumu bu basamakta gerçekleşir. Okside LDL, endotel için toksik yapıdadır. Sitokin salınımını uyarır ve nitrik oksit (NO) inhibisyonuna neden olur. Böylece endotel hasarı oluşturarak aterosklerotik süreci hızlandırır. En iyi tanımlanmış parakrin mediyatörlerden birisi olan nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile L- arjininden sentezlenen NO, endotel için koruyucu olarak önemli rol oynar. Güçlü anti-agregan etki ile trombus oluşumunu engellerken, anti-inflamatuar özellik ile de ateroskleroza yavaşlatıcı ve engelleyici özellik gösterir. NO bu etkileri ile, adezyon moleküllerinin endotel yüzeyinde ekspresyonunu engellerken, lipidlerin endoteli geçişi ve düz kas proliferasyonunu engeller [11, 12]. NO varlığında endotel, vazodilate olur. Bununla birlikte sigara, hipertansiyon, dislipidemi, obezite ve diyabet gibi primer vasküler risk faktörleri, endotel yapısını bozar. Söz konusu risk faktörleri varlığında

endotelial NO yıkımının arttığı ya da ekspresyonunun azaldığı öne sürülmüştür [13]. Sağlıklı yapıda olan normal bir endotel, vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon arasındaki dengeyi korur. Bu denge bozulduğunda ise endotel proaterojenik ve proinflamatuvar bir rol oynar [14]. Endotel hasarı olduğunda salgılanan histamin, serotonin, adrenalin ve ADP, vasküler permeabilite artışına neden olur. NO ekspresyonunun ya da aktivitesinin azalması ile vazodilatasyonun bozulması sonucu LDL oksidasyonunun arttığı bildirilmiştir [15].

Okside LDL, makrofajlar ve düz kas hücreleri için de aktivatör özelliğe sahiptir. Okside LDL'ler ile oluşan endotel disfonksiyonu sonucunda koagülasyonun tetiklendiği, proinflamatuvar sitokinlerin üretiminin arttığı bilinmektedir. Lökosit adezyon molekülleri ve lökosit kemoatraktan moleküllerinin de ekspresyonu artmaktadır [16]. Makrofajlar da oksidatif koşullarda LDL nin oksidasyonuna katkıda bulunurlar [17]. Aterogenez mekanizmasında immün yanıtların rolü, stabil olmayan aterosklerotik plaklarda makrofaj ve T hücreleri gibi immün sistem hücrelerini yanı sıra IL-6, TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinlerin, VCAM-1 gibi adezyon moleküllerinin, kemokinlerin, CD40, CD40 ligand ve C reaktif protein (CRP) varlığı ile açıklanabilir [18].

#### **2.1.1.1. Erken Aterosklerotik Lezyon Oluşumu**

Erken ateroskleroz sürecinde oluşan lezyonlara tip I lezyonlar adı verilir. Minör lipid birikimleri ve seyrek makrofaj köpük hücreleri ile karakterize yapıdadır. İnsanlarda, tunika intimanın fibroelüler kalınlaşması, diffüz intimal kalınlaşma olarak adlandırılır. Diffüz intimal kalınlaşma; düz kas hücreleri, elastin, proteoglikanlar ve küçük makrofajları içermektedir. Diffüz intimal kalınlaşma aorta ve koroner arterlerde yaştan bağımsız olarak oluşabilir [19]. Erken tip I lezyonlarda makrofaj sızmasından önce hücre dışı lipid birikimi yapılan çalışmalarda belirlenmiştir. İnsanlarda yapılan çalışmada, genç yetişkinlerden alınan sağlıklı aorta intimasında erken lipid çekirdeği varlığı gösterilmiştir [20]. İntimal hücre dışı lipid birikimlerinin oluşumu tip I lezyonlarda görülürken, ileri aterogenez aşamalarında makrofaj sızması görülmektedir. Yapılan çalışmada insan koroner arterlerinde, intimada CD68+ makrofajların varlığının artan lipid oranıyla doğru orantılı olarak ilerlediği gösterilmiştir [21].

Lipoprotein parçacıkları da kan dolaşımından ayrılarak subendotelial alana transsitozis ile taşınır. Hücre dışı matriks, yapısındaki çeşitli proteoglikan bileşenler

sayesinde subendotelyal alanda lipoprotein tutulumunu kolay hale getirir [22]. Lipoprotein tutulumu ile de subendotelyal alanda iç ve dış bazal laminada lipoprotein birikim gözlenir. Subendotelyal alana transsitozis ile geçiş yapan LDL molekülleri, matriks proteinler ve proteoglikanlar ile etkileşime girerek kimyasal modifikasyonlara maruz kalır [23]. Bu süreç sonucunda doğal yapıda bulunan LDL'lerden proinflamatuvar ve patojenik partiküller oluşur. Oksidasyon, lipolizis ve proteolizis bu süreçte etkin bir rol oynar. Endotel, düz kas hücreleri, monosit ve makrofajlar; esterleşmemiş ve kolesterolden zengin heterojen bir yapı olan oxLDL (Oxidized Low Density Lipoprotein) yi yakalayabilir [24, 25].

Aterogenez sürecinde erken lezyon oluşumunda da görülen bir diğer morfolojik olay lökosit alımı ve birikimidir. Normal yapıda bulunan endoteller genellikle lökositlerle gerçekleşen adeziv etkileşimlere karşı dayanıklıdır. Hiperkolesterolemi başlangıcında, lökositler endotele yapışır endotel hücre boşluklarından tunika intimaya girer, burda lipit birikimi ve köpük hücre oluşumları başlar. Monositlerle birlikte T lenfositleri de erken aterosklerotik lezyonlarda birikme eğilimindedir. Endotel hücre yüzeyinde bazı lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonu, monosit ve T hücrelerinin endotele yapışmasını düzenler. Lökosit adezyon molekülleri iki alt başlıkta incelenmektedir. Birincisi, immünglobulin ailesine ait "Vascular Cell Adhesion Molecule-1" (VCAM-1)'dir. Yapılan çalışmalarda, erken ateromatöz lezyonlarda endotel hücre yüzeyinde VCAM-1 ekspresyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir. Immünglobulin ailesine ait diğer bir lökosit adezyon molekülü "Intercellular Adhesion Molecule-1" (ICAM-1) dir. Bu molekül, hem endotel hücreler tarafından düşük düzeylerde eksprese edildiği için hem de bazı lökosit tiplerine bağlandığı için aterosklerozda daha az seçicilik gösterir. Selektinler lökosit adezyon moleküllerinin diğer bir geniş kategorisini oluşturmaktadır. Aterom plağı altında bulunan endotel hücreleri E-selektini çok düşük düzeylerde eksprese ettiği için erken aterosklerozla ilgisi çok azdır. Bu ailenin başka bir üyesi olan P-selektin, endotel hücrelerinde eksprese edildiği için lökosit alımında önemli rol oynar [26].

### 2.1.1.2. Yağlı Çizgilerin Oluşumu

Makrofaj köpük hücrelerine, tip II lezyonlarında daha sık rastlanmaktadır. Arterlerin iç bölgelerinde sarımsak, yüzeysel kabarcık ve yağlı çizgilenmeler şeklinde görülürler. Bu lezyonlarda T hücreleri, mast hücreleri ve lipid dolu düz kas hücreleri görülür. Tip II lezyonlarda görülen köpük hücreler, ekstraselüler bölgede dağıntık vaziyette bulunurlar. Köpük hücre oluşumu, lipoprotein alımı ve kolesterol akışı arasındaki dengenin kaybolmasından kaynaklanır. Modifiye olmuş lipoproteinlerin reseptör aracılı endositozu, Scavenger Reseptörler (SR-A (I ve II), CD36, SR-B1, CD68 ve LOX-1) aracılığı ile gerçekleşir [27]. oxLDL nin makrofajlara alımında CD36 ve SR-A reseptörleri önemli rol oynarlar. Makrofaj ve düz kas köpük hücreleri; MCP-1, IL-6 ve MMP lerin ekspresyonlarında artışa neden olmaktadır [28, 29].

### 2.1.1.3. Yağlı Çizgi Lezyonlarının Gelişimi

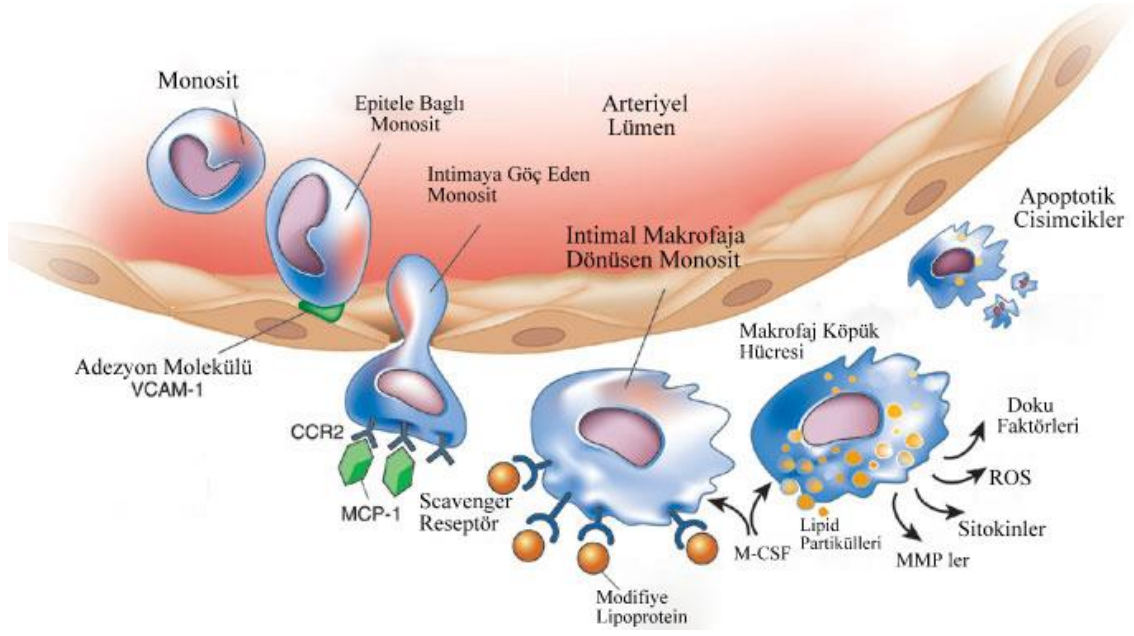
Tip III lezyonlarda az miktarda hücre dışı lipid depolarının varlığı bilinmektedir. Lipidler, makrofajlar ve T hücrelerinin altında, lezyonun en derin bölgelerinde lokalize olurlar. Lipid depoları tunika intimanın hücreyel organizasyonunu bozarak hücre dışı matriks alanını genişletir. Yağlı çizgiler, fibröz lezyonlara dönüşür. Fibröz lezyonlar ise, erken lezyon gelişimi ve ilerlemiş ateroskleroz süreci arasında ara bir morfolojik bağlantı gösterir. Erken lezyonlar (Tip I, II ve III) aterosklerozun klinik olarak sessiz olan belirtilerini gösterirler. Tip II lezyonlarda, histolojik olarak lezyon boyunca dağıntık lipid yapıları mikroskopik olarak belirlenebilir. Lipid depoları intimanın kalınlaşma bölgesinde kurulan düz kas hücre tabakalarında gelişir. Lipid depoları, hücre içi matriks proteoglikanlarının ve düz kas hücrelerinin yerini alır. Hücre dışı lipid birikiminin sonucu olarak da damar duvarına makrofajların fagositoz yetisini aşan miktarda bir lipid girişi gerçekleşir –ki bunun sonucu olarak aşırı sitotoksik kolesterol birikimi ile makrofajlarda apoptoz gerçekleşir [26, 30].

İleri lezyonlar olarak nitelendirilen lezyonlardan olan Tip IV lezyonda ise, hücre dışı lipid miktarı artmış ve bir kolesterol havuzu oluşmuştur. Tip IV lezyonlarda en belirgin histolojik özellik, ateroskleroz denilen yoğun yapıda hücre dışı lipid çekirdek varlığıdır. Lipid çekirdek yapısı, tip II lezyonlar süresince dağıntık bilinen lipid depolarının birleşmesinden oluşur. Bunun devamında ise, doygun durumdaki makrofaj köpük hücreleri apoptotik yolağa girer ve lipid çekirdeğin büyümesine katkıda bulunur [31].

Tip V lezyonda, yoğun olarak bağ doku depolanır. Lipid çekirdeği saran fibröz bir kapsül meydana gelir. Oluşan bu lezyonlar çoğu zaman çok büyük yapıdadır ve bu nedenle arter duvarlarında “remodeling” denilen yeniden yapılanma gelişemediğinden ötürü lümen daralır. Tip Va lezyonlar denilen fibroateromlar, kalın bağ dokusu tabakaları ile ayrılmış olan çeşitli lipid çekirdek tabakaları içermektedir. Bu tip lezyonlar, lezyon yüzeyi bozulması sonucu da gelişebilir. Bu adımı takiben hematoma ve trombotik depozisyon, ekstraselüler lipid partikülleri ve daha çok makrofaj birikimi için yapısal bir çerçeve olarak rol alır. Tip Vb olarak adlandırılan kalsifiye lezyonlar ise, düz kas organel kalıntıları ve hücre dışı lipidlerin kalsifikasyonuna yol açan lipid çekirdek mineralizasyonu ile karakterizedir. Fibrotik lezyonlar olarak adlandırılan tip Vc lezyonlar, hücre dışı lipidin önemli düzeyde eksik olduğu bağ dokusunda zengin çekirdek içeriği ile karakterizedir. Tip IV ve Tip V lezyonların yüzey bozulmaları, hemoraji, hematoma gibi komplikasyonları, genellikle ateroskleroz ile ilişkilendirilen morbidite ve mortaliteden sorumlu tutulmaktadır.

## **2.2. Ateroskleroz ve İnflamasyon**

Hiperkolesterolemi ile indüklenen deneysel ateroskleroz modelleri, 20. yüzyılın başlarından itibaren farklı bir çok çalışmada incelenmiştir. Bu bağlamda inflamasyonun teşvik edilmesinin, hiperlipidemi ve aterogeneze mekanik olarak bağlantı sağlayabileceği öne sürülmüştür. Yapılan çalışmada, aterojenik diyetin başlanmasından kısa süre sonra, lökositlerin intimada ve daha alt tabakalarda bulunan endotel hücrelerine bağlandığı ışık mikroskopu ile gözlemlenmiştir [32]. Normal şartlarda kan akışı ile ilişkili endotel tabakası, lökositlerin adezyonuna karşı dirençlidir. Günümüzde, beyaz kan hücrelerinin endotele bağlanmasının moleküler mekanizmaları ile ilgili yeterli bilgiye sahibiz. Bir endotel-lokosit adezyon molekülü; ateromun başlangıcındaki arteriyal endotel kısımlarına, mononükleer lokositlerin adezyonu için ilgi çekici bir adaydır. VCAM-1, özellikle yeni oluşan aterom üzerindeki monosit ve T lenfositlere bağlanır. (Şekil 2-1).



**Şekil 2-1: Aterosklerozda Mononükleer Fagosit.**

Normal arteriyel endotelium kan monositlerini de içeren lökositlere uzun süreli temasa direnç gösterir. Endotelial hücreler inflammatuar aktivasyona uğradığında, lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonlarını artırır. Monositlerin ateroma toplanması konusunda vasküler adezyon molekül-1 (VCAM-1)'in majör bir rolü vardır. Monositler aktif endotelial tabakaya bağlandığında, tunika tabakasına ya da arteriyel duvarın daha iç tabakalarına penetre olacak şekilde endotelial hücrelere diapedez olurlar. Bu yönetilen göç kemoatraktan gradiyent gerektirir. Özellikle reseptörü CCR2 ile birlikte monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi çeşitli kemokinler bu sürece katılırlar. Monosit intimaya yerleştiğinde doku makrofajlarının karakteristiklerini edinir. Ateromda özellikle makrofajlar, hüceici lipoprotein partiküllerini oksidasyon ya da glikasyon için modifiye eden scavenger reseptörlerini eksprese eder. Bu süreçler, arteriyel lezyonun ayırıcı özelliği olan ve mikroskop altında köpüksü görünümü nedeniyle bu şekilde adlandırılan, sitoplazma içinde lipid damlacıklarının birikimiyle sonuçlanan arteriyel köpük hücrelerinin oluşumuna neden olur. Arteriyel intima içinde makrofaj, ateroskleroz ve komplikasyonlarıyla ilişkili pek çok fonksiyona dahil olur. Köpük hücreleri, lezyondaki lokal inflammatuar cevabı ve reaktif oksijen türlerini güçlendiren pro-inflammatuar sitokinleri sekrete eder. Aktif mononükleer fagositin, ekstraselüler matriksi degrade eden ve bu şekilde plağın fibröz kapsülünün gücünü artıran matriks metalloproteinazları (MMP) üretmesiyle birlikte aterosklerozun trombotik komplikasyonlarında anahtar bir rolü vardır. Sonuç olarak plak koaptığında potansiyel bir pro-koagulan protein doku faktörü olarak kanın başka bir makrofaj ürünüyle temasını engeller. Makrofajlar, bazıları apoptozla olacak şekilde “nekrotik çekirdek” olarak adlandırılan bu aterosklerotik lezyonda ölebilirler [33].

Lökosit seçiciliğine ek olarak, VCAM-1'in diğer özellikleri de onu ilgi çekici bir aday yapmaktadır. Endotelial hücreler, lezyon formasyonu olan bölgelerde kolesterol girişine yanıt olarak VCAM-1 üretmektedir [34]. Ek olarak, VCAM-1'in lökosit alımından önce yükseldiği, kolesterol ile indüklenen lezyon formasyonu için tavşan ve fare modellerinde gösterilmiştir [35]. VCAM-1'in hedefe yönelik olarak silinmesi, farelerde embriyonik ölümlere neden olmuştur. Bununla birlikte VCAM-1'in hipomorfik varyantları ile yapılan deneylerde aterogeneze duyarlı hale getirilen farelerde (apolipoprotein E geninin (apoE) inaktivasyonu ile) lezyon formasyonunun

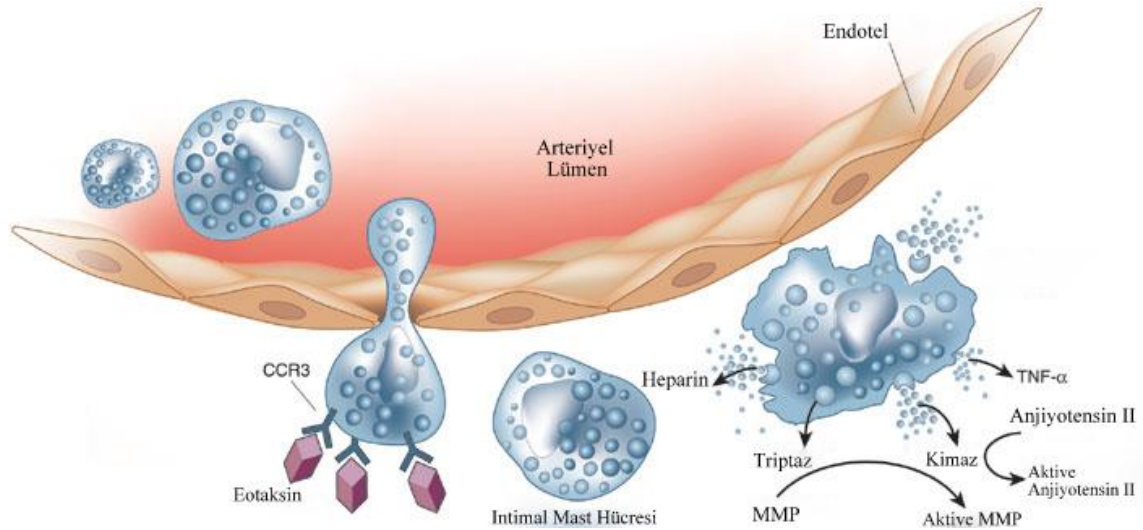


azaldığı gösterilmiştir [36]. VCAM-1' e ek olarak, P- ve E-selektinin de ateroskleroza duyarlı farelerde lökosit alımına katkı sağladığı düşünülmektedir [37, 38].

Aterojenik diyetin hemen arkasından başlayan VCAM-1'in indüklenme mekanizması, büyük olasılıkla hiperlipidemiye yanıt olarak arterin tunika intimasında toplanan modifiye lipoprotein partiküllerinin teşviki ile oluşan inflamasyona bağlıdır. Lipoprotein partiküllerinin bileşenleri, oksitlenmiş fosfolipidler ve lipoprotein oksidasyonu sonucu açığa çıkan kısa-zincir aldehitler, NF- $\kappa$ B aracılı VCAM-1 geninin transkripsiyon aktivasyonunu indüklemektedir [39]. İnterlökin (IL) -1 $\beta$  veya tümör nekrozis faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflamatuvar stokinler de bu yol ile endotel hücrelerinde VCAM-1 ekspresyonunu indüklemektedir. Böylelikle, proinflamatuvar sitokinler, VCAM-1 ekspresyonu ve hiperkolesterolemi ile bağlantı kurulabilmektedir.

Lezyon formasyonu olan bölgelerde seçici olarak VCAM-1'in fokal ekspresyon mekanizması, son araştırmalarda yoğun olarak incelenmiştir. Deneysel bir çalışmanın sonucunda yeni bir fikir olan "atero-koruma" geleneksel bakış açısının üstünde durmaktadır. Arteryal ağacın ateroskerozdan korunan bölgeleri genellikle kan akımı nedeniyle shear stresi (kan akımının damarlara uyguladığı mekanik kayma kuvveti, çapraz basınç) yaşamaktadırlar. Arterlerin dallanma noktaları gibi lezyon formasyonu için predispozan olan bölgeleri laminar akımdan ziyade bozulma yaşamaktadır. Potansiyel olarak 'atero-koruma' özellikleri taşıyan genler, promotör bölgelerinde shear stres yanıt elemanları da bulundurmaktadır. Birçok atero-koruma geni inflamasyonu düzenleyebilmektedir. Örneğin; laminar akımın olduğu bölgelerde yüksek seviyelerde üretilen süperoksit dismutaz, oksidatif stres ile mücadele etmekte, VCAM-1 ekspresyonuna ve diğer inflamasyon yolaklarının aktive olmasına neden olmaktadır [40]. Aynı şekilde, başka bir shear stres regülasyonlu gen aracılığıyla endotel hücrelerinden nitrik oksit sentaz ile açığa çıkan nitrik oksit, vasküler inflamasyondaki transkripsiyonel kontrol noktası olan NF- $\kappa$ B aktivasyonunu da inhibe ederek VCAM-1 gen ekspresyonunu da inhibe etmektedir [12]. Laboratuvardan elde edilen sonuçlarla oluşan bu yeni anlayış; karakteristik olarak arterial ağaç içerisinde akımın bozulduğu bölgelere rağmen, benzer olarak hiperkolesterolemi gibi sıvı-faz risk faktörlerinin oluşumu ile aterom formasyonuna yönelim için potansiyel açıklama sağlamaktadır.

Morfolojik çalışmalar kanıtlamıştır ki; lökositler, endotelial hücelere bir kez yapışınca diyapedez yoluyla tunika intimaya girmektedirler. Lökositlerin bu endotel aracılı direkt migrasyon fenomeni, 100 yıldır bilinmekte ve son birkaç yıldır ise moleküler analizler ile çalışılmaktadır. Araştırmacılar, lökositleri kimyasal olarak çekerek arteryal tunika intimaya girmelerini sağlayan kemokin ailelerini tanımlamışlardır. Örneğin; Monosit kemoatraktant protein-1'in (MCP-1) insandaki ve deneysel ateromdaki aşırı ekspresyonu, mononükleer fagositlerin alımına, yeni oluşan ateromda karakteristik birikimine neden olmaktadır (Şekil 1). Son yapılan çalışmalarda, MCP-1 veya CCR2 eksikliği olan, apoE veya LDL protein reseptörlerini kodlayan genlerdeki eksiklik nedeniyle ateroskleroza duyarlı mutant farelerde fagosit kümelenmesindeki ve lokal lipid seviyelerindeki azalma gösterilmiştir [41, 42]. IL-8 de aterogenez sırasında benzer kemoatraktant role sahip olabilmektedir [43]. Aterom, lenfosit alımına neden olan bazı diğer kemokinleri aşırı olarak üretebilmektedir. Örneğin; interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) tarafından indüklenen CXC kemokinleri gibi [44] (Şekil 2). Mast hücrelerinin kemoatraktant şekilde aterom içinde bulunması da bu lezyonlarda aşırı üretilen bir CC kemokini olan eotaksine bağlı olabilir [45] (Şekil 2-2).



**Şekil 2-2: Mast Hücrelerinin Aterogenezdeki Toplanması ve Fonksiyonları.**

Ateromatöz plaklardaki lökosit infiltrasyonu küçük ama potansiyel olarak önemli mast hücreleri popülasyonunu içerir. Kemokin reseptörü olan CCR3 ile etkileşen bir kemoatraktan olan Eotaksin, özelleşmiş lökositlerin trans-endotelial göçüne aracılık edebilir. İntimada, mast hücreleri, preformed TNF- $\alpha$ , anti-koagulan ve düz kas hücrelerine potansiyel büyüme inhibitör etkileri olan heparin, serin proteinaz triptaz ve kimaz salgılayarak degranülasyona gidebilir. Bu proteinazlar inaktif zimojen formda MMP'leri proteolitik formlarına aktive edebilir. Kimaz ayrıca, prekürsörü olan anjiyotensin I'den aktif anjiyotensin üretebilir [33].

Monositler, arteriyel intima içerisinde bir kez yerleşik hale geldiğinde, makrofajlarda görülen morfolojik özelliklere sahip olmaya başlar ve en sonunda köpük hücreleri formuna geleceği bir dizi değişiklik yaşar. Monositler, Schavenger Reseptör A (SRA) ve CD36 gibi reseptörlerin üretimini artırır; sonrasında modifiye proteinleri özümser, sitoplazmik damlacıklar halinde toplanan kolesterol esterleri şekline getirir (Şekil 1). Köpük hücreleri olarak bilinen bu lipid yüklü makrofajlar, aterosklerotik lezyonların erken halidir. Makrofajlar, ateromda lezyon progresyonuna ve komplikasyonuna katılan birçok büyüme faktörü ve sitokinleri de salgılamaktadır. Ek olarak makrofajlar intima ile çoğalmaktadır.

Yapılan çalışmalarda makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF), monositin lipid yüklü makrofajlara dönüşümünde birçok basamağın aktivasyonunu stimüle edici aday olarak tanımlanmıştır. M-CSF, SRA'yı çoğaltarak bu hücrelerde sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin üretimini arttırmakta, ayrıca sağkalım ve ko-mitojenik stimülasyona neden olmaktadır. Hem deneysel hem de insan aterosklerotik plaklarının M-CSF'yi aşırı ürettiği gösterilmiştir [46, 47]. İnaktif M-CSF mutasyonuna sahip fareler ile yapılan çalışmalarda, fareler öncesinde aterosklerotik duyarlıklarına göre beslenmiş ve M-CSF'nin aterom lezyonların oluşumundaki rolünü test etmeye olanak sağlanmıştır. M-CSF olmayan farelerde, makrofaj kümelenmesinin belirgin olarak azaldığı ve lezyon gelişiminin geciktiği görülmüştür [48, 49]. Bu etki aynı şekilde hem apoE hem de LDL reseptör eksikliğinde de oluşmuş ve gen dozuna bağlı olarak gelişmiştir. Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör de (GMCSF) arteromdaki inflamasyonu teşvik edebilmektedir. GM-CSF mononükleer fagositlerin hayatta kalmasını desteklemektedir. Bu fagositler ise, insanlardaki plaklarda potansiyel olarak oksidatif stres ve inflamasyondan sorumlu olan Hipokloröz asit (HOCl) artışının kaynağı myeloperoksidaz enzimini içermektedir [50].

Yağlı çizgilerin formasyonundan sonra, yeni oluşan aterom daha karmaşık bir lezyona dönüşür ve bu da sonunda klinik belirtiler oluşturur. Bununla birlikte daha eski tartışmalarda, aterosklerozun progresyon ve komplikasyon fazlarını ayırmışken; günümüzde aterogenezin farklı özelliklerini oluşturan bariyerleri daha iyi tanımlıyoruz. Geleneksel bakış açısına göre, ekstraselüler matrikste bulunan ve plak içinde kümelenen düz kas hücrelerinin çoğalması ile yağlı çizgiler daha komplike olan ateromaya doğru değişir. Lezyon daha da irileşince, arteriyel lümen daralır ve klinik belirtiler ortaya

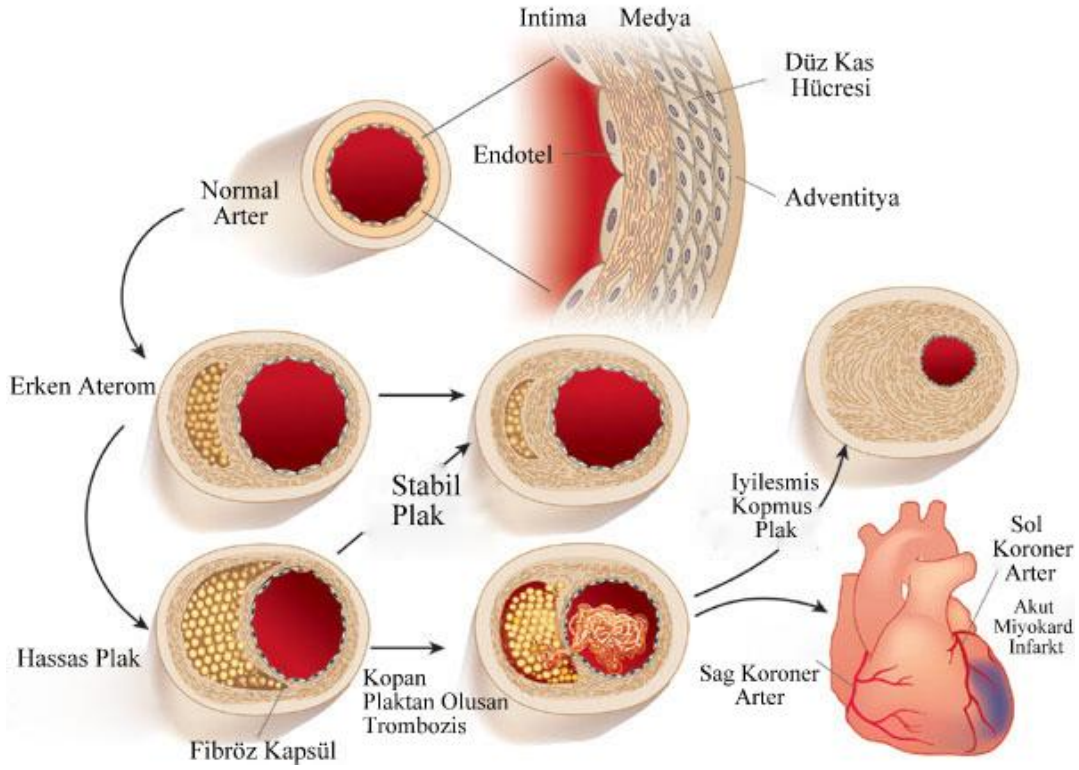
çıkmaya başlar. Bu belirtiler koroner akımda; stabil olmayan anjina pektoris veya akut MI'dır. İntimadaki makrofajlar tarafından hazırlanan büyüme faktörleri düz kasların çoğalmasını teşvik ederek lezyonun büyümesinden sorumludur. Klasik bakış açısına göre, bu süreç kaçınılmazdır ve zamanla ilerlemektedir.

Anjiyografik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, insanlardaki koroner arter lezyonlarında düzensiz şekilde stenozların geliştiğini göstermektedir [51]. İnsanlarda yapılan çalışmalarda, ateromdaki büyümeyi patlatan şey nasıl açıklanabilir? Aterosklerotik plakların mikroskobik olarak gözlenmesi bazı ipuçları verebilir. Var olan deliller, plakların parçalanmasının trombozlar tarafından tetiklenmesi ile gerçekleşebileceğini ve bunun da aterosklerotik lezyonun aniden genişlemesine neden olduğunu göstermektedir [52]. Üç farklı şekilde fiziksel parçalanma oluşabilmektedir [53].

Yüzeyesel erozyonlar veya intimadaki tek katlı endotel hücrelerinin mikroskopik olarak döküntü alanlarının oluşması, hem insanlarda hem de deneysel olarak tetiklenen hayvan modellerinde sıklıkla görülmektedir. Limitli endotel döküntüsünün olduğu bölgelerde plateletler için yuva oluşturmakta ve subendotelyal bölgedeki kollajen ve von Willebrand faktörü de plateletlerin aktivasyon ve adezyonunu teşvik etmektedir [23].

Aterosklerotik plaklar içerisindeki mikrodamarların parçalanması, ani plak progresyonunu açıklayan bir başka senaryodur [54]. Ateromda mikrovasküler kanallar oluşmaktadır. Aynı diabetik retinada olduğu gibi, plakta yeni oluşan damarlar kırılıgandır ve mikro-kanamalara meyillidir. İnsanlardaki aterogenez sırasında birçok kanıt, *in situ* trombozu desteklemektedir. Plak içinde fibrin, fibrinden ayrılan ürünler ve hemosiderin birikimi, plak içi kanamalar için kanıt oluşturmaktadır. *İn-situ* tromboz, trombin oluşumuna neden olur ki bu da ek olarak fibrinojen artışına; potansiyel olarak düz kas migrasyonuna ve proliferasyonuna neden olur. Trombin, plateletlerden PDGF gibi büyüme faktörlerinin salgılanmasını ve düz kas migrasyon ve proliferasyonunun ilerlemesini sağlar. Aktive olan plateletler aynı zamanda transforme edici büyüme faktörlerini (TGF- $\beta$ ) hazırlar. Bu büyüme faktörleri, düz kas hücrelerinde intersitisyel kollajen üretimi için en potent uyarıcılardır. Bu şekilde aterosklerotik intimadaki sessiz mikrovasküler kanamalar plağın gelişiminde büyümeyi hızlandırmaktadır.

Üçüncü ve en yaygın plak parçalanması ise; plağın fibröz şapkasının kırılması ve ayrıca inflamasyona dahil olmasıdır (Şekil 2-3).



**Şekil 2-3: Ateromun Yaşam Döngüsünün Şematik Gösterimi.**

Normal bir insan koroner arteri tipik trilaminer yapıya sahiptir. Kan ile temasta olan endotel hücreler bazal membran üstünde arteriyal lümeninde dinlenirler. Erişkin bireylerde intimal katman genellikle intimal ekstraselüler matris içine dağılmış olarak az miktarda düz kas hücreleri içerir. İnternal elastik lamina, tunika intima ile intimanın altında bulunan ortam arasında bariyer oluşturur. Bu alan, kollajen açısından olduğu gibi elastin açısından da zengin, düz kas hücrelerinden oluşan birden çok katmandan oluşur. Erken aterosklozda, inflammatuar hücrelerin toplanması (Şekil 1-3) ve lipid birikimi; lipid açısından zengin çekirdeğin oluşumuna neden olurken arter dışı doğru ablümenal bir yönde intimanın genişlemesiyle uyumlu bir şekilde genişler. Eğer inflammatuar durumlar baskın gelir ve dislipidemi gibi risk faktörleri direnç kazanırsa; IFN- $\gamma$  gibi proinflammatuar sitokinler yeni kollajenlerin sentezini limitlerken; lipid çekirdeği büyüyebilir ve aktif lökositlerce salgılanan proteinazlar ekstraselüler matrisi degrade edebilir. Bu değişiklikler fibröz başlığın incelmeye dolayısıyla kırılabilir bir hal olmasına neden olabilir ve kopmaya (rüptür) elverişli hale gelebilir. Plak rüptüre olduğunda plaktan gelen kan doku faktörüyle etkileşerek koagüle olur. Plateletler, koagülasyon kaskadı tarafından üretilen trombinle ve intimal kompartman teması ile aktive olur ve trombus oluşumunu harekete geçirir. Eğer trombus damarı sürekli olarak tıkarırsa akut MI gerçekleşebilir (alt sağda, sol ventrikülde anterior duvarda koyu mavi alan). Trombus eninde sonunda endojen ya da terapötik trombolizis ile resorbe edilebilir. Ancak, kan koagülasyonu sırasında oluşan trombin tarafından tetiklenen yara iyileşme cevabı, düz kas proliferasyonunu stimüle edebilir. Aktif plateletler tarafından salgılanan PDGF düz kas hücre göçünü stimüle eder. Aynı şekilde aktif plateletler tarafından salgılanan TFG- $\beta$ , interstisyel kollajen üretimini stimüle eder. Bu artan göç, proliferasyon ve düz kas hücreleri tarafından ekstraselüler matris sentezi; fibröz başlığın kalınlaşmasına ve intimanın genellikle içe doğru olacak şekilde daha ileri derecede genişlemesine sebep olarak lümenin konstriksiyonuna neden olur. Lümeneye taşınan fibröz plak tarafından üretilen stenotik lezyonlar; özellikle artmış kardiyak ihtiyaç durumlarında akışı sınırlayabilir ve anjina pectoris gibi semptomları tetikleyerek iskemiye sebep olabilir. Daha fibröz olan gelişmiş stenotik plaklar; kopmaya ve yenilenmiş trombozise daha az duyarlı olabilir. Lipid seviyesini düşürmek lipid bileşenleri azaltabilir ve intimal inflammatuar yanıtı yatıştırabilir; böylece kalın fibröz başlık ile birlikte daha stabil bir plak ve korunmuş lümen (merkez) oluşabilir [33]

Plağın fibroz şapkası, ateromun trombojenik lipidden zengin çekirdeği ile dolaşımında koagülasyon proteinlerini içeren kan akımını birbirinden ayırmaktadır. Fibroz şapkadaki yırtık, koagülasyon faktörlerinin doku faktörleri ile temasına neden olur; temel öncü trombotik uyarıcı lezyonu lipid çekirdeğinde bulunmaktadır. Bununla birlikte fibroz şapkalardaki yırtıklar, bazı akut MI'ların  $\frac{3}{4}$ ' ünü oluşturmakta ve diğer plak parçalanmaları gibi çoğu zaman klinik bir belirti vermemektedir. Geçerli olan fibrinolitik mekanizmalar, pro-koagülant yollara ağır bastığında, tıkaçıcı ve sürekli kan tıkaçlarından çok sınırlı mural trombus oluşumu gerçekleştirir. İyileşme; buna rağmen mural trombusun emilimi ve PDGF ve de anti-inflamatuvar mediyatör TGF- $\beta$ 'nın birlikte salınımı iyileşme yanıtını başlatarak fibroz doku formasyonuna öncülük eder. Sonuç olarak düz kas kümeleşmesi ve kollajen akreditasyonu yağlı lezyonun daha fibroz özellikte gelişmesine neden olur (Şekil 4).

Bu örnekler tromboz ve lezyon ilerleyişinin, iç içe girmiş bağlantılarını göstermektedir. Genellikle klinik eşğin altında, lezyonun gelişimi sessiz gerçekleşir ve yağlı şekilden fibröz aterosklerotik plağa değişim olur.

Aterosklerotik plaklardaki yüzeysel erozyonların mekanizmaları ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır. Endotellerde inflamasyon, iki yol ile gerçekleşebilmektedir. Birincisi, apoptoz ile veya T hücreleri tarafından aktive olan sitolitik atak ile gerçekleşen endotel hücre ölümü, lokal inflamasyon mediyatörlerinin oluşumuna neden olabilir. Ek olarak, inflamatuvar mediyatörler ve okside olmuş lipoproteinler; sub-endotelial zemindeki membranın birleşenlerini degrade eden matriks metalloproteinazların (MMP) üretimini ve aktivasyonunu uyarabilmektedir [55]. Böylelikle inflamasyon, endotel hücrelerden salınan enzimler ile ekstraselüler matriks bileşenlerinin degrade olması ile uyarılır. Bu durumda inflamasyon endotel kaybına neden olmakta, bu da yüzeysel erozyonun belirleyici özelliğini oluşturmaktadır. Ateromdaki mikro damarların formasyon mekanizmaları anjiyogenezin diğer bölgeleri ile benzerlik göstermektedir. Düz kas hücreleri için büyüme faktörlerinin salgılanmasına ek olarak makrofajların da dahil olduğu plak içindeki inflamatuvar hücreler asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi anjiyogenik mediyatörler üretmektedirler [56, 57] Plakların içindeki mikro damarlar, sadece *in situ* trombozda kanama bölgesi olarak değil, aynı zamanda plağın büyümesi için beslenme fonksiyonuna da sahiptirler. Aslında,

anjyogenezin inhibe edilmesinin, ateroskleroza yatkın farelerde mikro damar formasyonunu ve lezyon gelişimini sekteye uğrattığı görülmüştür [58]. Plakların mikrovaskülarizasyonu, lezyon gelişimini 2 yolla teşvik edebilmektedir. Plak anjyogenezinin teşvik edilmesinin potansiyel advers etkileri, terapötik amaçlı olarak iskemik kalplerde anjyogenezin teşvik edilmesine ihtiyaç duyulduğunda düşünülmelidir.

Plak parçalanmaları arasında en çok fibröz şapkanın kırılması anlaşılmıştır. İntersitisyel kollajen, fibröz şapkanın gerilim kuvvetinin çoğunu sağlamaktadır ve bu yapının sağlamlığı birkaç işlem ile yeterli kollajen miktarının sıkıca sağlanması ile gerçekleşir. IFN- $\gamma$  gibi belirli pro-inflamatuvar sitokinler düz kas hücrelerindeki kollajen üretimini inhibe etmektedirler. İntersitisyel kollajen fibrilleri genellikle proteolitik degradasyona dayanabilmekte ve sadece belirli kollajenlerde, kollajen içinde proteolitik çentikler oluşturmakta bu da üçlü helikal kollajen fibrillerinin oluşumuna neden olmaktadır.

İntersitisyel kollajendeki proteolitik çatlakın ardından, jelatinazlar kollajen katabolizmasına devam ederler. Aterom ekstraktları aktive olmuş 2 jelatinaz formlarını göstermektedir (MMP-2 ve MMP-9). Arterler MMP'lerin antagonistlerini endojen olarak üretirler ki bunlar da metaloproteinazların doku inhibitörleridir (TIMP). Bununla birlikte insan aterosklerotik plaklarında TIMP'lerin varlığına rağmen *in situ* olarak kollajen üretiminin arttığına dair kanıtlar vardır [59] Yapılan *in vitro* çalışmalarda, ateromda IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , ve CD40 ligand (CD154) gibi inflamatuvar mediyatörlerin düz kas hücreleri, endotelial hücreler ve mononükleer fagositlerdeki MMP üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Lezyondaki mast hücreleri hem MMP'yi indükleyen TNF- $\alpha$  hem de latent MMP proenzimlerini aktive eden serin proteinazları salgılamaktadır [60, 61] (Şekil 3).

Birbirine yakın çizgilerdeki kanıtlar, plağın fibröz şapkasındaki kollajen seviyelerinin dinamik regülasyonunu işaret etmektedir. İnflamasyon, intimada başladığında, düz kas hücreleri eksilen fibroz şapkayı onarmak ve sürdürülebilirliğini sağlamak için yeni kollajen üretimine ihtiyaç duyar. Bu sırada, kollajen degradasyonu, aktive MMP'lerinin aşırı üretimi ile artar. Net sonuç olarak; fibröz şapkanın kollajen matriksinin çözünmesi bu yapıyı zayıflatır ve hemodinamik stres ile oluşabilecek kırılmalara duyarlı hale getirir.

### 2.2.1. Ateroskleroz Patogenezinde İnflamasyon Tetikleyicileri

İnflamasyon konsepti, ateroskleroz patofizyolojisinde merkezi bir rol oluşturmakla birlikte, halen önemli faktörlerle ilgili bilgilerde eksiklikler mevcuttur. Ateroskleroza anlamak için yapılan çalışmalarla ilgili son 50 yıldaki ilerlemenin çoğu, lipid hipotezi üzerine olmuştur. LDL kolesterol birçok vakada ateroskleroz için şüphesiz önemlidir ve aterogenez için de bir risk faktörüdür. Bununla birlikte Amerika’da koroner arter hastalığına sahip birçok bireyin ortalama kolesterol seviyelerine sahip oldukları görülmüştür. LDL kolesterolü hedef alan etkili tedavilere rağmen, beş yıllık tedavi süresince koroner olayların en çok 1/3’ü önlenmektedir. Erken ya da uzun süren lipid-düşürücü tedavi uzun vadede aterosklerotik hastalık riskini rezidüel olarak düşürebilmektedir. Buna rağmen LDL kolesterol dışında risk faktörlerini de hedef alan tedavilerin ateroskleroza iyileştirme olasılıkları vardır.

Kolesterol dışında başka risk faktörlerinin de aterogenezdeki rolünü destekleyen güçlü kanıtlar bulunmaktadır ve daha detaylı incelenmeleri gerekmektedir. Örneğin risk faktörleri arasında; lipoprotein a, homosistein, Herpes virüsü ve *Chlamydia pneumonia* gibi enfeksiyöz ajanlar ve Anjiyotensin II (ATII) nedeni ile gelişen oksidatif stres bulunmaktadır. AT II, hem inflamasyonu hem de oksidasyonu uyarıcı etkisiyle hipertansiyon ve ona sıklıkla eşlik eden ateroskleroz arasında bağlantı kurmaktadır.

Tüm dünyada obezitenin epidemisi artmakta, hemen ardından insülin direnci ve diyabet takip ederek hepsi birlikte “metabolik sendrom” olarak isimlendirilerek, aterosklerozun risk faktörlerini oluşturmaktadır. Adipoz dokunun kendisi sitokinleri arttırarak insülin duyarlılığını kötüleştirir ve sistemik olarak inflamasyonu uyarabilir. Metabolik sendromda LDL seviyeleri ortalama düzeyde olmakla birlikte bazı küçük ve yoğun parçacıklar, oksidasyonu başlatabilir ve inflamasyonu arttırabilir. HDL’nin düşük seviyeleri ve sıklıkla eşlik eden yükselmiş trigliserid seviyeleri metabolik sendromda başka bir endojen anti-inflamatuvardır ve atero-koruyucu mekanizmaları arttırmaktadır [62]. HDL parçacıkları ateroskleroza karşı koruyucu etkilerine sadece tersine kolesterol taşıyıcı özelliği ile değil, paraoksanaz ve platelet aktive edici faktör asetil hidrolaz gibi antioksidan enzimlerin provizyonuna da sahiptir. Diyabetteki ısrarcı hiperglisemi glikasyonun son ürünlerinin formasyonu arttırmakta, bu da arteriyal inflamasyonu tetikleyen diğer bir unsuru oluşturmaktadır [63]. Böylelikle



LDL'ye ek olarak geleneksel olmayan diğer faktörler de aterogenezi, inflamasyonu arttırmak suretiyle şiddetlendirmektedir.

### **2.2.2. Aterosklerozda Tedavi Hedefi Olarak İnflamasyon**

İnflamasyonun aterogenezdeki yeni anlaşılan öncü rolü, yeni sorulara ve hastalığın tedavisinde ve korunmasında yeni fırsatlara neden olmaktadır. Aspirin ve beta bloker ilaçların bilinen rollerinin ötesinde, MI ve ölümlerdeki farmakolojik korunma yöntemleri ile ilgili büyük, iyi tasarlanmış, randomize ve kontrollü çalışmalar yakın zamanda yapılmaktadır. Yeni ilaç sınıfları içerisinde konu ile ilgili etkinlikleri gösterenler; statinler, ACE inhibitörleri, Anjiyotensin Reseptör Blokerleri (ARB) ve fibrinolitik asit türevleridir. Bu sınıftaki ilaçların klinik olarak başarılı olmaları, aterosklerozdaki inflamasyon biyolojisinin daha yoğun araştırılmasını teşvik etmiştir.

Örneğin statinler sadece kolesterol sentezini inhibe etmemekte ayrıca farnesil ve geranil fosfat gibi isoprenoid araçlarının da üretimini engellemektedir. Yapılan birçok laboratuvar çalışması statinlerin lipid düşürücü olmayan etkilerinin de klinik fayda sağlayabileceği öne sürmektedir. Bu sınıf ilaçların lökosit adezyonunu azaltmaları gibi antiinflamatuvar etkileri ve makrofaj aktivasyonunu antagonize etmek gibi olası 'pleotropik' etkileri bulunmaktadır [64].

Statinlerin direkt antiinflamatuvar etkilerinin hangi klinik faydaları sağladığı konusu halen tartışılmaktadır. Birçok in vitro çalışmada izole edilen hücrelerde statin ile indüklenen pro-aterojenik etkileri oluşturan ilaç konsantrasyonları, klinik olarak dokularda etkili olamamıştır. Sadece azalan LDL statinlerin tüm faydalarını saymak için yeterli olamamaktadır. Son yapılan çalışmalarda AT II sinyalini bozmaya yönelik faydalarının da tansiyon düşürücü etkiden sayılmayacağını göstermiştir. Gerçekte, AT II'nin etkileri vazokonstriksiyondan çok daha ötedir. Bazı bulgular, AT II'nin bir pro-inflamatuvar mediyatör olduğunu ve "onursal" sitokin olduğunu desteklemektedir. Örneğin bu peptid, endotel hücrelerinden VCAM-1 ve MCP-1 ekspresyonuna ve düz kas hücrelerinde ise IL-6 üretimine neden olmaktadır.

Gelecekte inflamatuvar yolların açığa çıkarılması, var olan tedavilere ek olarak inflamasyonun da direk olarak hedef alınmasını sağlayabilir. Enfeksiyöz ajanlar, NF-kB gibi inflamasyondaki temel sinyal mekanizmaları ve MMP'ler, adezyon molekülleri ve benzeri dış etmenler olabilecek potansiyel tedavi hedefleri arasındadır [33].

### 2.3. Bağlantı Kompleksleri ve Ateroskleroz

Aterosklerotik lezyon oluşumu; kan hücrelerinden olan monositlerin arteriyel intimada bir araya toplanmalarını, lipidlerin tutulumunu ve makrofaj köpük hücrelerine dönüşümünü içerir. Endotel hücreleri bu süreçte aktiftirler ve monositlerin bir araya toplanması sürecindeki farklı adımları düzenleyerek ateroskleroza katkıda bulunacak şekilde lökosit adezyon moleküllerini ve kemokinleri eksprese etmektedirler. Selektinler; lökosit tutulumundaki başlangıç ilişkilerini düzenlerler. Daha sonra kemokinler, lökositleri stimüle ederek ve VCAM-1 ve ICAM-1'e sırasıyla  $\alpha 4$  ve  $\beta 2$  integrin bağlanmasını arttırarak sonraki adımları düzenlemiş olurlar. VCAM-1 de ICAM-1 de yapısal ve fonksiyonel açıdan yakından ilişkilidirler. Her ikisi de lökosit integrinlerine bağlanan sitokin ile indüklenebilir Immünoglobulin gen süper ailesi üyesidirler. Normal fare ve tavşanlarda, ateroskleroza yatkınlığı olan aortik endotelyum kısımlarında hem VCAM-1 hem de ICAM-1 eksprese edilmektedir. Hiperkolesterolemik hayvanlarda, özellikle monosit adezyonunun minimal düzeyde olduğu periferdeki erken köpük hücre lezyonlarında her ikisi de yüksek miktarda salınmaktadır. Buna karşılık, VCAM-1, kendi ekspresyonunun çoğunlukla o lezyonla sınırlı olması açısından, ekspresyonu ilişkisiz aortaya ve hatta lezyondan korunmuş alanlara kadar uzanan ICAM-1'den farklı ve özeldir. İşte bu ekspresyon çeşitliliğindeki farklılıklar lezyon oluşumunda VCAM-1 ve ICAM-1 için farklı görevleri düşündürür.

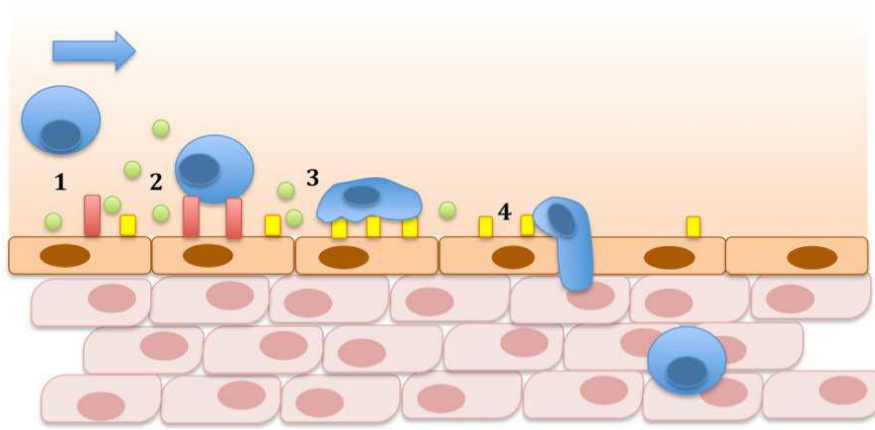
#### 2.3.1. ICAM-1

ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1=Hücrelerarası adezyon molekülü-1) ya da diğer bilinen adıyla CD54 (Cluster of Differentiation 54) insanlarda *ICAM-1* geni tarafından kodlanan bir proteindir [65, 66]. *ICAM-1* geni, tipik olarak endotel hücreleri ve immün sistem hücreleri üzerinde eksprese edilen bir hücre yüzey glikoproteinini kodlar. ICAM-1, CD11a/CD18 ya da CD11b/CD18 integrinlere bağlanır; ayrıca rhinovirüsler için bağlanma bölgesi oluşturacak biçimde reseptör görevi de görür.

ICAM-1, antikorlar ve T-hücre reseptör proteinlerini de içeren immünglobulin süperalesinin bir üyesidir. Moleküler ağırlığı, 80-114 kDa arasında değişir. Bu değişim, farklı hücre tiplerine göre belirlenir. Endotel hücreleri ve lökositler tarafından normal koşullarda bazal seviyelerde eksprese edilir. Ancak, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 ve LPS gibi

inflatuar uyarılar ile ekspresyonu artar [67-69]. IL-4 ve glikokortikoidlerle de ICAM-1 in yüksek orandaki ekspresyonu baskılanır [70, 71].

ICAM-1'in ana görevi, lökosit transendotelyal göçü ve antijen sunumu esnasında karakteristik olarak önemli bir rol alan sıkı adezyonu sağlamaktır. Diapedez olarak da bilinen lökositlerin hücre boyunca göçü 4 kısımda incelenebilir (Şekil 2-4) [72].



#### Şekil 2-4: Transmigrasyonun Dört Adımı

Yuvarlanma (1), Bağlanma (2), Adezyon (3) ve Transmigrasyon (4) [73]

İlk trans-göç adımı, selektin bağlanması ise düzenlenir. Bir hücreden uzanan selektinler, karşı hücrenin sialik asit içeren karbohidratı ile etkileşime girer. E- ve P-selektinler, endotel hücrelerinde var olup, lökositlerin ve P-selektin glikoprotein ligand - 1 üzerinde bulunan sialy Lewis x ile ilişkili karbohidratlara gevşekçe bağlıdır. L-selektin ise dolaşımdaki lökositlerin üzerinde olup, endotel hücrelerindeki CD-34, PSGL-1 ve sialy Lewis x ile bağlıdır. Lökositlerin endotel hücrelerine gevşekçe bağlanması, hücrelerin yavaşlayarak endotel boyunca yuvarlanmasına olanak sağlar. Ayrıca CCL-2, CXCL-8, CCL-5 ve CCL-3 gibi kemokinlere sunumu da kolaylaştırır. LAD2 hastalarındaki fukoz biyosentez eksikliği, karbohidrat ligandın bağlanması için önemli rol oynar. LAD2, LAD'ın daha ılımlı formu olsa da yine de immün sistemde selektin bağlanmasının önemini ortaya koyar [74].

Kemokinler, ikinci trans-göç basamağında görev alırlar. Yavaş yuvarlanan lökositler ise kemokin gradyanları tarafından disfonksiyonel endotel alanlarına yönlendirilirler. Kemokinlere maruziyet ise lökositlerdeki dış ve iç sinyal olaylarını

yönlendirerek integrin aktivasyonunu sağlar. Lökositlerin alana çekiminde ve CXCL-8 ile CCL-2'nin de dahil olduğu aktivasyonda kemokinler yer alır. Lökosit yüzeyinde aktive olan integrinler, böylelikle inflamasyonlu endotel alanında bulunan adezyon moleküllerine sıkıca bağlanabilirler. Kuvvetli adezyon; ICAM-1'in LFA-1'e, VCAM-1'in VLA-4'e ve MADCAM-1'in  $\alpha 4\beta 1$ 'e bağlanması ile sağlanır. Bu bağlanma endotelin tek katlı hücreleri içerisine trans-göç fırsatı olan alanları bulabilecek şekilde yayılmasına ve yavaşça göç etmesine imkân verir. ICAM-1'in bu migrasyon adımlarındaki önemi, anti ICAM-1 engelleyici antikolar ve endotel olmayan ICAM-1 içeren hücreler kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda gösterilmiştir [75-77].

Bağlantı proteinlerinden PECAM-1, E-Kaderin, bağlantı adezyon molekülleri ve CD99; endotel bağlantılarında bulunan proteinlerdir. Bu proteinlerin homofilik (PECAM-1, CD99 ve JAM'larda da olduğu gibi) ve heterofilik bağlantıları (JAM lar ile integrinler arasında olduğu gibi) sıkıca kenetlenmiş endotel hücreleri katmanlarının oldukça seçici bir şekilde oluşmasına imkan verir [78]. Lökositler, endotele sıkıca tutunduklarında mikrovili benzeri kıvrımlar (podozomlar) oluştururlar bu da endotel hücre yüzeyinin derinine inmeye imkan sağlar [79]. Bu yanaşma alanları ICAM-1'den, VCAM-1'den ve F-aktinden zengindir [80]. İntegrin bağlanması endotel hücrelerde sinyalizasyonu başlatır ki bu sinyalizasyon endotel hücrelerinde kasılmalara ve bağlantıda kurulmuş bağların gevşemesine yol açar. ICAM-1 eksik hücrelerde yapılan çalışmalar, trans-göçün azalsa da tamamen ortadan kalkmadığını göstermiştir. Bu durum son trans-göç basamağının CD-18'e benzer şekilde esansiyel olmadığını ortaya koymaktadır. Bağlantı adezyon molekül bağlarının serbestleşmesiyle lökositler dokuların içine göç edebilir hale gelirler [72].

ICAM-1'in hayati rol oynadığı başka bir önemli olay da immünolojik olaylardır. Bu olay, 3 farklı durum; bağlantı oluşumu, yeniden düzenleme ve kararlı immünolojik komplekslerin oluşumu ile karakterizedir. İlk adımdaki bağlantı oluşumu esnasında, antijen sunan hücreler ve T hücreleri arasındaki yakın temas; ICAM-1 ve LFA-1'in yardımları ile sağlanır. ICAM-1'in ligandına bağlanması sırasında T reseptörleri için yüzeyde bulunan CD45-CD43 glikoproteinlerinden kaynaklanan sterik engel aşılarak; Antigen Sunan Hücreler (APC)'ler yüzeyindeki MHC-peptidleri ile etkileşim sağlanır. TCR ve MHC- peptid kompleksleri arasındaki düşük affinite olayı ve iki hücre arasındaki etkileşim bu şekilde kalabilir. Eğer TCR ve MHC-peptid kompleksi

birbirlerine yüksek affinite gösterirlerse, sinyal yolağı tetiklenir, bu yolağın tetiklenmesi ilgili moleküllerin yeniden düzenlenmesine yol açar. TCR ve MHC- peptid kompleksleri içeriye, merkeze doğru hareketlenirken dışarıya doğru LFA-1/ICAM-1 moleküllerince etraflarında sıkı bir halka oluşturulur. Bu basamak ile kararlı immünolojik kompleksler oluşturulmuş olur. Yeniden düzenleme ve halka oluşumu sürecinde ICAM-1 polimerleşerek LFA-1'e daha yüksek affinite ile bağlanma gösterir. Buna ek olarak halka etrafına toplanmış TCR-MHC peptid kompleksleri hücreler ve sinyal yolakları ile optimal iletişimi sağlar. ICAM-1'in ayrıca MHC-1 ve MHC 2'ye seçili antijen sunumu esnasında yardımcı uyarıcı olarak görev aldığı bildirilmiştir. ICAM-1'in ateroskleroz alanlarında da bulunduğu ve aterosklerotik lezyon oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir. ICAM-1'in ateroskleroz üzerine etkisini araştırmak için yapılan çalışmada,, apoE-/- eksik farelerde lezyonun boyutlarının küçüldüğü bulunmuştur. Zamana bağlı yapılan analizlerde ICAM-1'in sadece başlangıç plak oluşumunu başlatmakla kalmadığı aynı zamanda farelerde görülen sonraki süreçlerde de yer aldığı ortaya çıkmış ve bu bilgiler apoE-/- eksik farelerin anti-ICAM-1 ile muamelesiyle antikörlerin nötrlendiği deneylerle desteklenmiştir [81].

### 2.3.2. VCAM-1

VCAM-1 (Vasküler hücre adezyon molekülü-1 ya da CD106 olarak da bilinir) insanlarda VCAM-1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. VCAM-1, hücre adezyon molekülü olarak görev yapar. VCAM-1 geni, altı ya da yedi Ig alt birimi içerir. Küçük ve büyük kan damarlarında bulunan endotel hücrelerinden sitokinlerle uyarım sonucu eksprese edilirler [36].

VCAM-1 temel olarak lenfositlerde, monositlerde ve eozinofillerde eksprese olan  $\alpha4\beta1$  integrini ile bağlanır. İlginç olarak VCAM-1,  $\alpha4\beta1$  integrinin durumuna göre hem yuvarlanan hem de sabit tip adezyonu düzenleyebilir (Şekil 2-1) [82]. ICAM-1 ile diğer endotelyal adezyon molekülleri yapısal olarak benzerlik gösterebilir de VCAM-1'in düzenlenme şekli eşsizdir. VCAM-1 normal durumlarda eksprese edilmez ama tavşanlarda, farelerde ve insanlarda erken lezyonları kapsayan pro-aterosklerotik durumlarda ekspresyonu hızla artar [36, 83, 84]. İlk yapılan çalışmalarda, VCAM-1'in aterogenezi gösteren bir belirteç mi yoksa hastalık yolağında görevli bir molekül mü olduğu açıklığa kavuşturulamamıştır. Sitokin ile aktive edilen endotel hücre kültürü çalışmalarında ve saflaştırılmış rekombinant VCAM-1 protein ile yapılan model

çalışmalarda VCAM-1'in  $\alpha4\beta1$  eksprese eden hücrelerin adezyonunu güçlü bir şekilde düzenlediği ve hatta shear-etkisi altında bile bunu yapabildiği iddia edilmiştir. Ancak adezyonun ateroskleroza yatkın insan ve hayvanların büyük arterlerinde sadece *in vivo* olarak mı gerçekleştiği aydınlatılamamıştır.

Dolaylı bulgularla, apoE-/- eksik farelerdeki *in vivo* alışmalarda gösterildiği üzere VCAM-1'in patogenezdeki rolünün, peritonel makrofajların aterosklerotik lezyonlara toplanmasının  $\alpha4$  antikoru ile engellenmesi şeklinde olduğu bulunmuştur. Bu bilgi daha sonra, aterosklerotik diyet ile beslenen farelerde ligand bağlanmasını engelleyen küçük peptidlerin kronik olarak uygulanması ile  $\alpha4\beta1$  ligand bağlanmasının gecikmesinin gösterilmesi ise desteklenmiştir. Bununla beraber, bu çalışmanın yorumlanması aktif endotel hücrelerinin,  $\alpha4\beta1$  integrinleri bağlanması için alternatif kırılma ile oluşmuş fibronektin CS-1 peptidi içeren ikinci bir ligand eksprese etmeleri sebebiyle oldukça karışıktır [85]. Fibronektine  $\alpha4\beta1$  aracılığı ile gerçekleştirilen adezyon da aynı peptid ile bloke edilir, bazı kùltüre edilen endotel hücrelerinde sadece fibronektin ekspresyonu varken, VCAM-1 ekspresyonu yoktur. apoE-/- eksik farelerden elde edilmiş perfüze karotid arterin kullanıldığı başka çalışmalarda  $\alpha4\beta1$  ve VCAM-1 etkileşiminin monositlerin göçünü azalttığı ve VCAM-1'in monosit adezyonunu ve ateroskleroza meyilli damar duvarlarında monosit adezyonunu arttırdığı gösterilmiştir [86]. Bu alışmalar, VCAM-1'in rolü için hüküm vermede yeterli değildir. Bu, ancak VCAM-1 knock out fareler ile çalışılarak gerçekleştirilebilir.

VCAM-1'e atfedilen bu önemden dolayı, ateroskleroz ve diğer inflamatuvar hastalıklar için knock out stratejiler daha önceden geliştirilmişti. Ancak, null alleli olan homozigot döl üretimi ya çok az başarıyla ya da başarısızlıkla sonuçlanmıştır; çünkü VCAM-1'in  $\alpha4\beta1$  ile olan ilişkisi sağlıklı bir koryo-allontorik gelişim için gerekmektedir [87]. VCAM-1 eksik fareler üretilemese de diğer birçok adezyon molekùlü eksik fare modelleri aterosklerozda başarıyla test edilmiştir. ikolatanın da içinde yer aldığı yüksek kolesterol içerikli diyet ile beslenen C57BL/6 fare modellerinde Nageh ve arkadaşları aortik lezyon büyüklüğünün ICAM-1, P-selektin eksik farelerde ya da  $\beta2$  integrinin alt ünitesi olan CD18'i kodlayan genlerde hipomorfik mutasyon olduğunda azaldığını göstermişlerdir [88]. Ateroskleroz için daha gerçekçi bir model olarak kolesterol seviyesi 500-2000 mg/dl arasında değişen apoE eksik farelerde, verilen diyete bağlı olarak P-selektin ya da ICAM-1 eksik hayvanlarda daha küçük

aortik lezyonlar gözlemlenmiştir [89, 90]. LDL reseptörü knock-out farelerden oluşan daha ılımlı bir modelde P-selektin eksikliğinin sadece erkek farelerde ılımlı düzeyde yararlı olduğu gösterilmiş, dişilerde bu yarar tespit edilememiştir [37].

Yapılan çalışmada, ilk defa VCAM-1'in LDL reseptörü eksik fare modellerinde aterosklerotik lezyon gelişiminde önemli olduğu gösterilmiştir [36]. Bu, pro-aterojenik diyetle beslenmiş ve LDL reseptörü olmayan farelerin, insan ateroskleroza ve lezyon gelişiminin gösterilmesinde kullanımının iyi bir model olduğunun gösterilmesi açısından önemlidir. VCAM-1 -/- modeli yaşayabilen döllerin artırılması için Cybulsky ve arkadaşları VCAM-1'in iki ligand bağlama alanından sadece bir tanesini çıkararak D4D mutasyonu yaratmışlardır. Bu mutant VCAM-1'in dördüncü domainin eksik olduğu tip olup, ekspresyonu VCAM-1'in yaban tipine göre çok azdır ancak bu türe bağlı olmakla beraber homozigot mutant farelerin %6-24'lük bir kısmının doğum ve sonrasında hayatta kalmasına yetecek kadar fonksiyon göstermektedir. VCAM-1 D4D/D4D LDLR-/- eksik farelerde aterosklerozdan korunma derecesinin, test edilen LDL reseptörü eksik diğer modellerde daha kuvvetli olması VCAM-1'in bilakis aterosklerotik lezyon oluşumunda doğrudan etkili oldukça önemli bir gen ürünü olduğunu ortaya koymaktadır. Araştırmacılar aynı modelde, ICAM-1'de oluşturulan hipomorfik mutasyonun ne lezyon büyüklüğü üzerine ne tek başına ne de VCAM 4D/4D mutasyonu ile beraber kombin edildiğinde lezyon üzerine hiçbir etkisi olmadığını göstermişlerdir.

Elbette bu işaretli çalışmalar da sınırsız değildir. İlk olarak fareler homojen fare soylarına tam olarak geri çaprazlanamamıştır. VCAM-1 4D/4D eksik döllerin sadece %6'sının C57BL/6 soyunda yaşayabilmesi anlamlı bir çalışma yapmaya yetmemektedir. Şartlandırılmış VCAM-1 eksik farelerin, ölüm gerçekleşmesi ile karakterize probleme nasıl çözüm olabileceği anlatılmış olsa da ateroskleroz modellerinde henüz test edilmemiştir [91, 92]. Öncelikle uyarılabilen ve dokuya spesifik VCAM-1 eksik farelerin LDL reseptörü eksik farelerle çaprazlanmasıyla oluşturulacak mutantların aydınlatıcı sonuçları olması mümkündür. İkinci olarak, LDL reseptörün knock-out edilmesi her ne kadar iyi bir model gibi görünse de aslında kusursuz değildir. Örneğin bu farelerdeki artmış kolesterol, LDL'deki artıştan değil VLDL'deki artıştan kaynaklıdır. İnsanlarda VLDL değil LDL, aterosklerozdaki önemli risk faktörlerinden biri sayılmaktadır.

Yapılan çalışmada, aterosklerotik lezyon oluşumunun ötesinde VCAM-1'in restenoz oluşumunda oldukça ciddi bir yeri olan arteryal hasar sonrası neointima oluşumunda önemli olduğu söylenmiştir. Tel ile oluşturulmuş hasar modelinde VCAM-1 ekspresyonunun neointimal düz kas hücrelerinde fazlasıyla eksprese edilmiş ve VCAM-1 antikollarının neointimal oluşuma karşı koruyucu olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, VCAM-1'in neointima oluşumuna hasarlanmış arter ya da düz kas hücre proliferasyonuna direkt etki ederek ya da belki de monosit infiltrasyonunu kolaylaştırarak katıldığı anlamına gelebilir [93]. Bu ihtimaller VCAM-1 bağımlı hastalık modelleri çalışılarak tespit edilebilir. Bu yeni VCAM-1 mutantlarının varlığı yeni çalışmalar içinde perspektifler açarak deneysel olarak oluşturulmuş otoimmün ensefalit, çeşitli inflamatuvar kalın barsak hastalıkları ve çeşitli artrit modelleri gibi başka VCAM-1 bağımlı hastalık modellerinde de kullanılabilir. Aslında VCAM-1 allelinin null mutasyon yerine hipomorfik olması durumu, tamamlanmamış VCAM-1 blokajını taklit etmede daha iyi olması açısından terapötik kullanımlarda bir avantaj olarak da görülebilir. Bu tip fareler, vasküler ve inflamasyon hastalıklarda oldukça değerli bir araç olacağı öngörülmektedir [93].

#### 2.4. NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B, (Aktive B hücreleri Nükleer faktör kappa hafif zincir artırıcı) DNA transkripsiyonunu kontrol edebilen bir protein kompleksidir. NF- $\kappa$ B hemen hemen tüm hayvan hücrelerinde bulunmaktadır. Stres, sitokinler, serbest radikaller, UV ışınımı, okside LDL, bakteriyel ya da viral antijenlere karşı hücresel yanıtlarda önemli bir rol almaktadır [94-97]. NF- $\kappa$ B, enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önemli roller üstlenir ( $\kappa$  hafif zinciri, Ig'lerin önemli bileşenleridir). NF- $\kappa$ B protein/proteinlerinin hatalı düzenlenmesi; kanser, inflamatuvar ve otoimmün hastalıklar, septik şok, viral enfeksiyon ve hatalı immün gelişim ile bağdaştırılmıştır. NF- $\kappa$ B'nin aynı zamanda sinaptik plastisite ve hafıza süreçlerine de etkisi olduğu bildirilmiştir. Kısacası NF- $\kappa$ B; sitokin üretimi ile ilgili süreç ve hücre sağkalımı için kilit rol oynayan bir proteindir [98-101].

NF- $\kappa$ B'nin tüm proteinleri, N-terminallerinde Rel homoloji bölgesi taşır. RelA, RelB ve c-Rel içeren alt aile, C-terminalinde transaktivasyon bölgesi içerir. NF- $\kappa$ B1 ve NF- $\kappa$ B2, büyük prekürsörler halinde sentez edilir (p100-105) daha sonra bunlar, olgun NF- $\kappa$ B p50 ve p52'yi oluştururlar. p100 ve p105'in işlenmesi, C-terminal bölgesindeki



ankyrince zengin tekrarların ubiquitin proteozom sisteminde indirgenmesi ile olur. p52, p100 den, p50 de p105'ten oluşturulur. p50 ve p52'nin transkripsiyonu aktive etme özelliği yoktur;  $\kappa$ B elementleri homodimer olarak bağlandığında, transkripsiyon represörü olarak iş gördükleri düşünülmektedir. Yapılan nakavt çalışmaları da bunu doğrulamaktadır [102-105].

NF- $\kappa$ B; inflamasyon başlangıcı ve düzenlenmesinde, doğal ve adaptif bağışıklık sisteminde, hücrelerin proliferasyonunda ve devamlılığında rol alan bir transkripsiyon faktörüdür. NF- $\kappa$ B ilk defa Ig hafif zincir geninde  $\kappa$ B alanı olarak bilinen spesifik DNA bölgesine bağlanan bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır [106]. Keşfinde ilk olarak bu transkripsiyon faktörünün, sadece B hücrelerinin olgunlaşması ve gelişimi için önemli olduğu düşünülmesi nedeniyle NF- $\kappa$ B olarak adlandırılmıştır. Sonradan yapılan çalışmalarda, NF- $\kappa$ B'nin tek bir protein olmadığı, transkripsiyon faktörü olarak rol oynayan bir protein kompleksi olduğu anlaşılmıştır [107]. Yapılan çalışmalar, NF- $\kappa$ B'nin sadece B hücresine spesifik bir protein olmayıp gerçekte bir pleotropik ve latent sitoplazmik transkripsiyon faktör prototipi olduğunu göstermiştir [108]. Bağışıklık sisteminde önemli bir düzenleyici rol üstlendiğinden ötürü; *Drosophila melanogaster* 'den insana kadar hemen hemen tüm çok hücreli canlılarda bulunmaktadır [109].

İki ayrı NF- $\kappa$ B sinyal yolağı bilinmektedir. Bunlardan birisi standart, bir diğeri standart olmayan sinyal yolağıdır. Birincisi standart IKK kompleksi IKK2 (IKK $\beta$ ) proteininden oluşur ve NF- $\kappa$ B esansiyel modulator protein (NEMO ya da IKK $\gamma$  olarak da bilinir) tarafından düzenlenir. Standart NF- $\kappa$ B yolu IKK kompleksini içeren IKK2'yi indüklemek için bir çok inflamatuvar uyarınca tetiklenir. Bu kompleks 3 standart IKB proteinini fosforile eder. Fosforilasyon sonucu cRel/Rel A dimerleri nükleusa transloke olabilmek ve genleri aktive edebilmek için salınırlar. Standart olmayan IKK kompleksi ise yalnızca IKK1 (IKK $\alpha$ ) homodimerinden oluşur. Standart olmayan yol, IKK1 tarafından düzenlenir ve RelB dimerlerini nükleusa salmak için p52 /p100 dimer oluşum sürecini indükler. Hem standart, hem standart olmayan yollar, immün sistem fonksiyonunda önemli rol oynarlar ancak ikisinin rolleri birbirlerinden farklıdır. Standart yol, proliferasyon ve apoptoz kontrolünün yanında inflamasyonun düzenlenmesinden sorumluyken, standart olmayan yol immün yanıtta etki sağlayan lenfoid organ gelişiminden sorumludur. Bu yolların biyokimyasal özellikleri de birbirlerinden farklıdır. Standart yol, dakikalar içinde yanıt sağlayarak hızlı etki gösterir

ve çoklu negatif geribildirim mekanizmasına sahip olduğundan geri dönüştürülebilir bir yoldur. Ancak standart olmayan yol saatlerce ya da günlerce süren oldukça yavaş gerçekleşen bir yolaktır [110].

Standart NF- $\kappa$ B sinyal yolunda, patojen temelli lipopolisakkaritler (LPS), TNF, IL-1 benzeri sitokinler gibi proinflamatuvar uyaranlar ile çoğu hücre tipinde NF- $\kappa$ B aktivitesi uyarılır [111]. İlk NF- $\kappa$ B izoformu; klasik NF- $\kappa$ B olarak da bilinen p50:RelA dimeridir. Bu dimer,  $\kappa$ B elementleri tarafından düzenlenen genlerin güçlü bir transkripsiyonel aktivatörüdür. p50:RelA dimeri, uyarılmamış olan hücrelerde bulunur. Ancak DNA bağlayıcı aktivitesi, IKB tarafından inhibe edilmektedir. İnflamatuvar uyarımda, standart IKB proteinleri olan IKB $\alpha$ , IKB $\beta$  ve IKB $\epsilon$ ; IKK kompleksince fosforile edilirler. Bu IKK kompleksi, IKK $\alpha$  ve IKK $\beta$ 'dan oluşan iki katalitik alt üniteden ve bir regülatör protein olan ve NEMO olarak da bilinen IKK $\gamma$ ' dan oluşur. Aktivasyonun ilk aşamasında, standart IKK kompleksi, kalan iki spesifik serin ile IKB $\alpha$ , IKB $\beta$ , IKB $\epsilon$  proteinlerini fosforile eder. IKB $\alpha$  (NF-  $\kappa$ B1A) çoğu hücrede en sık bulunan IKB proteinidir. IKB $\beta$ 'nın Ser32 ve 36 üzerindeki fosforilasyonu sonucu, E3 ubiquitin ligaz  $\beta$  tarafından ubikütinasyonu düzenlenir ve proteinin degradasyonu gerçekleşir.

IKB $\alpha$  degradasyonu ise, RelA:p50 dimerini serbest bırakır; bu da serbest kalan RelA:p50 dimerinin DNA'ya bağlaması için nükleusa lokalize olmasını sağlayarak, gen ekspresyonunu aktifler [112, 113]. Serbest olan dimerler, DNA bağlamaya ve genleri aktif hale getirmeye eğilimlidirler. Yapılan ilk çalışmalarda, IKB $\beta$  proteinlerinin; NF- $\kappa$ B dimerlerinin nükleer translokasyonunu inhibe ettiğini düşünülürken, artık dimerlerin nükleer ve sitoplazmik kısımlar arasında, IKB $\alpha$  ve IKB $\epsilon$ 'a bağımlı durumda olduğu net bir biçimde ifade edilmektedir [114, 115].

Standart NF- $\kappa$ B'nin başlangıcı hızlıdır ve *de novo* protein sentezine ihtiyaç duymaz. Nükleer NF- $\kappa$ B aktivitesindeki artış, dakikalar içinde belirlenebilir ve bazı NF- $\kappa$ B yanıt promotörleri anında indüklenir. İlk promotör yanıtta birisi IKB $\alpha$ 'dır. IKB $\alpha$  negatif feedback mekanizmasını yönetir. Feedback mekanizması, uyaranları yok etmede NF- $\kappa$ B baskılanmasından sorumludur ve kronik stimülasyon süresince, NF- $\kappa$ B aktivitesiyle sonuçlanır. Ancak IKB $\alpha$ 'nın neden olduğu negatif feedback, IKB $\epsilon$  tarafından yönetilen ikinci negatif feedback mekanizması ile önlenir [116, 117].

Standart olmayan NF- $\kappa$ B yolağı ise, farklı birçok hücre tipinde inflamatuvar olmayan uyaranların sinyal mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir. TNF ailesinden olan B

hücre aktivator faktörü (BAFF) ve dalakta bulunan lemfotoksin B (LTB) sinyallerinin de NF- $\kappa$ B aktivasyonunda rol aldığı bildirilmiştir [112, 118]. BAFF ve LTB gibi uyarılar, NF- $\kappa$ B indükleyici kinazın (NIK) aktivasyonunu sağlar böylelikle NIK, IKK $\alpha$  homodimerini de aktifler. Sonuç olarak, IKK kompleksinin aktivasyonu, aktive olmamış NF- $\kappa$ B p100/RelB dimerinin fosforilizasyonuna neden olur. Böylelikle p50/RelB; dimer şeklini alır, aktif NF- $\kappa$ B dimeri nukleusa geçer ve gen transkripsiyonunu değiştirir [113].

Standart olmayan NF- $\kappa$ B aktivasyon süreci, standart aktivasyon sürecine göre daha uzun sürmektedir. Bununla birlikte, standart olmayan yolağın negatif feedback mekanizmasının standart yolağa göre daha az güçlü olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda RelB içeren dimerlerin, standart IKB proteinlerine yüksek afinitesi yoktur [112].

#### **2.4.1. NF- $\kappa$ B ve Ateroskleroz**

Yapılan son çalışmaların da ortaya koyduğu üzere, inhibitör IKB'nin salındığı durumlarda transkripsiyon faktörü NF- $\kappa$ B aktif olmuş halde bulunarak, aterosklerotik lezyonlarda DNA'ya bağlanabilmektedir. Örneğin, elektroforetik mobilite değişim yöntemi [EMSA; bu yöntemde izole edilmiş çekirdek proteinleri, radyoaktif işaretli oligonükleotid içeren bir protein/DNA alanına bağlanır, örneğimizde  $\kappa$ B] kullanılan deneylerde, aterosklerotik alanlarda, ateroskleroz olmayan alanlara göre dokudaki NF- $\kappa$ B aktivasyonunda anlamlı bir artış tespit edilmiştir [119].

Yapılan in vitro çalışmalarda, aterosklerotik lezyonlarda, TNF- $\alpha$  ve IL -1 gibi birçok sitokinin NF- $\kappa$ B'yi aktive edebildiği ortaya konmuştur [120, 121]. Aterogenez oluşumunda anahtar faktörler olan bu sitokinler; monosit/makrofaj, düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve lenfositlerce üretebilmektedirler. NF- $\kappa$ B'nin artmış aktivasyonu ya da NF- $\kappa$ B'ye bağlı olarak artmış TNF- $\alpha$  ya da IL-1'den oluşan kısır döngü, otokrin mekanizmalar tarafından da tetiklenebilir [122]. Aterogenezde yer alan fibronektin gibi diğer faktörlerin de NF- $\kappa$ B aktivasyonunu artırdığı hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir [123].

Aterosklerotik lezyonların erken ve ilerlemiş durumlarında majör komponent olarak tespit edilmiş olan okside düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) de NF- $\kappa$ B aktivasyonunu modüle edilebilmektedir. Kültüre alınmış endotel hücreleri ve monosit/makrofajlarda minimal ya da daha ileri seviyelerde okside olmuş oxLDL ile

inkübasyon, NF- $\kappa$ B'yi aktive etmektedir. Ayrıca reaktif oksijen ara ürünleri olarak bilinen, oksijenin serbest radikalleri ile karakterize oksidatif stresin de NF- $\kappa$ B'nin potansiyel stimulatörü olduğu ve buna zıt olarak belli başlı antioksidanların da NF- $\kappa$ B sisteminin potansiyel inhibitörü olduğu ifade edilmelidir [124-126].

EMSA yöntemindeki nükleer proteinlerin uygun antikorlarla inkübe edilerek elektroforetik mobilitelerinin değiştirildiği bir tür modifikasyon işlemi ile yapılan "supershift" yöntemi ile de oxLDL'nin ağırlıklı olarak p50/p65 içeren NF- $\kappa$ B dimerlerini aktive etmekte olduğu gösterilmiştir. Hidrojen peroksidin son zamanlarda NF- $\kappa$ B'yi uyaran intrasellüler ikincil mesajcı molekül olduğu iddia edilmiştir. İlginç olarak, lipoproteinlerle gerçekleştirilen NF- $\kappa$ B aktivasyonu, sitokrom oksidaz P450 inhibitörü SKF525a, antioksidan özellikte olan ve hidrojen peroksit scavenger olan pyrrolidine dithiocarbamate ile inhibisyona uğramaktadır. Bu açıdan oxLDL sitokrom P450 bağlı yolağı indüklemek suretiyle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> üretimine sebep olarak NF- $\kappa$ B aktivasyonunu arttırıyor olabilir [127]. Buna zıt olarak başka deneylerde makrofaj ve düz kas hücrelerinde lipopolisakkarit ile indüklenen NF- $\kappa$ B aktivasyonunun oxLDL ile inhibe edildiği gösterilmiştir [128, 129]. Farklı olarak bu deneylerde hücreler, lipopolisakkaritlerle uyarım öncesinde, ya daha uzun sürelerde ya da pre-inkübasyon basamağıyla oxLDL ile muamele edilmişlerdir. Bu sonuçlar, aynı zamanda, NF- $\kappa$ B aktivasyonunun tespit edildiği çok sayıda makrofaj ve düz kas hücresinde yapılan, dokuda boyama teknikleri ile de desteklenmiş; ancak lezyona komşu olan tüm hücrelerde aktivasyon görülmemiştir [119].

oxLDL'nin aktive edici ya da inhibe edici çeşitli etkilerini yansıtmak üzere; NF- $\kappa$ B hedef genlerinin ekspresyonu ile yapılan deneylerde, lipoproteinler tarafından düzenlenen NF- $\kappa$ B aktivasyonu ile ilgili çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Eldeki veriler ışığında, NF- $\kappa$ B'nin aterosklerozdaki rolü için özelleşmiş bir düzenleme şekli önerilmiştir.

Başlangıç fazında NF- $\kappa$ B, aterosklerotik lezyonlarda ya da bu lezyonlara komşu olan alanlardadır; TNF- $\alpha$ , IL-1, modifiye lipoproteinler ya da fibronektinler ile stimüle olan monosit/makrofaj, endotel hücrelerinde ve düz kas hücrelerinde ise aktive olmaktadır. Bu hücrelerin OxLDL'ye uzun süreli maruziyeti, makrofajlarda ya da düz kas hücrelerindeki gen ekspresyonunda önemli derecede inhibitör etkilere yol açar. NF- $\kappa$ B transkripsiyonel sistemindeki regülasyon bozukluğu ise makrofaj ve düz kas

hücrelerinde köpük hücre oluşumu esnasındaki gen ekspresyon bozukluğuna katkı sağlamaktadır [130, 131]. Ayrıca; endotel hücrelerindeki NF-κB aktivasyonu, ateroskleroz patogenezinde özellikle de hastalığın erken evresinde önemli rol oynamaktadır. Kan hücreleri ile endotelin ilişkisinde yer alan ICAM-1, VCAM-1 ve ELAM-1 gibi birçok adezyon molekülünün NF-κB ile regüle edildiği kültürde gösterilmiştir [122, 132]. Aktif NF-κB, endotel hücrelerden lökositlerin lezyonlara saldırmasını sağlayan kemotaktik substrat MCP-1 gibi substratların üretimini de düzenlemektedir [132]. Son çalışmalar, NO'nin NF-κB aktivasyonunu ve NF-κB hedef gen CSF aktivasyonunu engelleyebildiğini ortaya koymuştur. NO'nin NF-κB'nin anti-aterojenik özelliklerine katkıda bulunduğuna dair yorumlar da mevcuttur [126].

## **2.5. Anakardik Asit**

Anakardik asit (AA) olarak bilinen 6-pentadesil salisilik asit, kaju fıstığı kabuklarında bulunan doğal bir üründür. Kaju kabuğunun sıvısı, (cashew nutshell liquid – CNSL) %90 olarak AA'den oluşmakta ve geriye kalan %10 luk kısmı, AA ile ilişkili bileşiklerden oluşmaktadır (kardanol, kardol ve 2-metil-cardol). Sarı renge sahip bir sıvıdır; alkol, eter ya da DMSO ile çözünebilir ancak suda çözünemez. Kimyasal olarak AA'nın yapısı, birbirleriyle yakın bir ilişkide bulunan organik bileşiklerden oluşmaktadır. Her bileşik, 15-17 karbonluk satüre veya unsatüre alkil zincirlerden zenginleştirilmiş salisilik asitlerden oluşmaktadır [133].

### **2.5.1. Etnofarmakoloji**

Anacardium occidentale'nin birçok kısmı, içerdikleri tıbbi değerlerinden dolayı yaygınca kullanılmıştır. Meyve suyu ve kabuğun yağı halk arasında kanseröz ülserleri, elefantiyazis ve siğilleri tedavi etmek için, tohum zarında bulunan yağlı madde, ayak çatlakların tedavisinde, yağlı yapraklar deri hastalıklarının ve yanıkların tedavisinde, Gold Coast'ta kabuğu ve yaprakları diş ağrısına karşı ve diş eti hastalıklarının tedavisine, sert kabuklar kaynatılarak şiddetli diyare veya pamukçuk tedavisinde, Hindistanda ise kabuğundan çay yapıp astım, soğuk algınlığı, konjesyon ve yılan zehirinin antidotu olarak kullanılmaktadır. Geleneksel Ayurveda ise bu meyveyi; kanser, oksidatif stres, helminit, hemoptizi, dizanteri, ateş iştahsızlık, lökoderma, hemoroid, dirençli ülser ve hiperglisemi tedavisi olarak sunmakla birlikte, afrodisyak olduğunu da not eder. Genç yapraklarından ve meyvelerden elde edilen özsu, fungisidal olarak da kullanılmaktadır [133].

AA, sık bir şekilde anti-inflamatuvar, anti-tumoral, molluskosidal ve anti-mikrobal aktiviteyle ilişkilendirilir. Önceden yapılmış çalışmaların sonuçları, soya lipoksijenaz-1 (SLO-1) tarafından oluşan linoleik asit peroksidasyonu, 85  $\mu$ M bir IC50 konsantrasyonuna sahip olan anakardit asit tarafından durdurulduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, AA ve türevleri; İnflamasyon ve kanser gelişiminde rolü olan histon asetil transferazları (HAT) ve siklo-oksijenazları da inhibe edebilir [134] Salisilik asit analogu olan AA, birçok bitkisel kaynaktan elde edilmekte ve dünya çapında geleneksel tıbbi tedavi kaynağı olarak kullanılmaktadır. AA, *Amphipterygium adstringens*'in kabuğunda bulunan ve Meksika'da gastrik ülserin, gastritin ve mide kanserlerinin tedavisinde kullanılan bir aktif ajandır. Anakardik asit aynı zamanda Afrika'da sıtma tedavisinde kullanılan ve *Ozoroa insignis* isimli bir çalıda, *Anacardium occidentale*'de (kaju) ve Alzheimer tedavisinde demans azaltıcı ve bilişsel fonksiyon düzelticisi olarak Asya'da halen kullanılan ve daha da araştırılmakta olan *Ginkgo biloba* bitkisinde de bulunmaktadır [135].

### 2.5.2. Histon Asetil Transferaz (HAT) İnhibitör Etkisi

Histon asetil transferazlar (HAT), gen ekspresyonunda önemli bir rol oynayan bir enzim grubudur. Bunlar, histonların N-terminalinde bulunan lizini, asetil CoA'dan aldıkları asetil grupların eklenmesiyle kovalent olarak modifiye ederler. Bu enzimlerde meydana gelen disfonksiyonlar, başta kanser olmak üzere, birçok patofizyolojik bozukluklara yol açar [136].

AA, HAT grubuna ait p300 ve p300/CBP ile ilişkili faktörlerin (PCAF) non-kompetitif bir inhibitördür. AA, direkt olarak DNA transkripsiyonunu etkilemese de, HAT'a bağlı transkripsiyonu inhibe edebilir. P300 ve PCAF açısından AA'nın IC50 değerleri sırasıyla 0,0085 ve 0,005mM olarak bulunmuştur. Başka bir çalışmada, AA'nın HAT alt ailelerinden olan MYST'in (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas3 ve Tip60) Tip60 birimini inhibe ettiği bildirilmiştir. Bu yolak üzerinden, HeLa hücrelerinde ataksia telenjektazinin mutant protein kinazının asetilasyonunu ve haliyle aktivasyonunu inhibe etmiştir. AA ve türevleri, anti-kanser tedavinin yeni kimyasal üyeleri olabilmenin yanı sıra, transkripsiyon çalışmalarında p300 ve PCAF'nin rolünü anlayabilmek için biyolojik tetikleyici olarak kullanılabilirler [137].

İki benzamid türevi olan N-(4-kloro-3-triflorometil-fenil)-2-etoksi-6-pentadesil-benzamid (CTPB) ve N-(4-kloro-3-triflorometil-fenil)-2-etoksi-benzamid (CTB)'in,

p300 HAT aktivitesini arttırdıkları keşfedildi. İlginç olarak, aralarından CTPB daha güçlü bir p300 aktivatörü olarak tespit edildi. Bileşiklerin mevcudiyetinde yapılan enzim kinetik analizlerinin sonuçlarına göre, asetil-CoA'nın artan konsantrasyon ile beraber Km değeri düşmektedir. Çekirdek histonların konsantrasyonunun artmasıyla ise, aktivatörün enzime bağlanmasının güçlü olduğunun göstergesi olarak, Km değeri yükselmekteydi. Bundan sonra enzim yapısı değişir ve daha fazla asetil-CoA toplanır. Bu son durum da p300 HAT'ın aktivasyonuna yol açar [138]. İn vitro kromatin kalıplarıyla yapılan deneylerde ise CTPB'nin DNA transkripsiyonunu direkt olarak etkilemediği ama p300 HAT'a bağlı transkripsiyonunu arttırdığı gösterildi. CTPB, ölümsüzleştirilmiş HEK hücrelerinde histon asetilasyon düzeylerinin düşmesine yol açmıştır ve MCF7 meme kanseri hücrelerinde, HDAC inhibitörü olan SAHA (suberoilanolid hidroksumik asit)'in etkisini antagonize etmiştir.

### 2.5.3. NF- $\kappa$ B ve İnflamasyon Yolağına Etkisi

AA'in, etki göstermek için kullandığı muhtemel mekanizmalardan birisi, NF- $\kappa$ B yolağının modifikasyonudur. Bu yolak, tümörögenesis sürecinde, inflamasyonda ve radyosensitizasyonda rol oynar. İstirahat fazında NF- $\kappa$ B; transkripsiyon faktörü olarak sitoplazmada bulunmaktadır. Aktive olduğunda ise bu faktör, nükleusa taşınır ve birçok gen ürününün transkripsiyonuna aracılık eder. AA ile ilgili yapılan çalışmada, inflamasyon, sitokin, büyüme faktörü veya tümör promotörleri sayesinde aktive edilmiş NF- $\kappa$ B'nin inhibitör alt birimi olan NF- $\kappa$ B kinazı (IKB $\alpha$ ) inhibe ederek etki gösterdiği bildirilmiştir. Bu inhibisyon, NF- $\kappa$ B tarafından düzenlenen gen ürünlerin supresyonuna ve en son apoptoza yol açar [139]. Yine aynı çalışmada bahsedildiği üzere; AA, NF- $\kappa$ B aktivasyonunu durdururken, NF- $\kappa$ B'nin DNA ile bağlanmasına etki etmemektedir. Farklı uyaranlarca aktiflenen NF- $\kappa$ B, IKK aktivasyonunu da tetikler. IKK aktivasyonu, IKB $\alpha$ 'nın 32. ve 36.pozisyonlarda bulunan serinleri fosforile ederek, IKB $\alpha$ 'nın dejenerasyonuna yol açar. Söz konusu çalışmada; inhibisyon, IKK'nın anakardik asit tarafından inhibe edilmesiyle meydana gelmekte ve böylelikle IKB $\alpha$ 'nın fosforilasyonu ve dejenerasyonu suprese edilmektedir.

Aynı zamanda AA'in HAT, p300 ve p300/cAMP cevaplı eleman-bağlayan, protein-bağlayan protein ile ilişkili faktörün inhibisyonunu yaptığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir [136, 140]. Çıplak DNA üzerinden yapılan transkripsiyonlara etkili olmasa da AA, histon H3'ün HAT'a bağımlı olan transkripsiyonunu inhibe eder [136]. Ek

olarak, RelA (p65)'nin 310.lizinindeki asetilasyonu (TNF ile indüklenen NF-κB aktivasyonun ilk basamağı), daha erken olan serin 276 ve 536'nın fosforilasyonunun sayesinde meydana gelmektedir. Bu şekilde fosforile veya asetile olmuş RelA'nın farklı biçimleri, artmış transkripsiyon aktivitesine sahiptir [141].

Üzerinde durulan başka bir ihtimal ise, AA'in TNF ile indüklenen NF-κB aktivasyonunu inhibe edebilme yeteneğini, serbest oksijen radikallerin (SOR) oluşumunu inhibe ederek elde ettiği üzerinedir. AA'in antioksidan etkileri de çok iyi bilinmektedir. Bu etkiyi, hidroksil radikallerin oluşumunun inhibisyonundan ziyade, en çok superoksit oluşumunu (IC<sub>50</sub>= 0.04 mmol/L) veya ksantin oksidazı inhibe ederek (IC<sub>50</sub> = 0.30 mmol/L) meydana getirmektedir.

Ayrıca AA, anjiyogenez ve invazyon ile ilişkili olan gen ürünlerin inhibisyonunu da sağlayabilmektedir. İnvazyonda (COX-2, MMP-9 ve ICAM-1 gibi) ve proliferasyonda (siklin D1 ve c-Myc gibi) rol alan NF-κB ile regüle olan gen ürünleri, yapılan çalışmada AA tarafından inhibe edilmiştir [139]. NF-κB'nin regüle ettiği bilinen iki molekül ile ilgili yapılan çalışmaların bulguları da şu şekildedir. Paramashivappa ve ark. tarafından yapılan çalışmanın sonuçlarına göre, insan COX-2 aktivitesinin AA tarafından inhibe edilebileceği öne sürülmüştür [142], aynı zamanda Granzzini ve ark. da aynı etkiyi lipo-oksijenazların üstünde tespit etmişlerdir [143]. Bu sonuçlar, selekoksib'in COX-2 ekspresyonunun inhibisyonunu, NF-κB inhibisyonu aracılığı ile yaptığına dair çalışmaların sonuçlara benzer niteliktedir [144].

## **2.6. Safen Ven (Vena Saphena Magna)**

Safen ven vücudumuzda bulunan en uzun vendir. Ayak sırtında arcus venosus dorsalis pedis'in iç yanından v.marginalis medialis'in devamı şeklinde başlayan v.saphena magna, malleolus medialis'in önünden geçerek bacağına ulaşır. Bacağın iç yanı boyunca yükselen ven, condylus medialis tibiae et femoris'in arkasından (patellanın 4 parmak gerisinden) geçerek uyluğa girer. Burada, uyluk ön bölgesinin içyanında olarak yukarıya - dışyana ve öne doğru ilerleyen ven, lig. inguinale'nin 2,5 - 4 cm distalinde, hiatus saphenus'tan geçerek v.femoralis'e dökülür. Bacak arka bölgesinden v. arcuata cruris posterior (posterior arch vein / Leonardo veni)'u drene eder. Bacakta v. saphena parva'ya n. saphenus eşlik eder. Çoğu bacakta olmak üzere v.saphena magna'da 7-13 adet kapakçık bulunur. Koroner by-pass ameliyatlarında kullanılan bu ven, içerdiği



kapakçıkların kan akımını engellememesi için alt ucu üste gelecek şekilde ters çevrilerek kullanılır.

Otolog insan safen veni (HSV) kullanılarak yapılan koroner arter bypass cerrahisi, ileri aterosklezorum sık kullanılan bir tedavi yöntemi olup her yıl ABD’de 500.000 hastanın geçirdiği bir işlemdir [145]. Internal torasik arterin (internal mammary artery - IMA) patens oranı daha iyi olmasına rağmen, çalışılması kolay, birçok hastada harcanabilir durumda olması, anastomozların çoğunda uygun oluşu için ve en önemlisi elde edilmesi kolay olduğu için, safen veni (SV) bypass tedavisinde hala yaygınca kullanılmaktadır [146, 147]. Büyük bir kanal olduğu için ve kan akımına karşı uyguladığı direnç ihmal edilecek kadar az olduğu için, safen ven grefti (SVG) kompetitif koroner akımdan etkilenmemektedir [148]. Safen veni elde etmek ve etrafındaki yağ dokularından ayırt etmek için kullanılan no-touch tekniği, hem kısa vadede hem de uzun vadede potensini düzeltmiştir [149]. Bu avantajlarla birlikte safen venin sahip olduğu dezavantajlar da vardır.

SV kullanmanın en büyük dezavantajı, düşük patens oranıdır [146, 150]. Venler genelde düşük basınçlı, azaltılmış anostomoz oranının olduğu ve mekanik gerilimin az olduğu ortamda daha iyi çalışırlar. Böyle bir yapı, arteriyel basınca ve pulsatif akıma maruz kaldığında şiddetli vasküler remodelling’e uğrar. Bu remodelling süreci, damar duvar yapısını değiştirir ve birçok klinik komplikasyonlara neden olur [151, 152]. Ek olarak çıkarılma anında ven, supra-fizyolojik basınçlara maruz kalma (300-400mmHg; 1mmHg = 133,322Pa) ve sözkonusu bu basınç, damar duvarın yapısını hasarlamaktadır. Bu durum, greft, yerine konulduğunda, prematür greft kapanmasına yol açmaktadır [153]. Greft uygulanmasının ilk yılının sonrasında hastaların %20’sinde anjina meydana gelmektedir [154].

Koroner arter bypass greftinin bir yıl sonrasında izlenen en dominant lezyonu aterosklerozistir. Ven oklüzyonuna neden olur ve iskemik semptomların geri dönmesine yol açar. Venöz greftlerde meydana gelen aterosklerotik lezyonlar, arterde meydana gelenlere göre histolojik ve topografik açıdan farklıdır. En önemli farklılık, venlerde meydana gelen, endotel disfonksiyonun yol açtığı ateroskleroz gelişimidir.

Venöz greftin aterosklerozuna neden olan faktörler aşağıda yer almaktadır:

- SVG'nin zayıf çıkarılma tekniği veya kullanımı: çalışmalara göre, heparinizasyon, çıkarılan venöz greftin kalitesini yükseltmekte ve peri-operatif travmaları azatmaktadır.
- Greft aterosklerozunun yerinde adezyon moleküllerin ekspresyonunun yükselmiş olması: bu moleküllerin bazıları; MCP-1, VCAM-1, ICAM-1' dir. MCP-1; monositleri çeker, VCAM-1 makrofajları biriktirir ve ICAM-1 mononükleer hücre adezyonuna ve migrasyonuna neden olur.
- Yükselmiş serum LDL kolesterolü, apolipoproteini ve düşük HDL düzeyleri ile seyreden dislipidemi, venöz greft lezyonu açısından hastaları artmış bir riske maruz bırakmaktadır.
- Katkıda bulunan diğer faktörlerin arasında sol ventriküler disfonksiyon, sigara kullanımı ve yükselmiş ortalama arteriyel basıncı yer almaktadır.

Venöz greftin aterosklerozunun tedavisi olarak kullanılabilen tek seçenek, yeniden by-pass cerrahisidir [155] .

Cerrahiden 10 yıl sonra venin açık kalma oranı %50'ye kadar inebilir. Böylelikle re-operasyon gerekebilir ve bypass re-operasyonları da tüm by-pass işgücünün yaklaşık %20'sini teşkil etmektedir [156]. Başarısız HSV greftlerin detaylı histolojik incelemelerine göre, implantasyonun >5 yıl sonrasında meydana gelen başarısızlığın ana nedeni, önceden kalınlaşmış bir neointimanın üzerine binen hızlandırılmış ateroskleroz olduğu bildirilmiştir [157]. Bu bilgiye dayanarak, son zamanlarda uygulanan agresif statin tedavileri, yeni HSV greftlerin daralmasını önlemeye çalışmaktadır. Buna rağmen, venöz greftin aterosklerozuna karşı kullanılacak daha etkili tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır ve bu da ancak, süreç içerisinde yer alan komponentlerin tanımlanmasıyla mümkün olabilir [158].

Arterial ateroskleroz hakkında sayılamayacak kadar yayınlar mevcut olsa da, HSV greftlerde meydana gelen aterosklerozun hakkında yayınlanmış çalışmaların sayısı görece olarak azdır. Bundan dolayı, tam olarak HSV greft aterosklerozun altında hangi mekanizmanın yattığı çok net değildir. Arterial ateroskleroz gelişimi esnasında monosit/makrofajların rolü iyi bilinmektedir ve onların rolü HSV greftlerde ve venöz greft intimal hiperplazisi şeklinde *in vivo* modellerde de gösterilmiştir [159-161] Aynı

zamanda T lenfositlerin, HLA-DR pozitif hücrelerin ve proinflamatuvar sitokinlerin birçok venöz greft modellerinde ve tıkalı HSV greftlerde varlığı gösterilmiştir [162, 163]. Görüldüğü gibi, arterial aterosklezorda meydana gelen inflamatuvar/immün reaksiyonların bazıları, HSV greft aterosklezorida da gelişmektedir.

HSV greftte görülen makrofajlar, infiltre eden monositlerin bir ürünüdür. Buna rağmen, HSV greftine infiltre olan monositlerin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Monosit transendotelyal migrasyonu birçok basamaktan geçen bir süreçtir. İlk önce adezyonla başlayan süreç, monositlerin endotel üzerine yuvarlanmasıyla devam eder ve bazı kimyasal maddelerle temasa geçtikten sonra aktive olan bu monositler endotele sağlam bir adezyonla tutunur. Bundan sonra monositler en yakın hücre birleşimine gelir ve iki endotel hücrelerinin (EH) arasına sıkışarak migrasyon yaparlar. Tüm bu olaylar farklı adezyon molekülleri tarafından meydana getirilmektedir.

Nekropsi çalışmaları, bypass cerrahisinin en erken 1 yıl sonrasında aterom plakların gelişebileceğini işaret etmektedir [164, 165]. Hemodinamik açıdan stenoza ve haliyle semptomlara neden olan plaklar, genelde venöz greftin 3. yılının öncesinde gelişmeyip, 5. ve 7. yılından sonra klinik bulgularla kendini gösterirler [165, 166]. Normal koroner arterlerde gelişen aterosklerozun histolojik basamakları detaylı bir şekilde AHA Ateroskleroz Konseyince derlenmiştir. Aterom gelişimin basamakları ve ona neden olan faktörler venöz greftler için de geçerli olsa da bazı temporal, histolojik ve topografik farklılıklar vardır.

Bu farklılıkların en belirgin olanı, safen ven greftinde meydana gelen aterosklerozun hızlı bir şekilde ilerlemesidir. Ateroskleroz gelişimin hızlı olduğu diğer durumlarda da olduğu gibi (mesela kronik transplant rejenksiyonunda), venöz greftte aterosklerozun bu kadar hızlı ilerlemesinin asıl nedeni, kronik endotelyal hücre hasarı ve disfonksiyonudur [167, 168].

Histolojik olarak venöz greftin aterom plağında, normal koroner arterin ateromuna göre, daha fazla sayıda köpük hücre ve inflamatuvar hücre (multinükleer dev hücreler de dahil) bulunmaktadır. Bu görünüm, deneysel yollarla elde edilen immün-aracılı ateroskleroza benzemektedir. Bu nedenle bazı araştırmacılar, greft ateromunun arkasında muhtemel immünojenik temellerin olabileceğini ileriye sunmaktadırlar [169].

Normal koroner damarların ateromu proksimal yerleşimli, fokal, eksantrik, gevşek olmayan ve sıkça kalsifikasyonla kendini gösteren bir fibröz kapla örtülüyken;

venöz greftin aterosklerozunun morfolojisi diffüz, konsantrik, gevşek, kalsifikasyon göstermeyen ve zayıf bir kapla örtülü olarak karşımıza çıkar [164, 165, 170]. Son zamanlarda yapılmış *in vivo* intravasküler ultrason çalışmalarının sonuçlarına göre, normal koroner damar aterosklerozunda görülen, fokal kompanzatuvar genişleme meydana gelirken (Glasgow'un kuralı) stenotik safen venin greftinde bu durum meydana gelmemektedir [168]. Normal koroner arterlere göre, safen vende lipidlerin yönetildiği şekil de pro-aterojeniktir: yavaş lipoliz, daha aktif bir lipid sentezi ve daha yüksek lipid geri alımı mevcuttur [171].

EH ve düz kas hücreleri tarafından eksprese edilen birçok adezyon molekülü vardır. Bunların arasında immünglobulin süperailisinin üyeleri, ICAM-1 ve VCAM-1 yer almaktadır. VCAM-1 ve ICAM-1, monositlerin üzerinde bulunan  $\beta 1$  ve  $\beta 2$  integrinlerle etkileşime girer ve bu moleküllerin arasında meydana gelen etkileşim, diapedez öncesi meydana gelen monositlerin endotele sağlam tutunmasından sorumlu tutulmaktadır [172].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, PromoCell C-12231 katalog numaralı insan safen ven endotel hücreleri kullanıldı. Hücreler, protokole uygun olarak çözülüp çoğaltıldı. Çalışma kapsamında yapılan endotel kültürleri, endotellerin TNF- $\alpha$  ile uyarımı, AA uygulanması, endotel hücrelerinden mRNA izolasyonu, immünfluoresan boyama ve görüntüleme işlemleri Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarında; cDNA sentezleri, ELISA ile LDH miktar tayinleri ve gen ekspresyon tayinleri ise Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Farmakogenetik Araştırmalar Laboratuvarında yapılmıştır (Şubat 2015 – Mayıs 2015).

#### 3.1. İnsan Safen Ven Endotel Kültürü Deneyleri

Deneyde kullanılacak olan insan safen ven endotelleri, PromoCell C-12231 (Promocell Heidelberg, Germany) katalog numarası ile temin edildi. Çalışmamızın bundan sonraki aşamaları steril koşullarda ve laminar akışlı kabin altında yapıldı. Kuru buz içerisinde donmuş halde gelen hücreler, katalog prosedürüne göre aşağıdaki biçimde çözüldü;

- 1- Hazır gelen kriyo-tüpün kapağı, laminar akışlı kabin altında basıncı alınacak şekilde çeyrek tur çevrildi ve kapak tekrar sıkıştırıldı.
- 2- Kriyo-tüp, 37°C'de 2 dakika benmaride tutuldu.
- 3- Kriyo-tüp, laminar akışlı kabin altında %70 etanol ile temizlendi. Sonrasında vakum ile tüpün ve kapağın çevresindeki fazla etanol ve su kontaminasyonu engellemek amacıyla çekildi.
- 4- Kriyo-tüp içerisindeki hücreler, 1 mL Promocell Endothelial Cell Growth Medyum C-22010 (Promocell Heidelberg, Germany) içerisinde çözüldü.

### **3.1.1. İnsan Safen Ven Endotel Hücrelerinin Ekileceği 25 cm<sup>2</sup> kültür şişelerinin Hazırlanması**

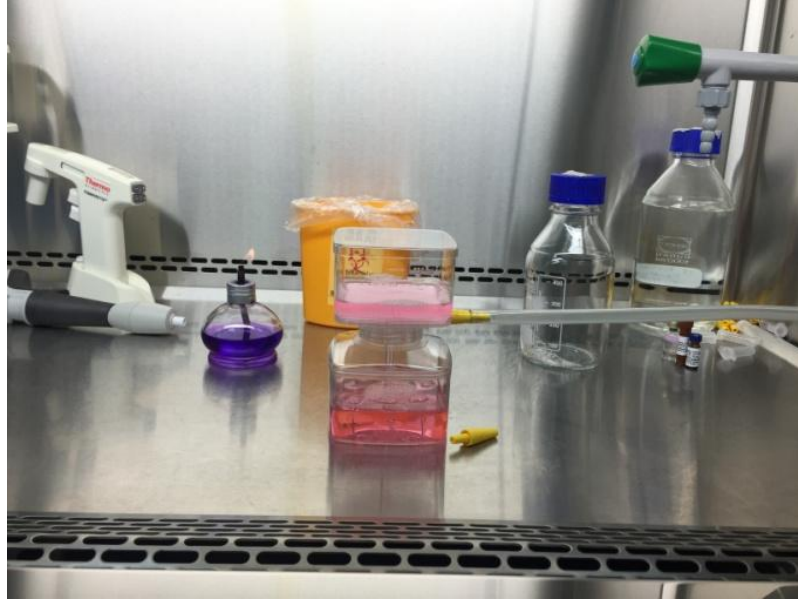
Hücrelerin ekileceği 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür şişeleri aşağıdaki metodla, hücrelere tutunma alanı sağlanabilmesi için Tip I Kollajen ile (Life Tech. A1064401 - Carlsbad, CA, 92008, USA) kaplandı;

- 1- Bir kültür şişesi için stok kollajenden 50 µl alınarak 4950 µl 20mM asetik asit çözeltisinde çözüldü.
- 2- Hazırlanan kollajen tip I çözeltisi, cm<sup>2</sup>'ye 100 µl olacak şekilde 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür şişelerine konuldu.
- 3- Oda ısısında laminar akışlı kabin altında 60 dakika inkübe edildi.
- 4- İnkübasyon sonrası kültür şişeleri içerisindeki kollajen çözeltisi vakum ile alındı.
- 5- 3 kez, cm<sup>2</sup> ye 100 µl olacak şekilde PBS çözeltisi (Gibco 10010031 - Carlsbad, CA, 92008, USA) ile yıkandı.
- 6- Kültür şişelerinin içerisine cm<sup>2</sup> ye 100 µl olacak şekilde medium eklenerek 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübatöründe 30 dakika dinlendirildi. Bu şekilde kültür şişeleri, hücrelerin ekimine hazır hale geldi.

### **3.1.2. Endotelial Hücre Büyüme Medyumunun Hazırlanması**

Promocell Endothelial Cell Growth Medyum (C-22010 Promocell Heidelberg, Germany) supplement mix ile birlikte temin edildi.

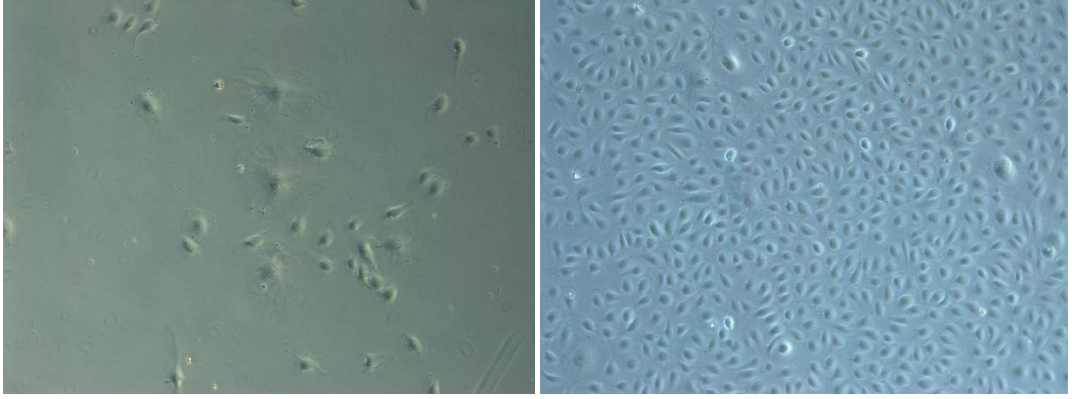
- 1- 500 ml bazal medyum içerisine laminar akışlı kabin altında supplement mix ilave edildi.
- 2- Daha sonra medyum karışımı; 0,20 µm filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi (Resim 3-1).



**Şekil 3-1: Endotelial Hücre Büyüme Medyumu hazırlanışı**

### **3.1.3. İnsan Safen Ven Endotel Hücrelerinin kültür şişelerine ekimi**

- 1- Daha önceden Tip I kollajen ile kaplanmış olan 25 cm<sup>2</sup> kültür şişelerine, önceden hazırlanan ve filtre edilen medyumdan 4,5 mL eklendi ve 30 dakika 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübatörde bekletildi.
- 2- Her biri için 500 µL olacak şekilde, daha önceden içerisinde medyumu hazır olan 25 cm<sup>2</sup> lik 2 adet 25 cm<sup>2</sup> kültür şişesine cm<sup>2</sup> ye 10<sup>4</sup> hücre olacak biçimde süspanse edilen hücre/medium karışımından transfer edildi (Şekil 3-2).
- 3- Hücrelerin ekildiği 25 cm<sup>2</sup> kültür şişeleri, invert mikroskopta kontrol edildikten sonra, 37°C sıcaklıktaki %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre konuldu.
- 4- 24 saat sonra hücrelerin tutunmaları kontrol edildi, tutunmanın sağlandığı mikroskop ile kontrol edildikten sonra medyum değiştirildi.
- 5- Hücreler, 2-3 günün sonunda %70-80 konfluense ulaştıklarında pasajlandı (Şekil 3-3).



**Şekil 3-2: İlk Ekimden Sonra Endotel Hücrelerinin Görüntüsü.**

**Şekil 3-3: %70-%80 Arası Konfluense Ulaştıktan Sonra Pasajlanan Hücrelerin Görüntüsü.**

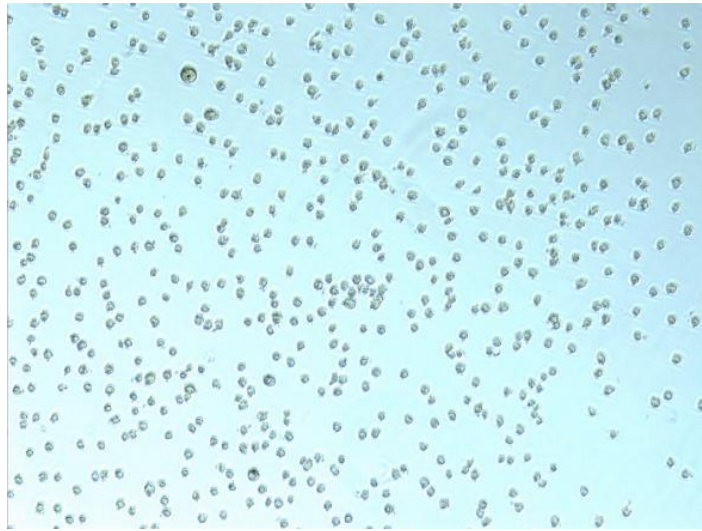
### **3.1.4. İnsan Safen Ven Endotel Hücrelerinin Pasajlanması**

%70-80 konfluense ulaşan hücreler, (Şekil 3-2) aşağıdaki şekilde pasajlandı:

- 1- -20°C de muhafaza edilen Tripsin/EDTA (%0,04 / 0,03), çözülmesi için oda ısısında 30 dakika inkübe edildi.
- 2- Daha sonra inkübatörden alınan kültür şişelerinin içerisindeki medyum, aspire edildi.
- 3- Kültür şişelerine cm<sup>2</sup> başına 100 µl HepesBSS solüsyonu eklenip 15 saniye dikkatlice yavaş olarak çalkalandı.
- 4- HepesBSS aspire edildi ve cm<sup>2</sup> başına 100 µl tripsin/EDTA solüsyonu eklenerek oda ısısında kültür şişelerine yavaş ve dikkatlice 4,5 dakika fiziksel müdahale yapıldı.
- 5- Hücrelerin tamamen kültür kabı zemininden ayrılmış olduğu mikroskop altında kontrol edildi (Şekil 3-4).
- 6- Hücrelerin bulunduğu kültür şişelerinin içerisine, cm<sup>2</sup> başına 100 µl tripsini nötralize etmek üzere bazal medyum eklenerek hafifçe çalkalandı.
- 7- Oluşan hücre süspansiyonu, steril eppendorf tüplere alınarak, 220g'de 3 dakika santrifüj edildi.
- 8- Pellet kısmında bulunan hücreler medyumla sulandırılıp mikroskop altında hemasitometri ile sayımları aşağıdaki şekilde yapıldı:



- i) Eppendorf tüpte toplanan hücrelerden 10 µl alınıp temiz bir tüpe konuldu.
  - ii) Üzerine 10 µl tripan mavisi (GibcoBRL 15250061. Invitrogen Inc., New York, USA) eklendi.
  - iii) Hemasitometrinin her iki tarafına 10 µl örnek konuldu.
  - iv) İçine boya almamış ve parlak görünen hücreler canlı olarak değerlendirilerek sayıldı. Sayımlar iki ayrı araştırmacı tarafından tekrarlandı.
- 9- Sayımı yapılan hücreler 6, 12 ve 24 kuyulu, kollajen ile kaplanmış tabaklar içerisine ekildi.
- 10- 4 cm<sup>2</sup> lik 12 kuyulu tabaklara 1mL medyum içerisine her cm<sup>2</sup> ye 6.000 hücre gelecek şekilde 4x6.000=24.000 hücre ekildi.
- 11- Yine 4 cm<sup>2</sup> lik 12 kuyuluk cover slip içeren tabaklara 1 mL medyum içerisine her cm<sup>2</sup> ye 6.000 hücre gelecek şekilde 2,4x10<sup>4</sup> hücre ekildi.
- 12- 1.9 cm<sup>2</sup> lik 24 kuyulu 0,5 mL medyum içerisine 1,9x10<sup>4</sup> - hücre ekildi.
- 13- 12 ve 24 well plateler hücrelerin yeterli yoğunluğa ulaşması için - 48 saat inkübe edildi.



**Şekil 3-4: İnsan Safen Ven Endotel hücrelerinin tripsin/EDTA ile muamele edildikten sonraki görüntüsü.**

### 3.2. İnsan Safen Ven Endotel hücreleri Üzerine Yapılan Uygulamalar

Deney için, AA ön uygulaması (pretreatment) yapıldı. Tüm gruplara 1 saat AA uygulandıktan sonra, TNF- $\alpha$  uygulandı ve 6 saat inkübasyona bırakıldı.

- 37°C %5 CO<sub>2</sub> inkübasyonundan sonra, LDH ölçümleri için her bir gruptan üst sıvılar toplandı. Toplanan üst sıvılar, -80 °C de ölçüm için saklandı.
- mRNA ekspresyonu belirlenecek olan hücreler, tripsin/EDTA uygulandıktan sonra protokole uygun olarak mRNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapıldı.

#### 3.2.1. Anakardik Asit ve TNF- $\alpha$ Çözeltilerinin Hazırlanması

Anakardik asit (Santa Cruz Biotech SC-202463A) DMSO ( $\geq 20$  mg/mL) içerisinde çözüldü. 25 mg lık stok içerisinde, 1250  $\mu$ l DMSO eklendi ve 10 mM AA elde edildi. Sonrasında farklı konsantrasyonlar için, aşağıdaki şekillerde uygun oranlarda anakardik asit ve medyum karışımları kullanıldı:

- AA 5  $\mu$ M için; 10 mM stoktan 0,5  $\mu$ l AA, 999,5  $\mu$ l medyum karışımı kültür şişelerine eklendi.
- AA 1  $\mu$ M için; 0,1 mM stoktan 10  $\mu$ l AA, 990  $\mu$ l medyum karışımı kültür şişelerine eklendi.
- AA 0,5  $\mu$ M için; 0,1 mM stoktan 5  $\mu$ l AA, 995  $\mu$ l medyum karışımı kültür şişelerine eklendi.
- AA 0,1  $\mu$ M için; 0,1  $\mu$ M stoktan 1  $\mu$ l AA, 999  $\mu$ l medyum karışımı kültür şişelerine eklendi.

TNF- $\alpha$  (Life Tech. PHC3011 - Carlsbad, CA, 92008, USA) 1 mL steril distile su içerisinde çözüldü. Böylelikle, 100,000 ng/mL olarak ana stok hazırlanmış oldu. Sonrasında TNF-  $\alpha$  uygulanan gruplara, 10 ng/mL olacak şekilde eklendi.

#### Uygulanan ilaç dozları ve gruplar aşağıdaki gibidir;

- 1- Kontrol grubu: Herhangi bir uygulama yapılmamış grup
- 2- A1 grubu: 1 saat boyunca AA Doz 1 (5  $\mu$ M) uygulanan grup [A1]
- 3- A2 grubu: 1 saat boyunca AA Doz 2 (1  $\mu$ M) uygulanan grup [A2]
- 4- A3 grubu: 1 saat boyunca AA Doz 3 (0,5  $\mu$ M) uygulanan grup [A3]

- 5- A4 grubu: 1 saat boyunca AA Doz 4 (0,1  $\mu$ M) uygulanan grup [A4]
- 6- TNF grubu: AA uygulanmayan, 6 saat boyunca TNF- $\alpha$  (10 ng/mL) uygulanan grup [TNF]
- 7- A1T grubu: Önce 1 saat AA, daha sonra 6 saat TNF- $\alpha$  uygulanan grup -AA Doz 1+ TNF- $\alpha$  -[A1T]
- 8- A2T grubu: Önce 1 saat AA, daha sonra 6 saat TNF- $\alpha$  uygulanan grup -AA Doz 2+ TNF- $\alpha$  -[A2T]
- 9- A3T grubu: Önce 1 saat AA, daha sonra 6 saat TNF- $\alpha$  uygulanan grup -AA Doz 3+ TNF- $\alpha$  -[A3T]
- 10- A4T grubu: Önce 1 saat AA, daha sonra 6 saat TNF- $\alpha$  uygulanan grup -AA Doz 4+ TNF- $\alpha$  -[A4T]
- 11- DMSO grubu: TNF- $\alpha$  ve AA in içerisinde çözündürüldüğü 5 $\mu$ M lık DMSO içeren grup. [DMSO]\*

\*DMSO uygulaması, için en yüksek DMSO'nun uygulandığı A1 grubundaki konsantrasyon dikkate alınarak 5 $\mu$ M olarak yapılmıştır. En yüksek dozun sitotoksitesisi saptanmış, daha düşük dozlar için ayrıca bir grup kullanılmamıştır.

### 3.3. İmmünfluoresan Boyama Protokolü

NF- $\kappa$ B ve ICAM-1 proteinleri için ikili boyama prosedürü uygulandı.

#### 1. Gün

1. Kültüre edilmiş olan hücreler, %3,7'lik paraformaldehit (Sigma 15,812-7. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içerisinde oda sıcaklığında 30 dk fikse edildi.
2. Hücreler 5 defa 10'ar dk 2 ml PBS ile yıkandı.
3. Hücreler % 0,01 triton X-100 (Sigma X-100. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, GE) içeren T-PBS içerisinde hazırlanan %30'luk normal keçi serumunda (Chemicon S26. Millipore Corp. California, USA) oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

4. Hücreler, Anti-ICAM-1 (Abcam – ab20144 – Cambridge, UK) primer antikor, % 0,01 T-PBS içinde hazırlanan % 30 keçi serumu ile 1:50 oranında sulandırıldı, gece boyu + 4°C’de bekletildi. Bu aşamada negatif kontrollere primer antikor içermeyen % 0,01 T-PBS içinde hazırlanan % 30 keçi serumu uygulandı.

## 2. Gün

1. 5 kere 10’ar dk oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı
2. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler karanlık ortamda yapıldı. Hücreler % 1,5 keçi serumu % 0,01 T-PBS içerisinde 1:100 oranında sulandırılan keçi anti-fare IgG, H&L (Alexa Fluor 488) (Abcam – ab150177 - Cambridge, UK) sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. 3 kere 10’ar dk oda sıcaklığındaki 2 ml PBS ile yıkandı
4. Hücreler % 0,01 T-PBS içerisinde hazırlanan %10’luk normal keçi serumunda oda sıcaklığında 30 dk bekletildi.
5. Hücreler primer antikor NF-κB (Abcam – ab32536 - Cambridge, UK) % 0,01 T-PBS içinde hazırlanan % 10 keçi serumu ile 1: 100 oranında sulandırıldı, 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Bu aşamada negatif kontrollere primer antikor içermeyen % 0,01 T-PBS içinde hazırlanan % 10 keçi serumu uygulandı.
6. Hücreler % 1,5 keçi serumu % 0,01 T-PBS içerisinde 1:100 oranında sulandırılan keçi anti tavşan IgG Alexa Fluor 568 (Kırmızı) (Abcam – ab150079 - Cambridge, UK) sekonder antikor ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. Boyanan örnekler, kapama medyumu ile kapatıldı.
8. Hücreler invert floresan mikroskopunda (Leica DMIL, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, GE) incelendi ve TR, I3 ve A3 filtreleri kullanılarak floresan kamera sistemi (Leica DFC 300 FX, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, GE) ile fotoğrafları çekildi. Farklı

filtrelerle çekilen aynı alana ait fotoğraflar özel bir yazılım (The Leica Application Suite Image Overlay Software, Leica Microsystems Ltd., Heerbrugg, GE) kullanılarak karşılaştırıldı.

Her bir petrinin rastgele alanlarından çekilen 10'ar adet fotoğrafın absöü piksel yoğunluğu, Image J yazılımında belirlendi ve her bir fotoğrafa ait sayısal veri istatistiksel analizde kullanılarak deney gruplarının hedef protein ekspresyonlarını ifade eden absöü piksel yoğunlukları arasındaki farklar saptandı.

### **3.4. İnsan Safen Ven Endotel Hücrelerinden RNA İzolasyonu**

- 1- Kültür hücrelerinden total RNA izolasyonu, RNA izolasyon kiti (Life Tech AM1728 Cells-To-C<sub>T</sub>) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.
- 2- Kültür şişelerinin içerisinde bulunan medyumlar aspire edildi. Ardından 500 µl 4<sup>0</sup>C lik soğuk PBS ile yıkandı.
- 3- Tripsin/EDTA ile kaldırılan hücreler, µl içerisinde 2x10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde dilüe edildi.
- 4- Hücrelere, 50 µl lizis solüsyonu (49,5 µl lizis solüsyonu içerisinde 0,5 µl DNaz I olacak şekilde) eklendi, oda ısısında 5 dakika inkübe edildi.
- 5- 5 µl stop solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırıldı, oda ısısında 2 dakika inkübe edildi.
- 6- Elde edilen RNA'lara miktar ve saflık tayini yapıldı.
- 7- Çözünmüş olan RNA, cDNA sentez edilene kadar -80<sup>0</sup>C'de saklandı.

#### **3.4.1. Örneklerin RNA Saflık ve Miktarlarının Tayin Edilmesi**

1. İzole edilen RNA lara ait saflık ve miktar tayini, Qubit 2.0 fluorometre (Life Tech) ile fluorometrik olarak yapıldı.
2. Fluorometrik analiz için, Qubit RNA BR assay kit (Q10210) kullanıldı.
3. 200 µl Qubit working solüsyon için, 1:200 Qubit RNA BR reagent eklendi.
4. 10 µl örnek için, 190 µl working solüsyon eklendi.
5. 2-3 saniye vortekslendikten sonra, karanlıkta ve oda ısısında 2 dakika inkübe edildi.

6. Sonrasında Qubit 2.0 fluorometre cihazında okuma yapıldı.
7. Okumanın ardından,

RNA konsantrasyonu ( ng /  $\mu$ l )= OD 260 nm x seyreltme faktörü x 40

RNA saflığı = OD 260 / OD 280 = 2 olacak şekilde hesaplandı.

### 3.4.2. Normalizasyon

qRT-PCR'da her bir grup için eşit miktarda (30 ng/ $\mu$ l) total RNA kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi.

### 3.4.3. cDNA Sentezi

1. RNA'lar en düşük konsantrasyon olan 30 ng/ $\mu$ l'ye uygun oranlarda sulandırılarak sabitlendi.
2. Kit (Life Tech AM1728) içeriğine göre; örnek başına 25  $\mu$ l 2X RT buffer, 2,5  $\mu$ l RT enzimi eklenerek mix hazırlandı (Tablo 3-1).
3. 37 C<sup>o</sup> de 60 dakika ve 95 C<sup>o</sup> de 5 dakika olmak üzere termal döngü cihazında cDNA sentezi gerçekleştirildi.
4. Döngü tamamlandıktan sonra örnekler -20<sup>o</sup>C de muhafaza edildi.

**Tablo 3-1: cDNA sentezinde kullanılan karışım**

<u>Bileşen</u>	<u>Hacim</u>
<b>2X RT Buffer</b>	25 $\mu$ l
<b>20X RT Enzim Karışımı</b>	2,5 $\mu$ l
<b>DNaz RNaz içermeyen distile H<sub>2</sub>O</b>	12,5 $\mu$ l
<b>RT Master Mix Son Hacim</b>	40 $\mu$ l

### 3.4.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

cDNA sentezini takiben qRT-PCR yöntemi ile hedef genlere ait mRNA miktarlarındaki değişimler saptandı. Yöntem, Applied Biosystems 7500 Fast (Life Tech. Carlsbad, CA, 92008, USA) cihazında, TaqMan Probları ve FG TaqMan Cells To C<sub>T</sub> (AM1728 - Life Tech. Carlsbad, CA, 92008, USA) kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

mRNA miktarlarının doğru şekilde saptanabilmesi için her dokuda ifade edildiği bilinen referans (housekeeping) genler kullanılarak normalizasyon (2. normalizasyon) işlemi yapıldı. Her reaksiyonda kontaminasyon olasılığını kontrol etmek üzere kalıp cDNA içermeyen bir örnek negatif kontrol olarak kullanıldı. Reaksiyon 96 kuyulu plakalarda gerçekleştirildi. Her bir cDNA örneği için deneyler 2 kez tekrarlandı.

### 3.4.5. 2. Normalizasyon

2. Normalizasyon işlemi için, çalışılan her bir hedef genin ekspresyon seviyeleri Aktin Beta (ACTB) housekeeping gen ile karşılaştırılarak belirlendi.

### 3.4.6. Deneylerde Kullanılan qRT- PCR Primerleri ve Taqman Probları

-TaqMan Gene Expression Assay Human ICAM-1 Hs00164932\_m1 – 4331182  
Life Tech. Carlsbad, CA, 92008, USA

-TaqMan Gene Expression Assay Human VCAM-1 Hs01003372\_m1 – 4331182  
Life Tech. Carlsbad, CA, 92008, USA

- TaqMan Gene Expression Assay Human NF-κB Hs00765730\_m1 – 4331182  
Life Tech. Carlsbad, CA, 92008, USA

- TaqMan Gene Expression Assay Human ACBT Hs01060665\_g1 – 4331182  
Life Tech. Carlsbad, CA, 92008, USA

### 3.4.7. qRT- PCR Reaksiyon karışımının hazırlanması

**Tablo 3-2: qRT- PCR Reaksiyon karışımının hazırlanması**

<u>Bileşen</u>	<u>10 µl qRT PCR Reaksiyonu İçin Hacim</u>
TaqMan Gen Ekspresyon Master Mix 2X	5 µl
Assay Mix 20X	0,5 µl
DNaz, RNaz İçermeyen distile H <sub>2</sub> O	3,5 µl
rtPCR Reaksiyon (cDNA)	1 µl
PCR karışımı Son Hacim	10 µl

### 3.4.8. qRT PCR Sıcaklık döngüsü

Tablo 3-3: qRT PCR Sıcaklık döngüsü

Sıcaklık	İnkübasyon
<b>Pre İnkübasyon</b>	
95°C	10 dak.
<b>Amplifikasyon</b>	
95 °C	15 san.
60 °C	60 san.

### 3.5. Sitotoksisite Ölçümü

Sitotoksisite ölçümü, kültürdeki membranı hasarlı veya ölü hücrelerden medyuma salınan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarının belirlenmesiyle gerçekleştirildi. LDH salınımı deneylerinde kullanılacak negatif kontrol, düşük konsantrasyonlu kontrol, yüksek konsantrasyonlu kontrol grupları diğer deneylerle birlikte hazırlandı. Promocell Endothelial Cell Growth Medium'dan oluşan negatif kontrol, kültür medyumundaki LDH aktivitesini belirlemek üzere hazırlandı. Her deneyde kullanılan ve hiçbir madde uygulanmayan kontrol grupları hücrelerden normal koşullardaki LDH salınımı belirlemek üzere düşük konsantrasyonlu kontrol grubu olarak kullanıldı. Kültür medyumuna %2 Triton X-100 verip 24 saatlik inkübasyon ile oluşturulan yüksek konsantrasyonlu kontrol grubu hücrelerden salınabilecek en yüksek LDH miktarını belirlemek için hazırlandı. Uygulama süreleri sonunda kontrol gruplarına ve deney gruplarına ait kültür medyumlarından 500'er µl örnek ELISA çalışmaları için toplandı ve -80°C'de saklandı.

LDH salınımı, Cytotoxicity Detection (LDH) kiti (Roche 11 644 793 001. Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science Mannheim, GE) kullanılarak aşağıdaki protokole göre yapıldı.

1. Her bir örnekten 100 µl 96 kuyulu mikropalakalara yüklendi.
2. Üzerlerine taze hazırlanmış 100 µl reaksiyon karışımı eklendi, 30 dk oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi.



3. İnkübasyon sonrası örneklerin absorbanları 492 nm'lik filtre ile ELISA okuyucuda (ChroMate Awareness Inc. Florida, USA) okundu. Her bir örneğe ait ölçümler 3 kez tekrarlandı.

### **3.6. İstatistiksel analiz:**

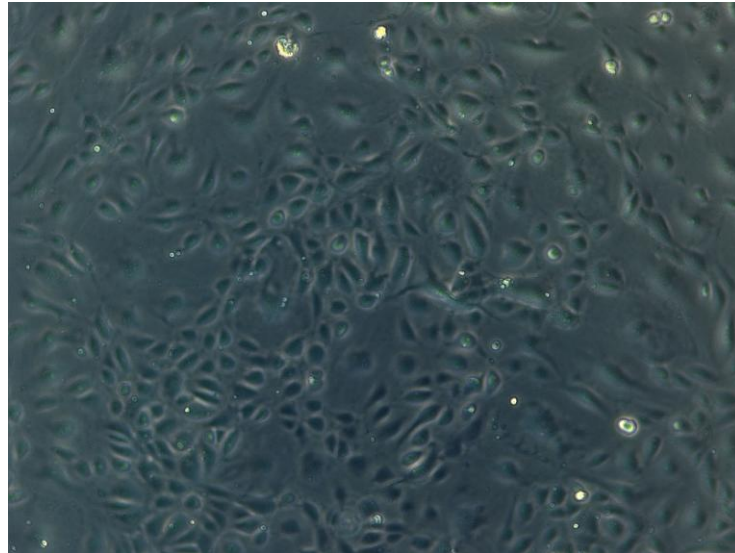
Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, medyan en düşük, en yüksek değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı Kolmogorov Simirnov test ile ölçüldü. Nicel verilerin analizinde Kruskal-wallis, Mann-Whitney U test kullanıldı. Analizlerde SPSS 22.0 programı kullanılmıştır.  $p < 0,05$  anlamlı olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

Çalışımızda, insan safen ven endotel kültüründe, Anakardik asit (AA) uygulamasından sonra, TNF- $\alpha$  ile uyarım sonucu inflamatuvar ateroskleroz modeli yapıldı. Daha sonra gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) yöntemi ile ICAM-1, VCAM-1 ve NF- $\kappa$ B genlerinin mRNA seviyelerindeki değişiklikler saptandı. Ayrıca endoteller üzerine ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B proteinleri için immünfluoresan boyama işlemi gerçekleştirildi. Hücre kültür medyumlarından ise Laktat Dehidrojenaz (LDH) tayini yapıldı.

### 4.1. Mikroskopik Değerlendirme

Endotel hücreleri gereken olgunluğa eriştikten sonra mikroskopik olarak kontrolleri yapıldı. Satın alınmış olan hücreler, DiI-Ac-LDL alımı (1,1'-dioktadesil – 3,3,3',3'-tetrametil-indokarbosiyanin perklorat ile işaretli asetile LDL), vWF (von Willebrand Faktör) ve CD31 pozitif hücreler olduğundan, fluoresan ya da immünohistokimyasal olarak doğrulama gerekmedi (PromoCell C-12231) (Şekil 4-1).



Şekil 4-1: 2. Günün Sonunda %70-80 Arası Konfluense Ulaşan Hücreler. Büyütme 5X

## 4.2. Sitotoksosite Ölçüm Sonuçları

İnsan safen ven endotel kültüründe; TNF- $\alpha$ , AA, DMSO uygulanan ve medyum dışında başka bir madde eklenmeyen kontrol grubuna ait sitotoksosite ölçümleri yapıldı. Ölçüm, hücreler tarafından ortama salınan LDH miktarı ölçülerek belirlendi.

Kontrol grubunda LDH düzeyi; A1, A2, A3, A1T, A2T, A3T, gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha düşüktü ( $p < 0,05$ ), A4 ve A4T gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ). Kontrol grubunda LDH düzeyi TNF- $\alpha$  ve DMSO gruplarına göre farklılık göstermemiştir ( $p > 0,05$ ).

TNF- $\alpha$  grubunda LDH düzeyi A1, A2, A3, A1T, A2T, A3T gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ), A4 ve A4T gruplarından ise anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A1 grubunda LDH düzeyi A1T ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A2 grubunda LDH düzeyi A2T ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A3 grubunda LDH düzeyi A3T ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A4 grubunda LDH düzeyi DMSO grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ), ancak A4T grubu ile arasında anlamlı bir fark yoktu ( $p > 0,05$ ).

A1T grubunda LDH düzeyi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A2T grubunda LDH düzeyi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

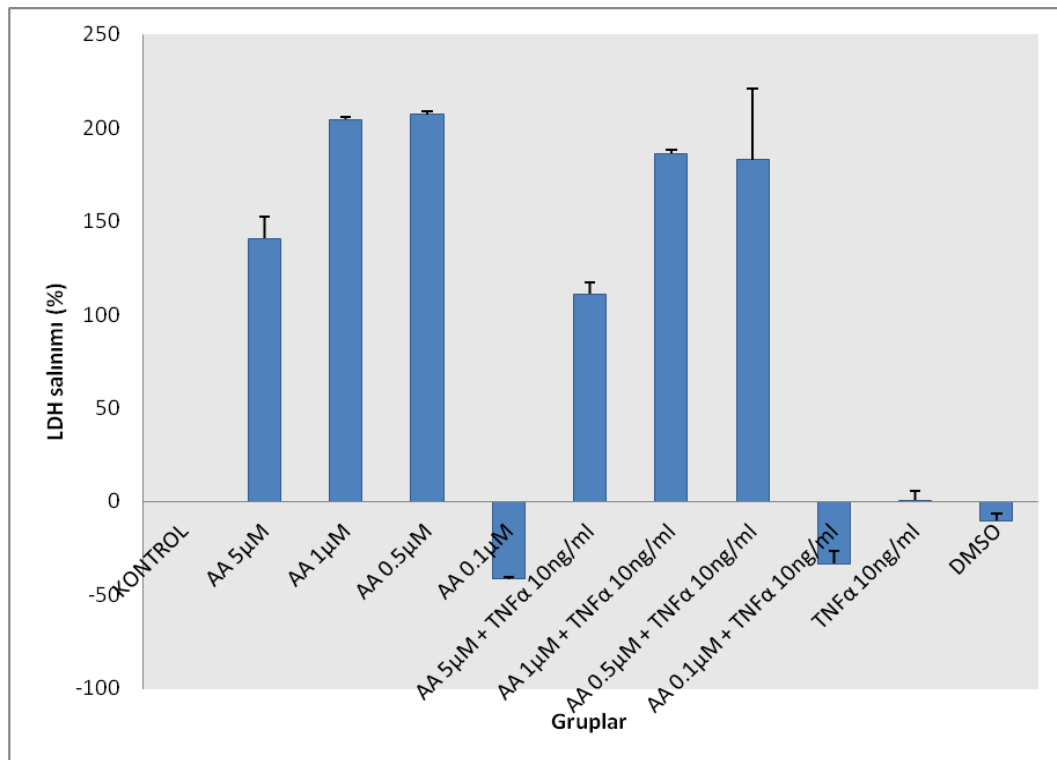
A3T grubunda LDH düzeyi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A4T grubunda LDH düzeyi DMSO grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ) (Tüm gruplara ait LDH değerleri Tablo 4-1 de, grafik ise Şekil 4-2 de verilmiştir.)

**Tablo 4-1:** 1 saat Anakardik asit uygulandıktan sonra, TNF- $\alpha$  uygulanan ve 6 saat inkübasyona bırakılan gruplara ait sitotoksinite (LDH) ölçümleri. (Kontrol grubu LDH salınımı 0 olarak kabul edilmiştir.)

	LDH			p
	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan	Min-Mak	
Kontrol	0.00 $\pm$ 0.00	0.00	0.00 - 0.00	<b>0.000</b>
TNF	0.51 $\pm$ 4.81	1.62	-5.75 - 5.30	
A1	140.75 $\pm$ 11.57	144.65	119.63 - 153.24	
A2	204.42 $\pm$ 1.63	204.09	202.43 - 207.34	
A3	207.07 $\pm$ 2.05	207.65	203.05 - 208.69	
A4	-41.48 $\pm$ 0.84	-41.57	-42.42 - -40.46	
A1T	111.06 $\pm$ 5.91	110.67	102.33 - 119.75	
A2T	186.30 $\pm$ 2.09	185.81	183.79 - 189.92	
A3T	196.93 $\pm$ 38.47	187.16	170.66 - 273.91	
A4T	-33.27 $\pm$ 6.79	-37.46	-37.89 - -23.90	
DMSO	-10.26 $\pm$ 3.83	-11.63	-13.60 - -5.01	

Kruskal-wallis (Mann-whitney u test)



**Şekil 4-2:** 1 saat Anakardik asit uygulandıktan sonra, TNF- $\alpha$  uygulanan ve 6 saat inkübasyona bırakılan gruplara ait LDH değerleri.

### 4.3.1 saat Anakardik asit uygulandıktan sonra, TNF- $\alpha$ uygulanan ve 6 saat inkübasyona bırakılan gruplara ait göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri değişimleri

#### 4.3.1. ICAM-1 mRNA Seviyelerindeki Değişimler

İnsan safen ven endotel kültürüne 1 saat AA uygulandıktan sonra 6 saat süreyle TNF- $\alpha$  uygulandı. Sonrasında qRT-PCR yöntemi ile saptanan ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri Tablo 4-2 de gösterilmiştir.

Kontrol grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A1, A3 gruplarına göre anlamlı ( $p>0,05$ ) farklılık göstermemiştir. Kontrol grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A4 grubundan anlamlı ( $p<0,05$ ) olarak daha yüksekti. Kontrol grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A2, A1T, A2T, A3T, A4T, TNF- $\alpha$ , DMSO gruplarından anlamlı ( $p < 0,05$ ) olarak daha düşüktü.

A1 grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A1T, TNF- $\alpha$  ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,05$ ).

A2 grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A2T, TNF- $\alpha$  ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,05$ ).

A3 grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A3T, TNF- $\alpha$  ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,05$ ).

A4 grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A4T, TNF- $\alpha$  ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,05$ ).

A1T grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı ( $p<0,05$ ) olarak daha düşüktü. A1T grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı ( $p < 0,05$ ) olarak daha yüksekti.

A2T grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı ( $p<0,05$ ) olarak daha yüksekti. A2T grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı ( $p>0,05$ ) farklılık göstermemiştir.

A3T grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı ( $p<0,05$ ) olarak daha yüksekti. A3T grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı ( $p>0,05$ ) farklılık göstermemiştir.

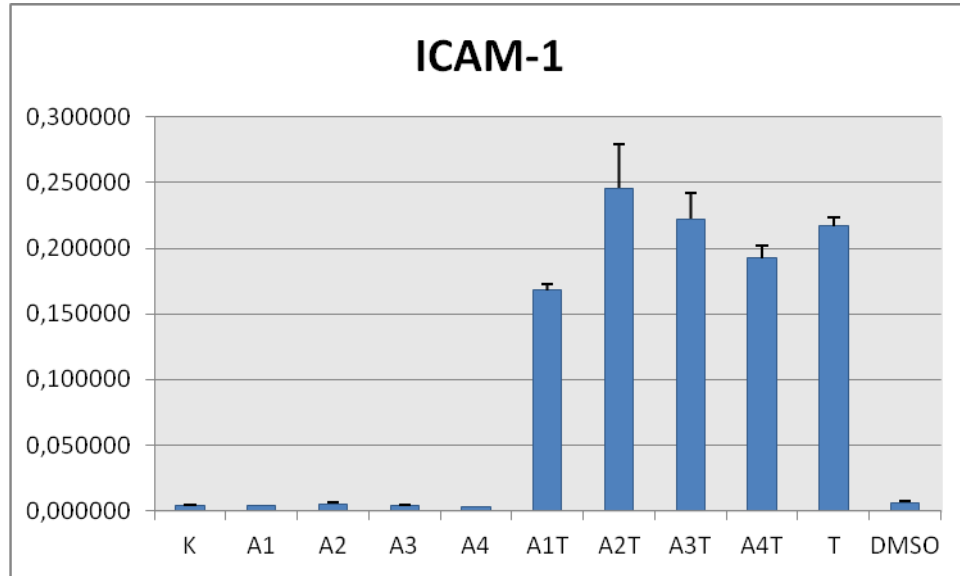
A4T grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı ( $p < 0,05$ ) olarak daha yüksekti. A4T grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı ( $p < 0,05$ ) olarak daha düşüktü.

TNF- $\alpha$  grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı ( $p < 0,05$ ) olarak daha yüksekti. (Tüm gruplara ait değerler Tablo 4-2 de; grafik ise Şekil 4-3 te gösterilmiştir.)

**Tablo 4-2:** qRT-PCR yöntemi ile saptanan ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri

	ICAM - 1			p
	Ort.±s.s.	Medyan	Min-Mak	
Kontrol	0,0040 ± 0,0003	0,0041	0,0037 - 0,0043	<b>0,000</b>
A1	0,0038 ± 0,0002	0,0038	0,0035 - 0,0041	
A2	0,0054 ± 0,0007	0,0053	0,0047 - 0,0062	
A3	0,0039 ± 0,0002	0,0039	0,0037 - 0,0043	
A4	0,0033 ± 0,0001	0,0033	0,0031 - 0,0033	
A1T	0,1682 ± 0,0042	0,1698	0,1619 - 0,1716	
A2T	0,2455 ± 0,0336	0,2504	0,2050 - 0,2762	
A3T	0,2224 ± 0,0194	0,2253	0,1943 - 0,2448	
A4T	0,1922 ± 0,0095	0,1938	0,1784 - 0,2029	
TNF	0,2167 ± 0,0071	0,2196	0,2053 - 0,2223	
DMSO	0,0065 ± 0,0008	0,0066	0,0056 - 0,0073	

Kruskal-wallis ( Mann-whitney u test)



**Şekil 4-3:** qRT-PCR yöntemi ile saptanan ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.

#### 4.3.2. VCAM-1 mRNA Seviyelerindeki Değişimler

İnsan safen ven endotel kültürüne 1 saat AA uygulandıktan sonra 6 saat süreyle TNF- $\alpha$  uygulandı. Sonrasında qRT-PCR yöntemi ile saptanan VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri Tablo 4-3 de gösterilmiştir.

Kontrol grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A2, A3, A4 ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

Kontrol grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A1, A2T , A3T , A4T , TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A1 grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A1T grubundan anlamlı ( $p < 0,05$ ) olarak daha düşüktü, DMSO grubundan ise anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A1 grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A2 grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A2 grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A2T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A3 grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A3 grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A3T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A4 grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A4 grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A4T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A1T grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A2T grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A2T grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A3T grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A3T grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,05$ ).

A4T grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p<0,05$ ).

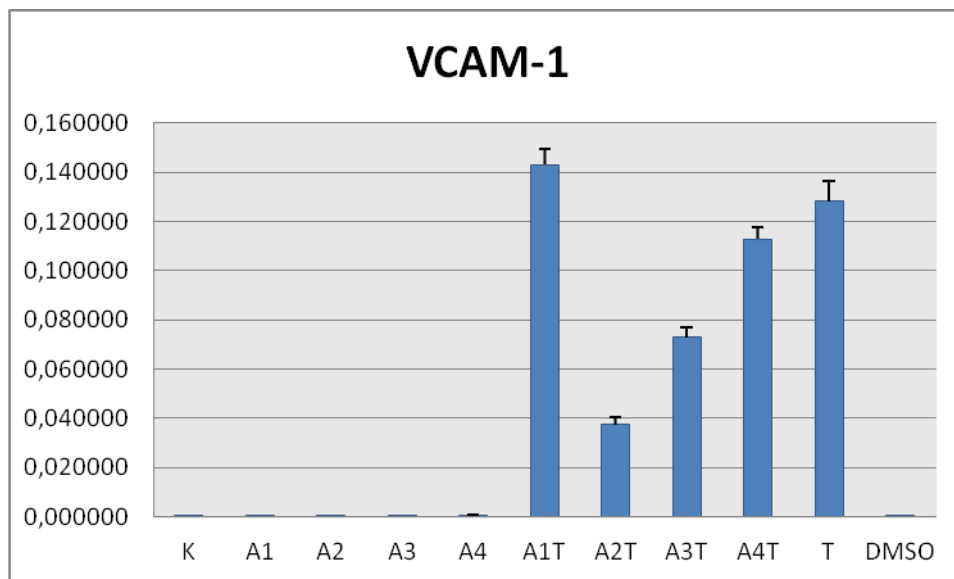
A4T grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p<0,05$ ).

TNF- $\alpha$  grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p<0,05$ ). (Tüm gruplara ait değerler Tablo 4-3 de; grafik ise Şekil 4-4 te gösterilmiştir.)

**Tablo 4-3:** qRT-PCR yöntemi ile saptanan VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.

	VCAM - 1			p
	Ort.±s.s.	Medyan	Min-Mak	
Kontrol	0,00073 ± 0,00005	0,00073	0,0007 - 0,0008	
A1	0,00082 ± 0,00008	0,00082	0,0007 - 0,0009	
A2	0,00010 ± 0,00001	0,00010	0,0001 - 0,0001	
A3	0,00027 ± 0,00002	0,00027	0,0002 - 0,0003	
A4	0,00060 ± 0,00008	0,00064	0,0005 - 0,0007	
A1T	0,14307 ± 0,00650	0,14243	0,1365 - 0,1509	<b>0,000</b>
A2T	0,03737 ± 0,00315	0,03651	0,0346 - 0,0419	
A3T	0,07297 ± 0,00423	0,07137	0,0696 - 0,0796	
A4T	0,11284 ± 0,00482	0,11170	0,1080 - 0,1199	
TNF	0,12814 ± 0,00806	0,12713	0,1196 - 0,1387	
DMSO	0,00006 ± 0,00001	0,00006	0,0000 - 0,0001	

Kruskal-wallis ( Mann-whitney u test)



**Şekil 4-4:** qRT-PCR yöntemi ile saptanan VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.



### 4.3.3. NF-κB mRNA Seviyelerindeki Değişimler

İnsan safen ven endotel kültürüne 1 saat AA uygulandıktan sonra 6 saat süreyle TNF- $\alpha$  uygulandı. Sonrasında qRT-PCR yöntemi ile saptanan NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri Tablo 4-4 de gösterilmiştir.

Kontrol grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A4, A1T, A2T, A3T, A4T, TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı ( $p < 0,05$ ) olarak daha düşüktü, A1, A2, A3 ve DMSO grupları ile kontrol grubu arasında ise anlamlı bir fark saptanmadı.

A1 grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A1T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A2 grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A2T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A3 grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A3T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A4 grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi A4T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A1, A2, A3 ve A4 gruplarında NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubuna göre anlamlı olarak farklılık göstermemiştir ( $p > 0,05$ )

A1T grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  ve DMSO gruplarından anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A2T grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A2T grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A3T grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A3T grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

A4T grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

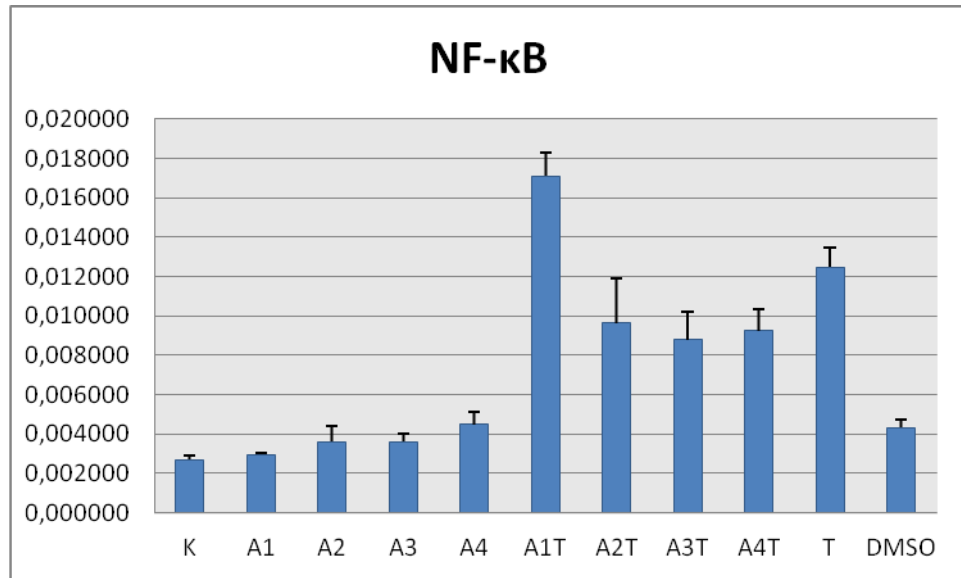
A4T grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ).

TNF- $\alpha$  grubunda NF- $\kappa$ B göreceli mRNA ekspresyon seviyesi DMSO grubundan anlamlı olarak daha yüksekti ( $p < 0,05$ ). (Tüm gruplara ait değerler Tablo 4-4 de; grafik ise Şekil 4-5 te gösterilmiştir.)

**Tablo 4-4:** qRT-PCR yöntemi ile saptanan NF- $\kappa$ B göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri.

	NF- $\kappa$ B			p
	Ort.±s.s.	Medyan	Min-Mak	
Kontrol	0,0027 ± 0,0002	0,0027	0,0024 - 0,0030	<b>0,000</b>
A1	0,0030 ± 0,0001	0,0030	0,0028 - 0,0031	
A2	0,0036 ± 0,0008	0,0035	0,0027 - 0,0048	
A3	0,0036 ± 0,0004	0,0036	0,0030 - 0,0041	
A4	0,0045 ± 0,0006	0,0046	0,0036 - 0,0052	
A1T	0,0171 ± 0,0012	0,0170	0,0155 - 0,0188	
A2T	0,0096 ± 0,0023	0,0087	0,0079 - 0,0133	
A3T	0,0088 ± 0,0014	0,0086	0,0075 - 0,0105	
A4T	0,0092 ± 0,0011	0,0089	0,0083 - 0,0110	
TNF	0,0125 ± 0,0010	0,0126	0,0112 - 0,0134	
DMSO	0,0043 ± 0,0004	0,0042	0,0040 - 0,0049	

Kruskal-wallis ( Mann-whitney u test)



**Şekil 4-5:** qRT-PCR yöntemi ile saptanan NF- $\kappa$ B mRNA seviyeleri.

#### 4.4. Floresan mikroskopik değerlendirme

1 saat Anakardik asit uygulandıktan sonra, TNF- $\alpha$  uygulanan ve 6 saat inkübasyona bırakılan İnsan safen ven endotel kültürüne; ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B için immünfloresan boyama işlemi yapıldı. ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B için yapılan immünfloresan boyamalara ait görüntüler verilmiştir. Şekil 4-6 da; kontrol, A1, A1+TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  ve DMSO; Şekil 4-7 de, kontrol, A2, A2+ TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  ve DMSO; Şekil 4-8 de kontrol, A3, A3+ TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  ve DMSO; Şekil 4-9 da, kontrol, A4, A4+ TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  ve DMSO için yapılmış olan ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B için immünfloresan boyamalar ve bu boyamalara ait görüntülerin karşılaştırılması ile elde edilen resimler görülmektedir. Semikantitatif değerlendirme sonuçları, tablo 4-5 te verilmiştir.

##### 4.4.1. ICAM -1 için immünfloresan boyama sonuçları

Kontrol grubunda ve DMSO grubunda hücre sitoplazmalarında ICAM -1 için zayıf immün pozitiflik gözlemlendi.

5  $\mu$ M AA uygulanan A1 grubunda ICAM-1 için immün reaksiyon görülmedi.

(5  $\mu$ M AA)+TNF- $\alpha$ , uygulanan A1T grubunda ICAM-1 için kuvvetli immün pozitif reaksiyon görüldü. İmmün pozitiflik belirgin şekilde nukleuslarda lokalize idi. Sitoplazmik olarak da daha zayıf bir immün reaksiyon mevcuttu. Bazı hücrelerin yüzeye yakın sitoplazmik bölgelerinde yer yer yoğun immün pozitiflik gösteren bölgeler gözlemlendi (Şekil 4-6).

1  $\mu$ M AA uygulanan A2 grubunda da ICAM-1 için immün reaksiyon görülmedi .

(1  $\mu$ M AA )+TNF- $\alpha$  verilen A2T grubunda ICAM-1 için nukleuslarda görülen immün pozitif reaksiyon, A1T grubuna kıyasla azalmıştı. Endotel hücreleri yüzeyinde ise immün pozitiflik artmıştı. Özellikle lokal parlak noktalar şeklinde dikkati çekmekte idi. Bununla paralel olarak endotel hücreleri zemine yapışmış görünüm kazanmıştı (Şekil 4-7).

0,5  $\mu$ M AA verilen A3 grubunda ICAM-1 için immün reaksiyon görülmedi.

0,5  $\mu$ M AA +TNF- $\alpha$  verilen (A3T) grubunda ICAM-1 pozitifliği A1T ve A2T gruplarına kıyasla çok azalmıştı. Hücre yüzeylerinde az sayıda noktasal immün pozitif bölgeler vardı (Şekil 4-8).

0,1  $\mu$ M AA verilen A4 grubunun da ICAM-1 için immün negatif olduğu görüldü.

0,1  $\mu$ M AA+TNF- $\alpha$  uygulanan A4T grubunda ICAM-1 pozitifliği A1T ve A2T gruplarına kıyasla daha zayıftı. İmmün boyanma sitoplazmik ve yer yer nukleuslarda görüldü. Hücre yüzeylerinde pozitiflik görülmedi. Hücreler zemine yapışmamıştı ve mekik şeklinde bir morfoloji gösterdi (Şekil 4-9).

Sadece TNF- $\alpha$  verilen grupta kuvvetli bir ICAM-1 immün pozitif reaksiyon görüldü. İmmün pozitiflik belirgin şekilde hücre yüzeyinde yerleşik idi. Bazı nukleuslarda da belirgin immünpozitiflik mevcuttu. Bu gruptaki endotel hücreleri diğer gruplardan belirgin olarak farklı bir görünüme sahip olup zemine çok iyi yapışmış ve yayılmış bir morfoloji göstermekte idi.

#### **4.4.2. NF- $\kappa$ B için immünfluoresan boyama sonuçları**

Kontrol grubunda ve DMSO grubunda NF- $\kappa$ B için sitoplazmik ve yer yer nukleus içinde immün pozitiflik gözlemlendi.

(AA 5  $\mu$ M uygulanan) A1 grubunda, NF- $\kappa$ B için immün reaksiyon kontrol gruplarına kıyasla çok daha zayıf olarak görüldü.

(5  $\mu$ M AA)+TNF- $\alpha$ , uygulanan grupta (A1T) kontrol gruplarına kıyasla artmış ve nukleus içinde lokalize NF- $\kappa$ B immünpozitifliği görüldü. (Şekil 4-6)

(1  $\mu$ M AA uygulanan) A2 grubunda A1 grubuna kıyasla NF- $\kappa$ B pozitifliğinde artış vardı. A1 grubunda kontrol gruplarından daha zayıf immün reaksiyon gözlenirken A2 grubunda kontrol grupları ile hemen hemen eşit kuvvette ve aynı yerleşimde immün pozitiflik mevcuttu.

A2T grubunda (1  $\mu$ M AA + TNF-  $\alpha$  uygulanan) nukleuslarda kuvvetli NF- $\kappa$ B immünpozitifliği görüldü. İmmünpozitiflik yer yer daha zayıf olarak sitoplazmada da mevcuttu (Şekil 4-7).

(0,5  $\mu$ M AA uygulanan) A3 grubunda NF- $\kappa$ B için immünpozitiflik kontrol grupları ile hemen hemen aynı ve A1 grubuna kıyasla daha kuvvetli idi.

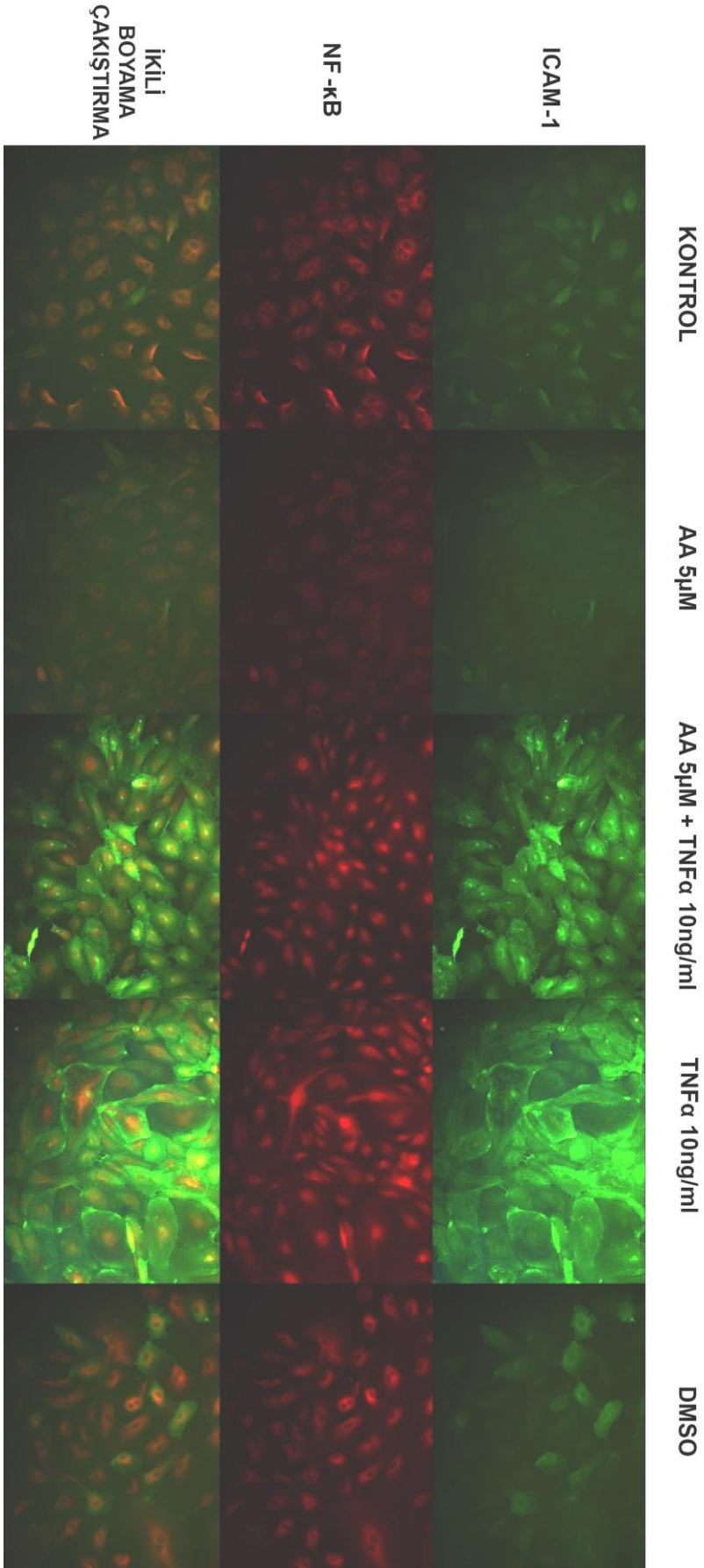
A3T grubunda (0,5  $\mu$ M+TNF-  $\alpha$  uygulanan) NF- $\kappa$ B pozitifliği A2T grubuna kıyasla daha zayıftı (Şekil 4-8)

A4 grubunda (0,1  $\mu$ M AA uygulanan) NF- $\kappa$ B immünpozitifliği A1 grubundaki gibi çok zayıftı.

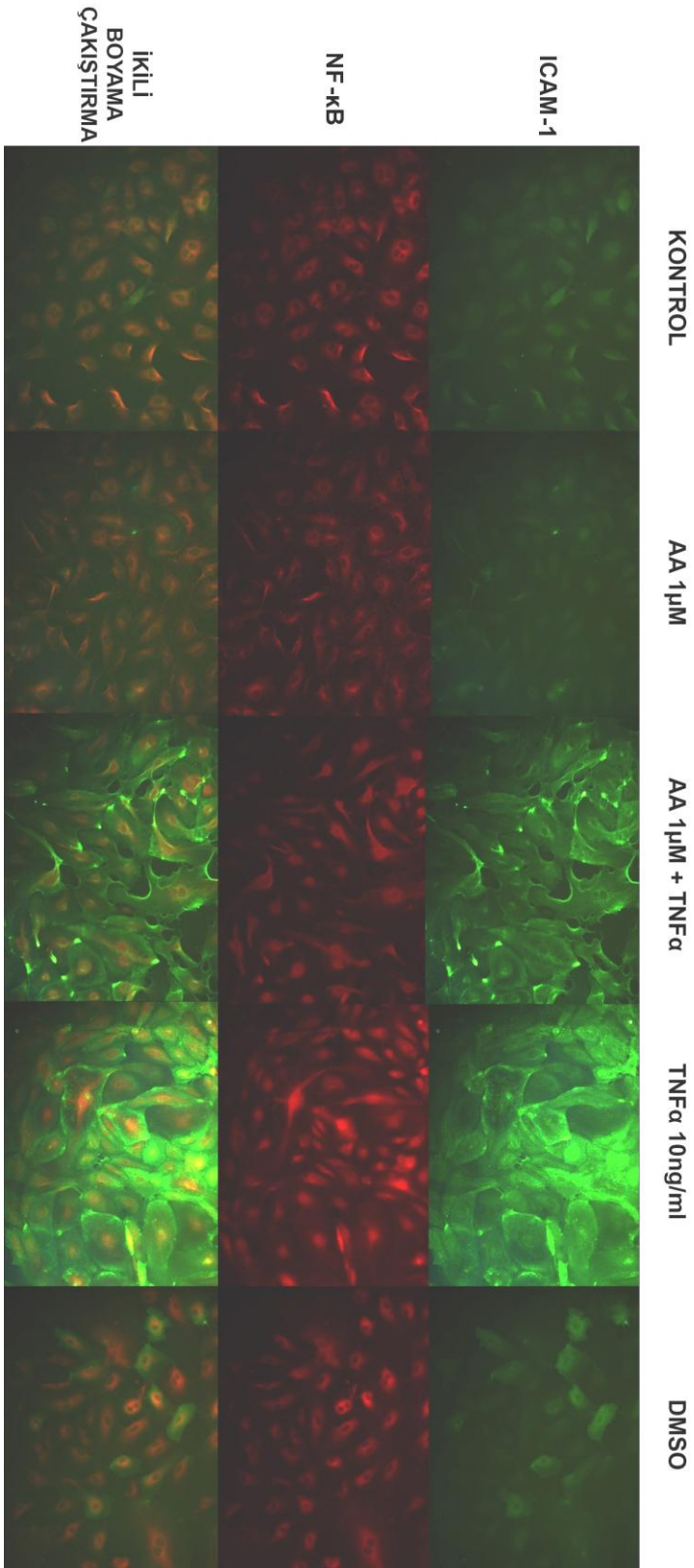
A4T grubunda (0,1  $\mu$ M AA +TNF- $\alpha$  uygulanan) NF- $\kappa$ B immünpozitifliği A4 grubuna kıyasla artmış A1T ve A2T gruplarına göre daha zayıftı (Şekil 4-9)

TNF- $\alpha$  uygulanan grupta nukleus içinde lokalize kuvvetli bir immün pozitif reaksiyon görüldü. Yer yer belirgin sitoplazmik işaretlenme de mevcuttu.

ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B için immün boyanan örneklerin görüntüleri karşılaştırıldığında tüm gruplarda daha önce belirtilen morfolojik özellikler izlenmekte olup TNF- $\alpha$ , ve A1T, A2T, A3T ve A4T gruplarında endotel nukleuslarında her iki antijenin birlikte yerleşim gösterdiği gözlemlendi.

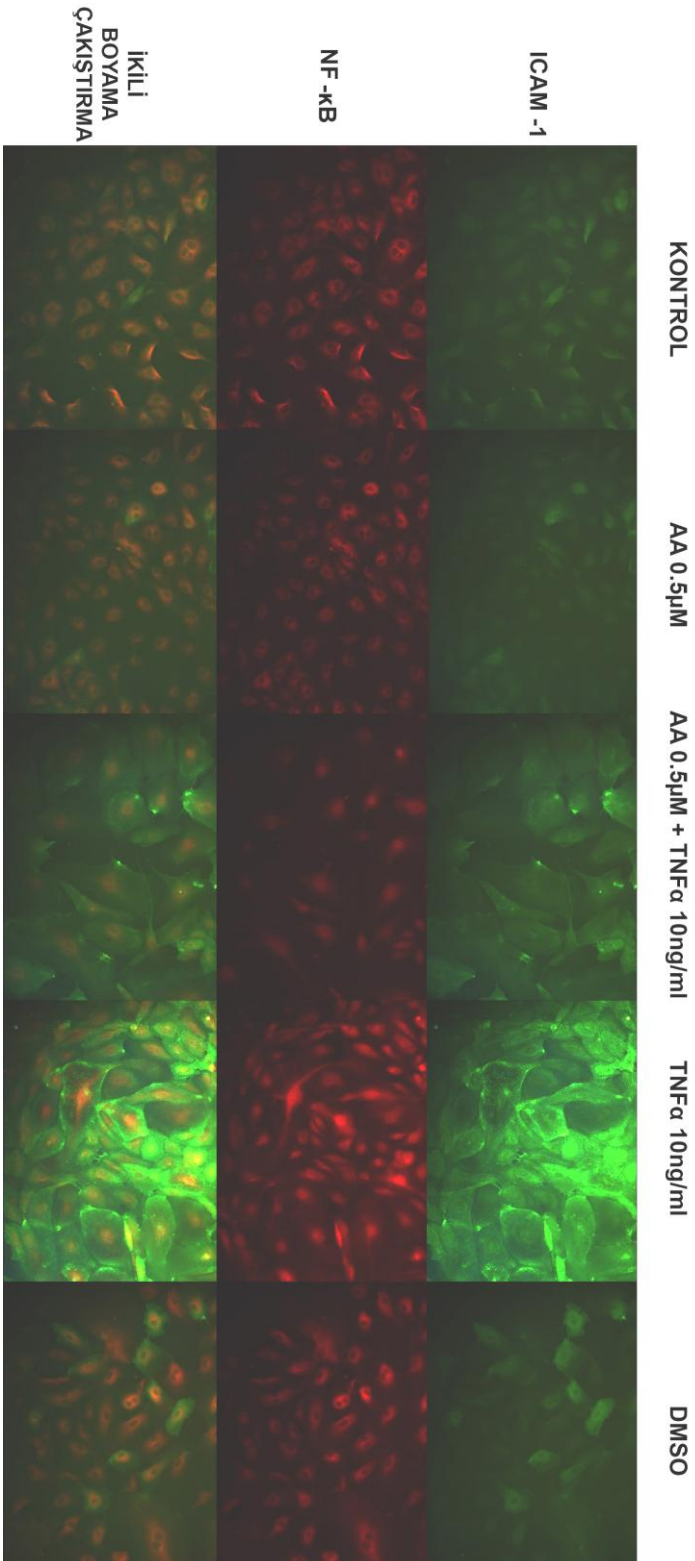


**Şekil 4-6:** A1 (5 µM AA) uygulanan endotel kültüründe ICAM-1 ve NF-κB için immünofluoresan boyama görüntüleri ve iki görüntünün çakıştırma sonuçları. ICAM-1 ve NF-κB min birlikte yerleşim gösterdiği hücre bölümleri turuncu renkte görülmektedir. Büyütme 20X



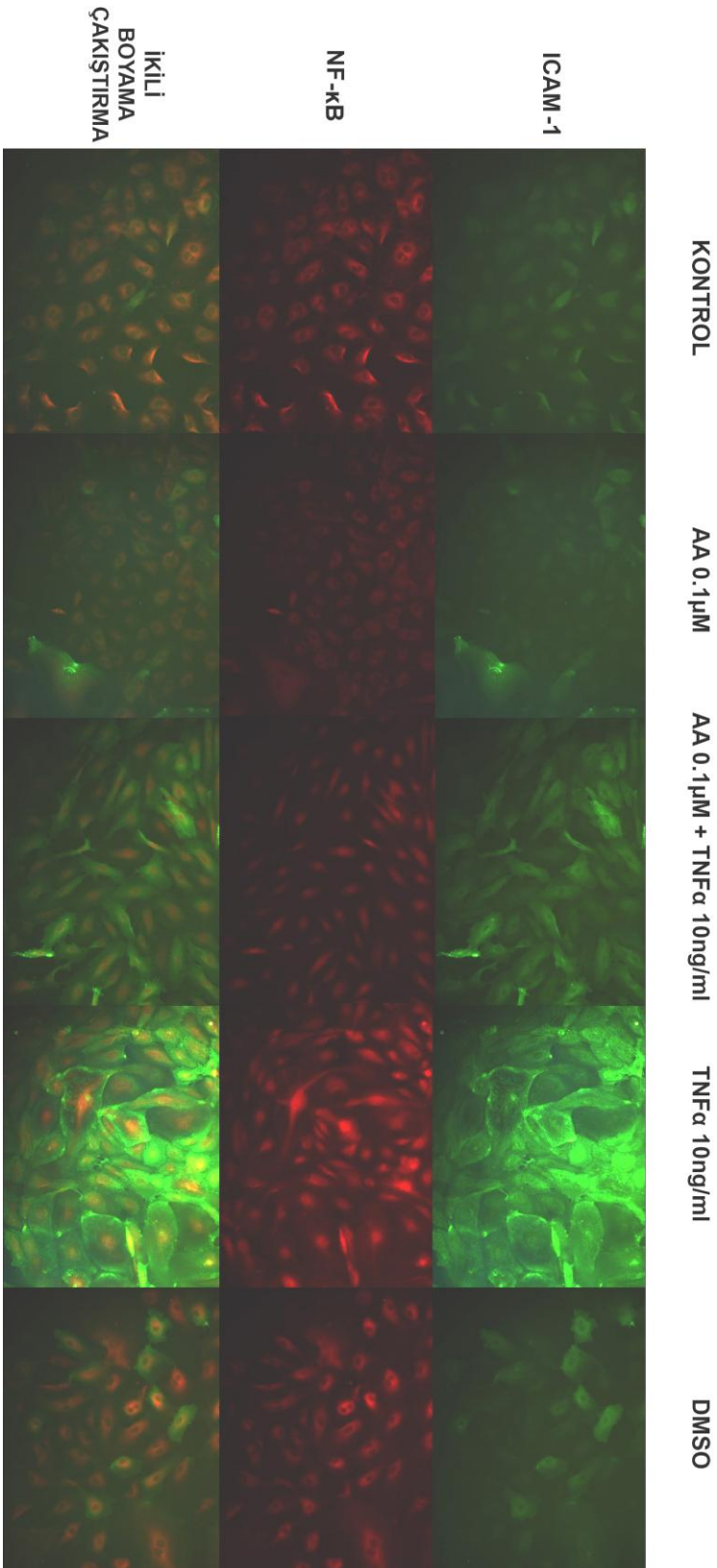
**Şekil 4-7:** AA2 (1  $\mu$ M AA) ve (1  $\mu$ M AA) +TNF- $\alpha$  uygulanan endotel kültüründe ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B için immünfluoresan boyama görüntüleri ve iki görüntünün çakıştırma sonuçları. ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B nin birlikte yerleşim gösterdiği hücre bölgeleri turuncu renkte görülmektedir. Büyütme 20X





**Şekil 4-8:** A3 (0,5 µM AA) uygulanan endotel kültüründe ICAM-1 ve NF-κB için immünofluoresan boyama görüntüleri ve iki görüntünün çakıştırma sonuçları.ICAM-1 ve NF-κB nin birlikte yerleşim gösterdiği hücre bölgeleri turuncu renkte görülmektedir. Büyütme 20X





**Şekil 4-9:** A4 (0,1 µM AA) uygulanan endotel kültüründe ICAM-1 ve NF-κB için immünofluoresan boyama görüntüleri ve iki görüntünün çakıştırma sonuçları. ICAM-1 ve NF-κB' nin birlikte yerleşim gösterdiği hücre bölgeleri turuncu renkte görülmektedir. Büyütme 20X

**Tablo 4-5:** ICAM-1 ve NF- $\kappa$ B için immün boyama sonuçlarının semikantitatif olarak değerlendirilmesi.

Deney Grupları		ICAM-1	NF- $\kappa$ B
Kontrol (DMSO)		+	++
DMSO		+	++
Anakaridik Asit	A1 (5 $\mu$ M AA)	-	+
	A2 (1 $\mu$ M AA)	-	++
	A3 (0,5 $\mu$ M AA)	-	++
	A4 (0,1 $\mu$ M AA)	-	±
Anakaridik Asit + TNF- $\alpha$	A1T (5 $\mu$ M AA+10ng/mL TNF- $\alpha$ )	++++	+++
	A2T (1 $\mu$ M AA+10ng/mL TNF- $\alpha$ )	+++	++
	A3T (0,5 $\mu$ M AA+10ng/mL TNF- $\alpha$ )	++	+
	A4T (0,1 $\mu$ M AA+10ng/mL TNF- $\alpha$ )	++	+
TNF- $\alpha$ (10 ng/mL)		++++	+++

(-)Boyanma yok (±) Çok zayıf boyanma (+)Zayıf boyanma (++) Orta şiddette boyanma  
(+++Kuvvetli boyanma (++++)) Çok kuvvetli boyanma

#### 4.5. İmmünfluoresan Resimlere Ait Analiz Sonuçları

İmmünfluoresan resimler, ImageJ 1.47d (Wayne Rashand, National Institutes of Health, ABD) kullanılarak analiz edildi. ImageJ, belirli makroları kullanarak piksel bazında resim analizi yapan Java temelli bir programdır. Piksel bazında renk yoğunluğu ve dağılımına ait kantitatif bir değer verir.

##### 4.5.1. ICAM-1 ImageJ Fluoresan Yoğunluğu Sonuçları

İnsan safen ven endotel hücrelerine ait ICAM-1 ImageJ kantitatif analiz sonuçları Tablo 4-7 de, grafik ise Şekil 4-10 da verilmiştir (Değerler, Arbitrary Unit cinsindedir).

Kontrol grubunda ICAM-1 fluoresan yoğunluğu değeri A1T, A2T, A3T, A4T, TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A1 grubunda ICAM-1 floresan yoğunluğu değeri A1T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A2 grubunda ICAM-1 floresan yoğunluğu değeri A2T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A3 grubunda ICAM-1 floresan yoğunluğu değeri A3T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A4 grubunda ICAM-1 floresan yoğunluğu değeri A4T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A3T grubunda ICAM-1 floresan yoğunluğu değeri TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A4T grubunda ICAM-1 floresan yoğunluğu değeri TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

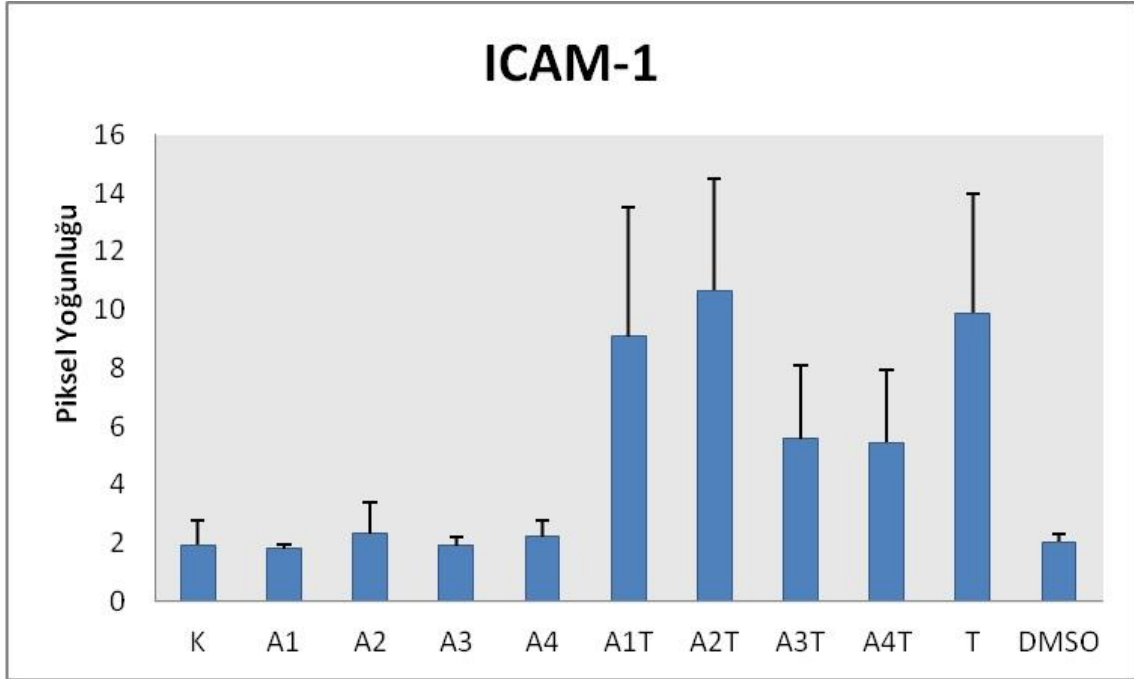
DMSO grubunda ICAM-1 floresan yoğunluğu değeri, kontrol grubu ile farklılık göstermezken, A1T, A2T, A3T, A4T, TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

Diğer grupların karşılaştırılmasında anlamlı bir fark saptanmamıştır. (Tüm gruplara ait değerler Tablo 4-6 ve Şekil 4-10 da gösterilmiştir.)

**Tablo 4-6:** ICAM-1 ImageJ Floresan yoğunluğu sonuçları

	ICAM-1			p
	Ort.±s.s.	Medyan	Min-Mak	
Kontrol	1,93 ± 0,83	1,51	1,12 - 3,36	
A1	1,81 ± 0,12	1,80	1,67 - 1,98	
A2	2,35 ± 1,05	1,89	1,64 - 4,82	
A3	1,91 ± 0,32	1,78	1,63 - 2,64	
A4	2,22 ± 0,56	2,16	1,67 - 3,26	
A1T	9,08 ± 4,44	9,41	2,93 - 14,14	<b>0,000</b>
A2T	10,64 ± 3,83	10,41	5,32 - 15,52	
A3T	5,59 ± 2,53	5,36	2,59 - 10,01	
A4T	5,46 ± 2,50	4,50	3,02 - 9,80	
TNF	9,87 ± 4,08	7,85	6,22 - 15,36	
DMSO	2,03 ± 0,30	1,99	1,60 - 2,53	

Kruskal-wallis ( Mann-whitney u test)



**Şekil 4-10:** ICAM-1 ImageJ Floresan yoğunluğu.

#### 4.5.2. NF- $\kappa$ B ImageJ Floresan Yoğunluğu Sonuçları

İnsan safen ven endotel hücrelerine ait NF- $\kappa$ B ImageJ kantitatif analiz sonuçları Tablo 4-8 de, grafik ise Şekil 4-11 de verilmiştir (Değerler, Arbitrary Unit cinsindedir).

Kontrol grubunda NF- $\kappa$ B floresan yoğunluğu A1T, A2T, TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı ( $p < 0,05$ ) olarak daha düşüktü, diğer gruplar ile arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

A1 grubunda NF- $\kappa$ B floresan yoğunluğu A1T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A2 grubunda NF- $\kappa$ B floresan yoğunluğu A2T ve TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A3 grubunda NF- $\kappa$ B floresan yoğunluğu, A3T grubu ile farklılık göstermezken, TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A4 grubunda NF- $\kappa$ B floresan yoğunluğu, A4T grubu ile farklılık göstermezken, TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A3T grubunda NF- $\kappa$ B floresan yoğunluğu TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

A4T grubunda NF- $\kappa$ B floresan yoğunluğu TNF- $\alpha$  grubundan anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ).

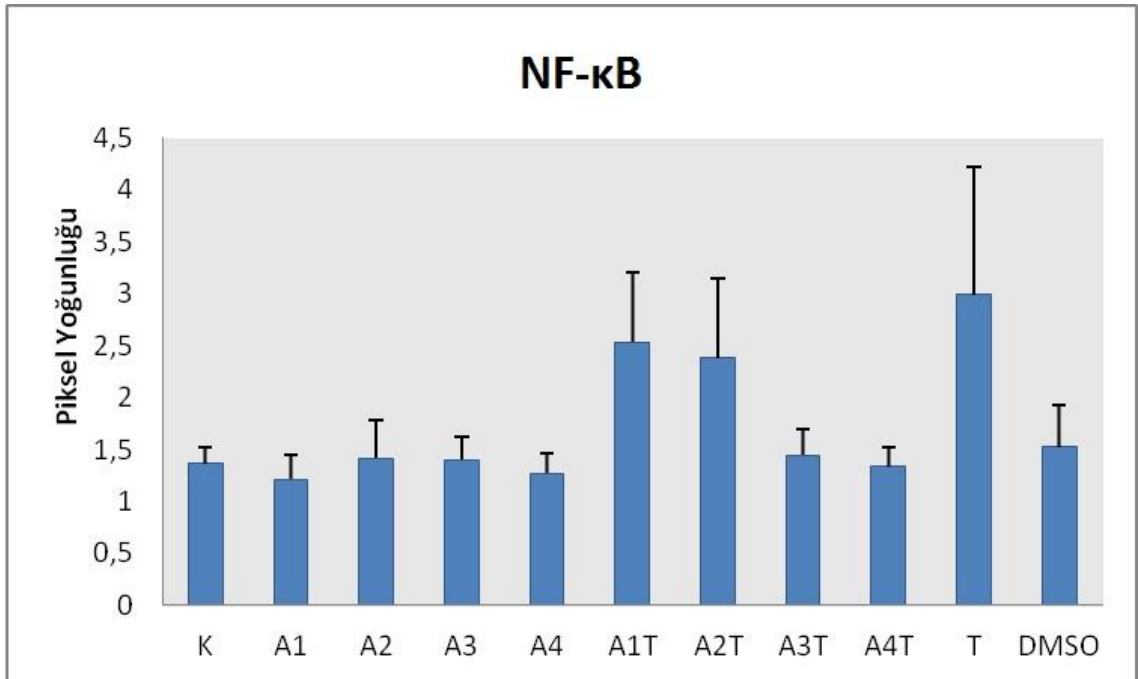
DMSO grubunda NF- $\kappa$ B floresan yoğunluğu kontrol grubu ile farklılık göstermezken, A1T, A2T, TNF- $\alpha$  gruplarından anlamlı olarak daha düşüktü ( $p < 0,05$ ). (Tüm gruplara ait değerler Tablo 4-7 ve Şekil 4-11 de gösterilmiştir.)

Diğer grupların karşılaştırılmasında anlamlı bir fark saptanmamıştır.

**Tablo 4-7:** NF- $\kappa$ B ImageJ Floresan yoğunluğu sonuçları

	NF- $\kappa$ B			p
	Ort. $\pm$ s.s.	Medyan	Min-Mak	
Kontrol	1,36 $\pm$ 0,15	1,39	1,12 - 1,51	0,005
A1	1,21 $\pm$ 0,24	1,21	0,95 - 1,52	
A2	1,42 $\pm$ 0,37	1,30	1,14 - 1,84	
A3	1,40 $\pm$ 0,22	1,36	1,20 - 1,75	
A4	1,27 $\pm$ 0,20	1,27	1,06 - 1,58	
A1T	2,53 $\pm$ 0,67	2,67	1,43 - 3,22	
A2T	2,38 $\pm$ 0,77	2,48	1,24 - 3,15	
A3T	1,45 $\pm$ 0,25	1,38	1,15 - 1,78	
A4T	1,33 $\pm$ 0,18	1,33	1,10 - 1,55	
TNF	2,99 $\pm$ 1,23	3,78	1,35 - 3,79	
DMSO	1,52 $\pm$ 0,41	1,39	1,00 - 1,99	

Kruskal-wallis ( Mann-whitney u test)



**Şekil 4-11:** NF- $\kappa$ B ImageJ Floresan yoğunluğu.

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, insan safen ven endotel hücre kültüründeki hücelere anakardik asit (AA) ve/veya TNF- $\alpha$  uygulanarak oluşturulan deneysel ateroskleroz modeli üzerinde Intercellular Adhesion Molecule-1=Hücrelerarası Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule-1=Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1 (VCAM-1) ve Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells= Aktive edilmiş B hücresi nüklear faktör kappa-hafif-zincir artırıcı (NF- $\kappa$ B) göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini, LDH seviyelerini ve immünfluoresan boyama ile sözkonusu proteinlerin lokalizasyon ve fluoresan yoğunluklarını araştırdık.

Hücre membranından geçebilen bir salisilik asit analogu olan AA, fitokimyasal bir ajandır ve dünya çapında geleneksel bir tedavi kaynağı olarak kullanılmaktadır [135]. AA'nın, prostoglandin sentaz, tirozinaz, lipooksijenaz, histon asetiltransferaz, P300 ve PCAF (P300 /CBF ilişkili faktör) inhibisyonunu sağladığı bildirilmiştir [173]. AA'nın TNF- $\alpha$  ile indüklenen NF- $\kappa$ B aktivasyonunu inhibe edebilme özelliği de bulunmaktadır. Geçerli görüş, bu özelliği serbest oksijen radikallerinin oluşumunu inhibe ederek gerçekleştirdiği üzerinedir. AA'in antioksidan etkisini, superoksit oluşumunu veya ksantin oksidazı inhibe ederek meydana getirdiği bilinmektedir. Ayrıca AA, anjiyogenez ve invazyon ile ilişkili olan gen ürünlerinin inhibisyonunu da sağlayabilmektedir. Yapılan çalışmada, invazyonda [Siklooksijenaz-2 (COX-2), Matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) ve ICAM-1 gibi] ve proliferasyonda (siklin D1 ve c-Myc gibi) rol alan NF- $\kappa$ B ile regüle olan gen ürünleri, AA tarafından inhibe edilmiştir [139].

ICAM-1 eksik (Icam1-/-) farelerin apoE geni eksik farelerle çaprazlandığı çalışmalarda VCAM-1'in aterosklerotik lezyonların olgunlaştırılmasında geri planda rolü olduğu gösterilmiştir. Buna karşın, VCAM-1 ve  $\alpha$ 4 integrin eksik farelerin daha embriyogenez aşamasında ölmeleri nedeniyle VCAM-1 fonksiyonunu erişkin farelerde çalışmak mümkün olmamıştır. Çalışmada LDL reseptör eksik farelerde bu iki adezyon molekülünün erken aterosklerotik lezyon oluşumunda aorta boyunca diferansiyasyona uğraması gerekliliği de gözlenmiştir [36]. ICAM-1 ve VCAM-1'in ekspresyonu immün cevap ve inflamatuvar süreçlerde önemli rol oynamaktadırlar.

AA'nın, inflamatuvar yollarda etki göstermek için kullandığı mekanizmalardan birisi, NF- $\kappa$ B yolağının modifikasyonudur. NF- $\kappa$ B, potansiyel bir proinflamatuvar

nükleer transkripsiyon faktörü olup, başlangıç ve tetiklenmiş inflamasyon cevaplarını sağlar. NF- $\kappa$ B aktivasyonu ve DNA bağlanması, inhibitör proteinlerin indirgenmesine bağlı olup, hedef genlerin transkripsiyonunu artırır. Yapılan çalışmalarda, NF- $\kappa$ B'nin inflamasyon oluşumu ve metabolik hastalıklarla ilişkisi olduğu gösterilmiştir. Visfantin, TNF- $\alpha$ , ve adiponektin gibi adipokinlerin ve adipokin ile azaltılan ya da artırılan MCP-1 (monosit kemotaktik protein-1), IL-6 (İnterlökin-6), IL-8 (İnterlökin-8), E-selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi inflamasyon düzenleyicilerinin ekspresyonunun da insan endotel hücrelerinde NF- $\kappa$ B üzerinden düzenlendiği gösterilmiştir [174].

Koroner arter bypass greft operasyonları ciddi koroner arter hastalığının tedavisinde günümüzde sıklıkla uygulanmaktadır. Her ne kadar arteryel greftlerin uzun süreli açıklığı safen ven greftlere göre daha iyi olsa da; yine yaygın olarak safen ven greftleri de koroner arter bypass greft operasyonlarında kullanılmaktadır. Safen ven greftlerinin uzun süreli açıklığının arteryel greftlere göre daha kötü olmasının nedeni safen ven greft hastalığının gelişmesidir [155, 175].

Safen ven greft hastalığı patogenezinde vasküler inflamasyon, buna bağlı intimal hiperplazi ve ateroskleroz gelişimi majör rol oynamaktadır [155, 175, 176]. Dolayısıyla safen ven greft hastalığı patogenezinin daha iyi aydınlatılması, gelişmesinin önlenmesi ve geliştiği zaman medikal tedavisinin optimal yapılması önem kazanmaktadır. Yapılan çalışmalarda TNF- $\alpha$ 'nın ICAM-1, VCAM-1 ve Nf- $\kappa$ B ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir [174]. Bizim sonuçlarımız bu bulguları desteklemektedir. TNF- $\alpha$  uygulanan grupta ICAM-1, VCAM-1, NF- $\kappa$ B mRNA ekspresyonları ile protein ekspresyonları; kontrol ve AA gruplarına göre anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Dolayısıyla bu durum aterogenez patogenezi ile de uyumludur.

Çalışmamızda, insan safen ven endotel hücreleri üzerinde AA'in etkisini saptamak üzere 4 ayrı dozda (5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,5  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M ) AA uygulaması yapılmış ve öncelikle hangi dozun hücreler için toksik olmadığı saptandı. Sonuçlarımıza göre 0,1  $\mu$ M'lık AA dozunun (A4) toksik etkisinin olmadığı, aksine kültürün geleneksel koşullarında oluşan sitotoksisteyi (LDH) azalttığı belirlendi. Ancak A4 dışında uygulanan diğer AA dozlarının (A1, A2 ve A3) sitotoksisteyi yüksek oranda artırdığı saptandı. AA'in ve TNF- $\alpha$ 'nın içinde çözündürüldüğü DMSO'nun kültürün geleneksel koşullarında oluşan sitotoksisteyi değiştirmede de gösterilerek gruplar arasında oluşan

farklılıkların DMSO kaynaklı olmadığı belirlendi. Aterosklerozun inflamasyon basamağını taklit etmek üzere uyguladığımız TNF- $\alpha$ 'nın 10 ng/ml dozunda uygulamanın ise literatürle uyumlu olarak hücreleri sitotoksik açıdan etkilemediği saptandı [174]. A4 ile TNF- $\alpha$ 'nın birlikte uygulandığı (A4T) grubunun kültürün geleneksel koşullarında oluşan sitotoksisiteyi (LDH) azalttığı belirlendi.

Bu sonuçlara göre A1, A2 ve A3 dozlarının literatürde de gösterilmiş olan dozlara ek olarak insan safen ven endotel hücrelerinin ölümünü tetikleyebilecek dozlar olabileceği [177], A4'ün ise sitotoksik açıdan hücreler açısından en uygun doz olduğuna karar verildi.

Aterosklerozun inflamasyon basamağını taklit etmek üzere uyguladığımız TNF- $\alpha$ 'nın ICAM-1, VCAM-1 ve NF- $\kappa$ B ekspresyonunu indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [174]. Sonuçlarımız da bu bulguları desteklemektedir. TNF- $\alpha$  uygulanan grupta NF- $\kappa$ B; dolayısı ile de ICAM-1 ve VCAM-1 mRNA ve protein ekspresyonları kontrol ve AA gruplarına göre anlamlı derecede yükselmiş ve aterogenez patogenezi ile uyumlu bir durum oluşturmuştur. NF- $\kappa$ B'nin, ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunu indükleyerek aterosklerozun inflamatuvar yolağını uyardığı gösterildi. Yapılan diğer çalışmalarda da TNF- $\alpha$ 'nın NF- $\kappa$ B ekspresyonunu arttırarak bu yolağı uyardığı bildirilmiştir [122, 132]. Çalışmamızda TNF- $\alpha$  tarafından uyarılan ve aterosklerozun inflamasyon basamağını tetikleyen NF- $\kappa$ B ekspresyonunu baskılamak üzere, NF- $\kappa$ B inhibitörü olarak görev aldığı ileri sürülen AA kullanılarak, inflamasyon basamakları geriye döndürülmeye çalışılmıştır. Sonuçlarımız tek başına uygulanan AA'nın farklı dozlarının NF- $\kappa$ B üzerine baskılayıcı etkisi olmadığını göstermesine rağmen, TNF- $\alpha$  ile birlikte uygulandığında, TNF- $\alpha$  ile indüklenen NF- $\kappa$ B ekspresyonunu baskıladığını ve kontrol seviyesinde tuttuğunu göstermiştir. Dolayısıyla AA; TNF- $\alpha$  ile indüklenen NF- $\kappa$ B ekspresyonunu azalttığı için safen greft hastalığının patogenezinde rol oynayan vasküler inflamasyon gelişimini azaltabilir ve safen ven greftlerin en önemli sorunu olan uzun dönem patenslerinin (kapanma/tıkanıklıklarının) kaybını azaltabilir.

Bununla birlikte AA'in TNF- $\alpha$  ile indüklenen NF- $\kappa$ B ekspresyonunu azaltmasındaki temel mekanizmalardan birinin, serbest oksijen radikallerin (SOR) oluşumunu azaltması olduğu öne sürülmüştür [141]. Bilindiği gibi oksidatif stres artışı vasküler inflamasyon gelişimine, özellikle safen ven greft hastalığının ikinci aşaması intimal hiperplaziye ve son aşaması olan ateroskleroza neden olmaktadır [178].



Dolayısıyla AA' in sadece NF- $\kappa$ B inhibisyonu üzerinden değil, SOR oluşumunu azaltmasına bağlı oksidatif stresi azaltması da safen ven greft hastalığının önlenmesinde veya tedavisinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

Bununla birlikte, AA'nın HAT, p300 ve p300/cAMP cevaplı eleman-bağlayan, protein-bağlayan protein ile ilişkili faktörün inhibisyonunu yaptığı farklı çalışmalarda gösterilmiştir. [136, 141] P60 TNF reseptörlerinin; CD, TRADD, TRAF-2, NIK, IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  ve RIP ile ilişkisi, TNF ile indüklenen NF- $\kappa$ B aktivasyonunda önemli rol oynamaktadır. Ek olarak NF- $\kappa$ B'nin TNF- $\alpha$  ile aktivasyonu; seramidler, protein-serin treonin kinazlar, protein tirozin kinazlar, protein tirozin fosfatazlar, reaktif oksijen araçları ve proteazlar gibi farklı araçların dahil olduğu karmaşık bir fenomendir [179]

ICAM-1, endotel hücreleri ve lökositler tarafından normal koşullarda bazal seviyelerde eksprese edilir. Ayrıca, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 ve LPS gibi inflamatuvar uyaranlar ile ekspresyonu artar [67-69]. ICAM-1, lökosit transendotelyal göçü ve antijen sunumu esnasında önemli bir rol alan sıkı adezyonu sağlar ve böylelikle aterogenezde pozitif yönde rol oynar [72]. VCAM-1, özellikle yeni oluşan aterom üzerindeki monosit ve T lenfositlere bağlanır [33]. IL-1 $\beta$  veya TNF- $\alpha$  gibi proinflamatuvar sitokinler NF- $\kappa$ B aracılı VCAM-1 transkripsiyonunu indüklemektedir. Bu da; proinflamatuvar sitokinler, NF- $\kappa$ B, VCAM-1 ve ateroskleroz arasındaki bağlantıyı anlaşılır kılmaktadır [12]. Sonuçlarımıza göre TNF- $\alpha$  ile birlikte uygulanan AA, ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunu tek başına TNF- $\alpha$  uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede düşürmüştür. Bu düşüş NF- $\kappa$ B üzerindeki baskılama etkisinden kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz. Ancak yine de ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunu kontrol grubu ve tek başına anakardik asit uygulanan gruplar seviyesine getirememiştir. Uygulama sürelerini arttırmak veya ardışık uygulamalar yapmak bu etkiyi daha doğru saptayabilmek açısından doğru bir yaklaşım olabilir.

Özellikle safen ven greftlerin, koroner arter bypass greft operasyonunda arterlere anastomozu sonucu yüksek basınca maruz kalmasıyla safen ven greft endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [180, 181] Bu durum; safen venlerde inflamasyon gelişimi ve sonrasında ateroskleroza yol açarak, safen ven greft hastalığının gelişmesine yol açmakta, dolayısıyla erken ve geç dönem safen ven greft açıklığının kaybolmasına neden olmaktadır. Bu bağlamda bizim çalışmamızda elde ettiğimiz AA'in inflamasyonla indüklenen ICAM-1 ve VCAM-1

ekspresyonunu azaltması safen greft hastalığının gelişmesinin önlenmesi açısından önemli bir sonuç olarak değerlendirilmelidir. Vasküler inflamasyon ve ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynayan adezyon moleküllerinin ekspresyonundaki azalmanın muhtemel nedeni; AA'nın, NF-κB ekspresyonunu azaltması olabilir. Çünkü yapılan çalışmalarda adezyon moleküllerinin ekspresyonunda, NF-κB'nin önemli bir düzenleyici rolü olan transkripsiyon faktörü olduğu gösterilmiştir [182-185].

Çalışmamızda, diğer taraftan farklı AA dozlarının ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonları üzerine etkilerine bakıldığında, grupların ICAM-1 ekspresyonu ne kadar yükseğe VCAM-1 ekspresyonunun o kadar düşük olduğu saptanmıştır. VCAM-1 gen ekspresyonunun regülasyonu, NF-κB aracılığı ile oksidatif strese eşlik etmektedir. VCAM-1 in sitokin ile aktiflenen endotelial ekspresyonu, NF-κB mobilizasyonunun antioksidanlar tarafından baskılanmasıyla inhibe edilirler. NF-κB aktivasyonu, endotelial hücrelerde adezyon moleküllerinin transkripsiyonlarının indüksiyonu için önem arz etmektedir. Buna rağmen transkripsiyonun maksimum şekilde indüklenebilmesi için farklı transkripsiyon faktörlerinin kombinasyonları; VCAM-1 için SP-1, AP-1, GATA ve IRF; ICAM-1 için SP-1 ve AP-1; her ikisine de NF-κB gereklidir [186]. Yaptığımız çalışmada, AA in NF-κB aktivasyonunu ve TNF-α'ya yanıt olarak ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonlarını hangi yol ile inhibe ettiği; ayrıca ICAM-1 ve VCAM-1 in birbirlerine zıt olarak ekspresyonlarının hangi yolla değiştiği araştırılmamıştır. Ancak ileride yapılacak çalışmalarla belirlenmeye çalışılacaktır.

Çalışmamız sonucunda safen greft ven endotel kültür hücrelerine TNF-α ile birlikte uygulanan AA'nın ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonunu tek başına TNF-α uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede azaltmasına rağmen; adezyon moleküllerinin ekspresyon düzeyini kontrol grubu ve tek başına AA uygulanan gruplar düzeyine indiremediği belirlenmiştir. Bunun nedeni TNF-α'nın inflamasyonu indükleyerek adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırmasının sadece NF-κB yoluyla değil, başka transkripsiyon faktörleri üzerinden de olabileceğini düşündürmektedir [187, 188]. Diğer taraftan bizim çalışmamızda endotel kültür hücrelerine AA, kısa süreli uygulanmıştır, dolayısıyla AA uygulama sürelerini arttırmak veya ardışık uygulamalar yapmak bu etkiyi daha doğru saptayabilmek açısından doğru bir yaklaşım olabilir.

Özellikle sitotoksik açıdan hücreler için uygun doz olduğu saptanan A4 dozunun TNF-α ile birlikte uygulandığı grupta (A4T) ICAM-1 ekspresyonu düşerken VCAM-1 ekspresyonun arttığı görülmüştür. Bu durum AA'nın etkisini hücre-hücre

bağlantısını arttırırken, hücre-lökosit bağlantısını azaltmak yönünde olduğunu gösterebilir. Bu nedenle AA'nın etkisine tek yönlü olarak NF-κB tarafından bakılmamalı; başka hücre içi mekanizmaların da bu mekanizmaya dahil olabileceği ve AA'nın daha kompleks bir düzenleyici olabileceği gözden kaçırılmamalıdır.

Çalışmamızda endotel hücreleri üzerine kısa süreli AA uygulaması yapılarak, AA'in adezyon molekülleri üzerine olan akut etkisi saptanmıştır. Uzun süreli uygulamalarda ise henüz bir bilgi bulunmamakla birlikte; AA'nın safen ven greft hastalığının gelişmesinin önlenmesinde ve tedavisinde NF-κB yolağı üzerinden, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak etkili olabileceği düşünülebilir. Dolayısıyla AA'nın safen ven greft hastalığındaki etkinliğini ve patogenezi üzerine etkilerinin moleküler temellerini daha iyi ortaya koyabilmek için yeni deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

**Çalışmamızın limitasyonları:** Doktora tez projesi bütçesinin yetersiz kalmasından ötürü çalışmayan VCAM-1 (Abcam – ab112074) antikoru farklı bir antikorla değiştirilemedi ve VCAM-1 immünfluoresan boyama işlemi gerçekleştirilemedi. Bununla birlikte NF-κB inhibitörü olan farklı maddelerle de kıyaslama yapılamaması aynı neden üzerinedir.

## KAYNAKLAR

1. Ross, R. and J.A. Glomset, *The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)*. N Engl J Med, 1976. **295**(8): p. 420-5.
2. Stocker, R. and J.F. Kearney, Jr., *Role of oxidative modifications in atherosclerosis*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1381-478.
3. Onat A, K.G., Ökçün B, Dönmez K, Keleş İ, Sansoy V. , *Türk Erişkinlerinde Ölüm ve Koroner Olaylar: TEKHARF Çalışması Kohortunun 5-Yıllık Takibi*. Türk Kardiyol Dern Arş, 1996. **24**(1): p. 8-15.
4. Weber, C. and H. Noels, *Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1410-22.
5. Ross, R., *Atherosclerosis--an inflammatory disease*. N Engl J Med, 1999. **340**(2): p. 115-26.
6. Lee, K.W., et al., *Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes*. Blood, 2005. **105**(2): p. 526-32.
7. Lerman, A. and A.M. Zeiher, *Endothelial function: cardiac events*. Circulation, 2005. **111**(3): p. 363-8.
8. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis*. Circulation, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
9. Williams, K.J. and I. Tabas, *The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(5): p. 551-61.
10. Landmesser, U., B. Hornig, and H. Drexler, *Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?* Circulation, 2004. **109**(21 Suppl 1): p. II27-33.
11. Tsao, P.S., et al., *Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1*. Circulation, 1997. **96**(3): p. 934-40.
12. De Caterina, R., et al., *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 60-8.
13. Li, H. and U. Forstermann, *Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 244-54.
14. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, *Inflammation and atherosclerosis*. Circulation, 2002. **105**(9): p. 1135-43.
15. Steinberg, D., et al., *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. N Engl J Med, 1989. **320**(14): p. 915-24.
16. Miller, Y.I., et al., *Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(6): p. 1213-9.
17. Aviram, M., et al., *Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase*. J Clin Invest, 1998. **101**(8): p. 1581-90.
18. Jara, L.J., et al., *Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases*. Autoimmun Rev, 2006. **5**(3): p. 195-201.
19. Sary, H.C., et al., *A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Arterioscler Thromb, 1992. **12**(1): p. 120-34.

20. Guyton, J.R. and K.F. Klemp, *Transitional features in human atherosclerosis. Intimal thickening, cholesterol clefts, and cell loss in human aortic fatty streaks.* Am J Pathol, 1993. **143**(5): p. 1444-57.
21. Nakashima, Y., et al., *Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age.* Virchows Arch, 2002. **441**(3): p. 279-88.
22. Olin-Lewis, K., et al., *ApoC-III content of apoB-containing lipoproteins is associated with binding to the vascular proteoglycan biglycan.* J Lipid Res, 2002. **43**(11): p. 1969-77.
23. Faggiotto, A., R. Ross, and L. Harker, *Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation.* Arteriosclerosis, 1984. **4**(4): p. 323-40.
24. Morel, D.W., P.E. DiCorleto, and G.M. Chisolm, *Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation.* Arteriosclerosis, 1984. **4**(4): p. 357-64.
25. Parthasarathy, S., et al., *Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor.* Arteriosclerosis, 1986. **6**(5): p. 505-10.
26. Libby, P., *Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes.* Circulation, 2001. **104**(3): p. 365-72.
27. Greaves, D.R. and S. Gordon, *The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges.* J Lipid Res, 2009. **50 Suppl**: p. S282-6.
28. Klouche, M., et al., *Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation.* Circulation, 2000. **101**(15): p. 1799-805.
29. Shiffman, D., et al., *Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages.* J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37324-32.
30. Warner, G.J., et al., *Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol.* J Biol Chem, 1995. **270**(11): p. 5772-8.
31. Ball, R.Y., et al., *Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma.* Atherosclerosis, 1995. **114**(1): p. 45-54.
32. Poole, J.C. and H.W. Florey, *Changes in the endothelium of the aorta and the behaviour of macrophages in experimental atheroma of rabbits.* J Pathol Bacteriol, 1958. **75**(2): p. 245-51.
33. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis.* Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
34. Cybulsky, M.I. and M.A. Gimbrone, Jr., *Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis.* Science, 1991. **251**(4995): p. 788-91.
35. Li, H., et al., *An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium.* Arterioscler Thromb, 1993. **13**(2): p. 197-204.
36. Cybulsky, M.I., et al., *A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis.* J Clin Invest, 2001. **107**(10): p. 1255-62.
37. Johnson, R.C., et al., *Absence of P-selectin delays fatty streak formation in mice.* J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 1037-43.
38. Dong, Z.M., et al., *The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis.* J Clin Invest, 1998. **102**(1): p. 145-52.

39. Collins, T. and M.I. Cybulsky, *NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis?* J Clin Invest, 2001. **107**(3): p. 255-64.
40. Topper, J.N. and M.A. Gimbrone, Jr., *Blood flow and vascular gene expression: fluid shear stress as a modulator of endothelial phenotype.* Mol Med Today, 1999. **5**(1): p. 40-6.
41. Gu, L., et al., *Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice.* Mol Cell, 1998. **2**(2): p. 275-81.
42. Boring, L., et al., *Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis.* Nature, 1998. **394**(6696): p. 894-7.
43. Boisvert, W.A., et al., *A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice.* J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 353-63.
44. Mach, F., et al., *Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells.* J Clin Invest, 1999. **104**(8): p. 1041-50.
45. Haley, K.J., et al., *Overexpression of eotaxin and the CCR3 receptor in human atherosclerosis: using genomic technology to identify a potential novel pathway of vascular inflammation.* Circulation, 2000. **102**(18): p. 2185-9.
46. Clinton, S.K., et al., *Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis.* Am J Pathol, 1992. **140**(2): p. 301-16.
47. Rosenfeld, M.E., et al., *Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans.* Am J Pathol, 1992. **140**(2): p. 291-300.
48. Smith, J.D., et al., *Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(18): p. 8264-8.
49. Rajavashisth, T., et al., *Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor- deficient mice.* J Clin Invest, 1998. **101**(12): p. 2702-10.
50. Sugiyama, S., et al., *Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes.* Am J Pathol, 2001. **158**(3): p. 879-91.
51. Yokoya, K., et al., *Process of progression of coronary artery lesions from mild or moderate stenosis to moderate or severe stenosis: A study based on four serial coronary arteriograms per year.* Circulation, 1999. **100**(9): p. 903-9.
52. Davies, M.J., *Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995.* Circulation, 1996. **94**(8): p. 2013-20.
53. Virmani, R., et al., *Pathology of the unstable plaque.* Prog Cardiovasc Dis, 2002. **44**(5): p. 349-56.
54. de Boer, O.J., et al., *Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization?* Cardiovasc Res, 1999. **41**(2): p. 443-9.
55. Rajavashisth, T.B., et al., *Inflammatory cytokines and oxidized low density lipoproteins increase endothelial cell expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase.* J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11924-9.

56. Brogi, E., et al., *Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages.* J Clin Invest, 1993. **92**(5): p. 2408-18.
57. Ramos, M.A., et al., *Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(7): p. 1188-96.
58. Moulton, K.S., et al., *Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice.* Circulation, 1999. **99**(13): p. 1726-32.
59. Sukhova, G.K., et al., *Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques.* Circulation, 1999. **99**(19): p. 2503-9.
60. Saren, P., H.G. Welgus, and P.T. Kovanen, *TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages.* J Immunol, 1996. **157**(9): p. 4159-65.
61. Kovanen, P.T., M. Kaartinen, and T. Paavonen, *Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction.* Circulation, 1995. **92**(5): p. 1084-8.
62. Navab, M., et al., *High density associated enzymes: their role in vascular biology.* Curr Opin Lipidol, 1998. **9**(5): p. 449-56.
63. Schmidt, A.M., et al., *Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis.* Circ Res, 1999. **84**(5): p. 489-97.
64. Aikawa, M., et al., *An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro.* Circulation, 2001. **103**(2): p. 276-83.
65. Carlson, M., et al., *Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pMCT108.2) on chromosome 18 [D18S24].* Nucleic Acids Res, 1988. **16**(9): p. 4188.
66. Katz, F.E., et al., *Chromosome mapping of cell membrane antigens expressed on activated B cells.* Eur J Immunol, 1985. **15**(1): p. 103-6.
67. Pober, J.S., et al., *Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon.* J Immunol, 1986. **137**(6): p. 1893-6.
68. Dustin, M.L., et al., *Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1).* J. Immunol. 1986. **137**: 245-254. J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5024-33.
69. Sampath, R., et al., *Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro.* Ann Biomed Eng, 1995. **23**(3): p. 247-56.
70. Cronstein, B.N., et al., *A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(21): p. 9991-5.
71. Renkonen, R., et al., *IL-4 decreases IFN-gamma-induced endothelial ICAM-1 expression by a transcriptional mechanism.* Scand J Immunol, 1992. **35**(5): p. 525-30.

72. Springer, T.A., *Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration*. *Annu Rev Physiol*, 1995. **57**: p. 827-72.
73. Wolf S.I. , L.C., *ICAM-1: Contribution to Vascular Inflammation and Early Atherosclerosis*, in *Coronary Artery Disease - New Insights and Novel Approaches*. 2012, IntechOpen. p. 65-90.
74. Blankenberg, S., S. Barbaux, and L. Tiret, *Adhesion molecules and atherosclerosis*. *Atherosclerosis*, 2003. **170**(2): p. 191-203.
75. Greenwood, J., Y. Wang, and V.L. Calder, *Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1*. *off. Immunology*, 1995. **86**(3): p. 408-15.
76. Reiss, Y. and B. Engelhardt, *T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2*. *Int Immunol*, 1999. **11**(9): p. 1527-39.
77. Lehmann, J.C., et al., *Overlapping and selective roles of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in lymphocyte trafficking*. *J Immunol*, 2003. **171**(5): p. 2588-93.
78. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(9): p. 678-89.
79. Barreiro, O., et al., *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. *J Cell Biol*, 2002. **157**(7): p. 1233-45.
80. van Buul, J.D. and P.L. Hordijk, *Signaling in leukocyte transendothelial migration*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(5): p. 824-33.
81. Grakoui, A., et al., *The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation*. *Science*, 1999. **285**(5425): p. 221-7.
82. Chen, C., et al., *High affinity very late antigen-4 subsets expressed on T cells are mandatory for spontaneous adhesion strengthening but not for rolling on VCAM-1 in shear flow*. *J Immunol*, 1999. **162**(2): p. 1084-95.
83. Nakashima, Y., et al., *Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. **18**(5): p. 842-51.
84. O'Brien, K.D., et al., *Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis*. *J Clin Invest*, 1993. **92**(2): p. 945-51.
85. Patel, S.S., et al., *Inhibition of alpha4 integrin and ICAM-1 markedly attenuate macrophage homing to atherosclerotic plaques in ApoE-deficient mice*. *Circulation*, 1998. **97**(1): p. 75-81.
86. Ramos, C.L., et al., *Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice*. *Circ Res*, 1999. **84**(11): p. 1237-44.
87. Gurtner, G.C., et al., *Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation*. *Genes Dev*, 1995. **9**(1): p. 1-14.
88. Nageh, M.F., et al., *Deficiency of inflammatory cell adhesion molecules protects against atherosclerosis in mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. **17**(8): p. 1517-20.



89. Collins, R.G., et al., *P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 189-94.
90. Dong, Z.M., A.A. Brown, and D.D. Wagner, *Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice*. Circulation, 2000. **101**(19): p. 2290-5.
91. Koni, P.A., et al., *Conditional vascular cell adhesion molecule 1 deletion in mice: impaired lymphocyte migration to bone marrow*. J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 741-54.
92. Leuker, C.E., et al., *Neonatally induced inactivation of the vascular cell adhesion molecule 1 gene impairs B cell localization and T cell-dependent humoral immune response*. J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 755-68.
93. Ley, K. and Y. Huo, *VCAM-1 is critical in atherosclerosis*. J Clin Invest, 2001. **107**(10): p. 1209-10.
94. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
95. Brasier, A.R., *The NF-kappaB regulatory network*. Cardiovasc Toxicol, 2006. **6**(2): p. 111-30.
96. Perkins, N.D., *Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 49-62.
97. Gilmore, T.D., *The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction*. Oncogene, 1999. **18**(49): p. 6842-4.
98. Albensi, B.C. and M.P. Mattson, *Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity*. Synapse, 2000. **35**(2): p. 151-9.
99. Meffert, M.K., et al., *NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior*. Nat Neurosci, 2003. **6**(10): p. 1072-8.
100. Levenson, J.M., et al., *A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel*. J Neurosci, 2004. **24**(16): p. 3933-43.
101. Merlo, E., R. Freudenthal, and A. Romano, *The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab Chasmagnathus*. Neuroscience, 2002. **112**(1): p. 161-72.
102. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
103. Senftleben, U., et al., *Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway*. Science, 2001. **293**(5534): p. 1495-9.
104. Plaksin, D., P.A. Baeuerle, and L. Eisenbach, *KBF1 (p50 NF-kappa B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1651-62.
105. Guan, H., S. Hou, and R.P. Ricciardi, *DNA binding of repressor nuclear factor-kappaB p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 9957-62.
106. Sen, R. and D. Baltimore, *Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences*. Cell 1986. **46**: 705-716. J Immunol, 2006. **177**(11): p. 7485-96.
107. Doyle, S.L. and L.A. O'Neill, *Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity*. Biochem Pharmacol, 2006. **72**(9): p. 1102-13.

108. Collins, T., et al., *Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers*. FASEB J, 1995. **9**(10): p. 899-909.
109. Sullivan, J.C., et al., *Rel homology domain-containing transcription factors in the cnidarian Nematostella vectensis*. Dev Genes Evol, 2007. **217**(1): p. 63-72.
110. Hoffmann, A., G. Natoli, and G. Ghosh, *Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6706-16.
111. Srivastava, S.K. and K.V. Ramana, *Focus on molecules: nuclear factor-kappaB*. Exp Eye Res, 2009. **88**(1): p. 2-3.
112. Hoffmann, A. and D. Baltimore, *Circuitry of nuclear factor kappaB signaling*. Immunol Rev, 2006. **210**: p. 171-86.
113. O'Dea, E. and A. Hoffmann, *NF-kappaB signaling*. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2009. **1**(1): p. 107-15.
114. Tam, W.F., et al., *Cytoplasmic sequestration of rel proteins by IkappaBalpha requires CRM1-dependent nuclear export*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(6): p. 2269-84.
115. Lee, S.H. and M. Hannink, *Characterization of the nuclear import and export functions of Ikappa B(epsilon)*. J Biol Chem, 2002. **277**(26): p. 23358-66.
116. Scott, M.L., et al., *The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms*. Genes Dev, 1993. **7**(7A): p. 1266-76.
117. Kearns, J.D., et al., *IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression*. J Cell Biol, 2006. **173**(5): p. 659-64.
118. Dejardin, E., et al., *The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways*. Immunity, 2002. **17**(4): p. 525-35.
119. Brand, K., et al., *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion*. J Clin Invest, 1996. **97**(7): p. 1715-22.
120. Barath, P., et al., *Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization*. Am J Pathol, 1990. **137**(3): p. 503-9.
121. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
122. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, *Function and activation of NF-kappa B in the immune system*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 141-79.
123. Qwarnstrom, E.E., et al., *Fibronectin attachment activates the NF-kappa B p50/p65 heterodimer in fibroblasts and smooth muscle cells*. J Biol Chem, 1994. **269**(49): p. 30765-8.
124. Witztum, J.L. and D. Steinberg, *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis*. J Clin Invest, 1991. **88**(6): p. 1785-92.
125. Parhami, F., et al., *Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate*. J Clin Invest, 1993. **92**(1): p. 471-8.
126. Peng, H.B., et al., *Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 17050-5.
127. Brand, K., et al., *Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis*. Exp Physiol, 1997. **82**(2): p. 297-304.

128. Ares, M.P., et al., *Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor-kappa B in human vascular smooth muscle cells*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. **15**(10): p. 1584-90.
129. Schackelford, R.E., et al., *Oxidized low density lipoprotein suppresses activation of NF kappa B in macrophages via a pertussis toxin-sensitive signaling mechanism*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(8): p. 3475-8.
130. Terkeltaub, R., et al., *Oxidized LDL induces monocytic cell expression of interleukin-8, a chemokine with T-lymphocyte chemotactic activity*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(1): p. 47-53.
131. Brand, K., et al., *Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes*. *Arterioscler Thromb*, 1994. **14**(5): p. 790-7.
132. Collins, T., *Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion*. *Lab Invest*, 1993. **68**(5): p. 499-508.
133. Hemshekhar, M., et al., *Emerging roles of anacardic acid and its derivatives: a pharmacological overview*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2012. **110**(2): p. 122-32.
134. Wisastra, R., et al., *Anacardic acid derived salicylates are inhibitors or activators of lipoxygenases*. *Bioorg Med Chem*, 2012. **20**(16): p. 5027-32.
135. Sukumari-Ramesh, S., et al., *Anacardic acid induces caspase-independent apoptosis and radiosensitizes pituitary adenoma cells*. *J Neurosurg*, 2011. **114**(6): p. 1681-90.
136. Balasubramanyam, K., et al., *Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(21): p. 19134-40.
137. Sun, Y., et al., *Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation*. *FEBS Lett*, 2006. **580**(18): p. 4353-6.
138. Mantelingu, K., et al., *Activation of p300 histone acetyltransferase by small molecules altering enzyme structure: probed by surface-enhanced Raman spectroscopy*. *J Phys Chem B*, 2007. **111**(17): p. 4527-34.
139. Sung, B., et al., *Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaBalpha kinase, leading to potentiation of apoptosis*. *Blood*, 2008. **111**(10): p. 4880-91.
140. Mai, A., et al., *Small-molecule inhibitors of histone acetyltransferase activity: identification and biological properties*. *J Med Chem*, 2006. **49**(23): p. 6897-907.
141. Chen, L.F., et al., *NF-kappaB RelA phosphorylation regulates RelA acetylation*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(18): p. 7966-75.
142. Paramashivappa, R., et al., *Design, synthesis and biological evaluation of benzimidazole/benzothiazole and benzoxazole derivatives as cyclooxygenase inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003. **13**(4): p. 657-60.
143. Grazzini, R., et al., *Inhibition of lipoxygenase and prostaglandin endoperoxide synthase by anacardic acids*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991. **176**(2): p. 775-80.
144. Shishodia, S. and B.B. Aggarwal, *Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by*

- suppressing activation of IkappaBalpha kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9.* Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 5004-12.
145. Marwick, C., *Coronary bypass grafting economics, including rehabilitation.* Curr Opin Cardiol, 1994. **9**(6): p. 635-40.
  146. Cooper, G.J., M.J. Underwood, and P.B. Deverall, *Arterial and venous conduits for coronary artery bypass. A current review.* Eur J Cardiothorac Surg, 1996. **10**(2): p. 129-40.
  147. Souza, D.S. and W.J. Gomes, *The future of saphenous vein graft for coronary artery.* Rev Bras Cir Cardiovasc, 2008. **23**(3): p. III-VII.
  148. Glineur, D. and C. Hanet, *Competitive flow in coronary bypass surgery: is it a problem?* Curr Opin Cardiol, 2012. **27**(6): p. 620-8.
  149. Dreifaldt, M., et al., *The "no-touch" harvesting technique for vein grafts in coronary artery bypass surgery preserves an intact vasa vasorum.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **141**(1): p. 145-50.
  150. Loop, F.D., *Coronary artery surgery.* Ann Thorac Surg, 2005. **79**(6): p. S2221-7.
  151. Lehoux, S. and A. Tedgui, *Cellular mechanics and gene expression in blood vessels.* J Biomech, 2003. **36**(5): p. 631-43.
  152. Lemarie, C.A., P.L. Tharaux, and S. Lehoux, *Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling.* J Mol Cell Cardiol, 2010. **48**(3): p. 433-9.
  153. Alrawi, S.J., et al., *A comparative study of endothelial cell injury during open and endoscopic saphenectomy: an electron microscopic evaluation.* Heart Surg Forum, 2001. **4**(2): p. 120-7.
  154. Cameron, A.A., K.B. Davis, and W.J. Rogers, *Recurrence of angina after coronary artery bypass surgery: predictors and prognosis (CASS Registry). Coronary Artery Surgery Study.* J Am Coll Cardiol, 1995. **26**(4): p. 895-9.
  155. Sur, S., J.T. Sugimoto, and D.K. Agrawal, *Coronary artery bypass graft: why is the saphenous vein prone to intimal hyperplasia?* Can J Physiol Pharmacol, 2014. **92**(7): p. 531-45.
  156. Bryan, A.J. and G.D. Angelini, *The biology of saphenous vein graft occlusion: etiology and strategies for prevention.* Curr Opin Cardiol, 1994. **9**(6): p. 641-9.
  157. Walts, A.E., M.C. Fishbein, and J.M. Matloff, *Thrombosed, ruptured atheromatous plaques in saphenous vein coronary artery bypass grafts: ten years' experience.* Am Heart J, 1987. **114**(4 Pt 1): p. 718-23.
  158. Crook, M.F., K.M. Southgate, and A.C. Newby, *Both ICAM-1- and VCAM-1-integrin interactions are important in mediating monocyte adhesion to human saphenous vein.* J Vasc Res, 2002. **39**(3): p. 221-9.
  159. Adcock, G.D., et al., *Arterialization of reversed autogenous vein grafts: quantitative light and electron microscopy of canine jugular vein grafts harvested and implanted by standard or improved techniques.* J Vasc Surg, 1987. **6**(3): p. 283-95.
  160. Amano, J., et al., *Cytokinetic study of aortocoronary bypass vein grafts in place for less than six months.* Am J Cardiol, 1991. **67**(15): p. 1234-6.
  161. Kockx, M.M., et al., *The modulation of smooth muscle cell phenotype is an early event in human aorto-coronary saphenous vein grafts.* Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1992. **420**(2): p. 155-62.
  162. Hoch, J.R., et al., *Vein graft intimal hyperplasia: leukocytes and cytokine gene expression.* Surgery, 1994. **116**(2): p. 463-70; discussion 470-1.

163. Cherian, S.M., et al., *Involvement of dendritic cells in long-term aortocoronary saphenous vein bypass graft failure*. Cardiovasc Surg, 1999. **7**(5): p. 508-18.
164. Kalan, J.M. and W.C. Roberts, *Morphologic findings in saphenous veins used as coronary arterial bypass conduits for longer than 1 year: necropsy analysis of 53 patients, 123 saphenous veins, and 1865 five-millimeter segments of veins*. Am Heart J, 1990. **119**(5): p. 1164-84.
165. Lie, J.T., G.M. Lawrie, and G.C. Morris, Jr., *Aortocoronary bypass saphenous vein graft atherosclerosis. Anatomic study of 99 vein grafts from normal and hyperlipoproteinemic patients up to 75 months postoperatively*. Am J Cardiol, 1977. **40**(6): p. 906-14.
166. Bourassa, M.G., *Fate of venous grafts: the past, the present and the future*. J Am Coll Cardiol, 1991. **17**(5): p. 1081-3.
167. Verrier, E.D. and E.M. Boyle, Jr., *Endothelial cell injury in cardiovascular surgery*. Ann Thorac Surg, 1996. **62**(3): p. 915-22.
168. Boyle, E.M., Jr., et al., *Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: atherosclerosis*. Ann Thorac Surg, 1997. **63**(3): p. 885-94.
169. Ratliff, N.B. and J.L. Myles, *Rapidly progressive atherosclerosis in aortocoronary saphenous vein grafts. Possible immune-mediated disease*. Arch Pathol Lab Med, 1989. **113**(7): p. 772-6.
170. Neitzel, G.F., et al., *Atherosclerosis in aortocoronary bypass grafts. Morphologic study and risk factor analysis 6 to 12 years after surgery*. Arteriosclerosis, 1986. **6**(6): p. 594-600.
171. Motwani, J.G. and E.J. Topol, *Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention*. Circulation, 1998. **97**(9): p. 916-31.
172. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
173. Paramashivappa, R., et al., *Synthesis of sildenafil analogues from anacardic acid and their phosphodiesterase-5 inhibition*. J Agric Food Chem, 2002. **50**(26): p. 7709-13.
174. Zhong, X., et al., *Omentin inhibits TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in endothelial cells via ERK/NF-kappaB pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **425**(2): p. 401-6.
175. Harskamp, R.E., et al., *Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: pathophysiology, management, and future directions*. Ann Surg, 2013. **257**(5): p. 824-33.
176. Parang, P. and R. Arora, *Coronary vein graft disease: pathogenesis and prevention*. Can J Cardiol, 2009. **25**(2): p. e57-62.
177. Huang, H., et al., *Anacardic acid induces cell apoptosis associated with induction of ATF4-dependent endoplasmic reticulum stress*. Toxicol Lett, 2014. **228**(3): p. 170-8.
178. Joddar, B., et al., *Protandim attenuates intimal hyperplasia in human saphenous veins cultured ex vivo via a catalase-dependent pathway*. Free Radic Biol Med, 2011. **50**(6): p. 700-9.
179. Kumar, A., S. Dhawan, and B.B. Aggarwal, *Emodin (3-methyl-1,6,8-trihydroxyanthraquinone) inhibits TNF-induced NF-kappaB activation, IkappaB degradation, and expression of cell surface adhesion proteins in human vascular endothelial cells*. Oncogene, 1998. **17**(7): p. 913-8.

180. Chello, M., et al., *Pressure distension stimulates the expression of endothelial adhesion molecules in the human saphenous vein graft*. *Ann Thorac Surg*, 2003. **76**(2): p. 453-8; discussion 458.
181. Chester, A.H., K.J. Morrison, and M.H. Yacoub, *Expression of vascular adhesion molecules in saphenous vein coronary bypass grafts*. *Ann Thorac Surg*, 1998. **65**(6): p. 1685-9.
182. Zhang, W., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor-2 mediated NFkappaB activation contributes to tumor necrosis factor-alpha induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in endothelial cells*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2013. **106**: p. 62-71.
183. de Winther, M.P., et al., *Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(5): p. 904-14.
184. Mackesy, D.Z. and M.L. Goalstone, *Insulin augments tumor necrosis factor-alpha stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 in vascular endothelial cells*. *J Inflamm (Lond)*, 2011. **8**: p. 34.
185. Valen, G., Z.Q. Yan, and G.K. Hansson, *Nuclear factor kappa-B and the heart*. *J Am Coll Cardiol*, 2001. **38**(2): p. 307-14.
186. Ludwig, A., et al., *The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **316**(3): p. 659-65.
187. Zapolska-Downar, D., et al., *Butyrate inhibits cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in cultured endothelial cells: the role of NF-kappaB and PPARalpha*. *J Nutr Biochem*, 2004. **15**(4): p. 220-8.
188. Chen, C.X., et al., *Effect of propane-2-sulfonic acid octadec-9-enyl-amide on the expression of adhesion molecules in human umbilical vein endothelial cells*. *Eur J Pharmacol*, 2015. **756**: p. 15-21.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Burak	<b>Soyadı</b>	Önal
<b>Doğ.Yeri</b>	Malatya	<b>Doğ.Tar.</b>	03.10.1984
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	
<b>Email</b>	burak.onal@istanbul.edu.tr	<b>Tel</b>	0212 414 3000 - 21506

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi – Tıbbi Farmakoloji AD	2015
<b>Yük.Lis.</b>	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi – Tıbbi Biyoloji AD	2010
<b>Lisans</b>	Haliç Üniversitesi	2007
<b>Lise</b>	Malatya Lisesi	2000

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	İstanbul Üniversitesi Klinik Araştırmalar Mükemmeliyet Merkezi CTF İdari Sorumlusu	İstanbul Üniversitesi	2014 - Halen
2.	Öğretim Görevlisi	Bilgi Üniversitesi	2014 - Halen
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	İyi	Orta	58	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>			
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

## Yayımları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Dursun, E., et al., *The interleukin 1 alpha, interleukin 1 beta, interleukin 6 and alpha-2- macroglobulin serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease, mild cognitive impairment or Parkinson's disease.* Journal of neuroimmunology, 2015. **283**: p. 50- 57.
2. Demir, B., et al., *Does Inflammation Have a Role in the Pathogenesis of Cardiac Syndrome X? A Genetic-Based Clinical Study With Assessment of Multiple Cytokine Levels.* Angiology, 2015: p. 0003319715590057.
3. Shahzadi, A., et al., *Cardiac Troponin-I (cTnI) a Biomarker of Cardiac Injuries Induced by Doxorubicin Alone and in Combination with Ciprofloxacin, Following Acute and Chronic Dose Protocol in Sprague Dawley Rats.* International Journal of Pharmacology, 2014. **10**(5): p. 258-266.
4. Shahzadi, A., et al., *Chronic Dose Protocol in Sprague Dawley Rats.* International Journal of Pharmacology, 2014. **10**(5): p. 258-266.
5. Korucu, E., et al., *Serum Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) and D-Vitamin Levels in Patients With Sarcoidosis and Tuberculosis.* Chest, 2014. **146**(4\_MeetingAbstracts): p. 363A-363A.
6. Gezen-Ak, D., et al., *BDNF, TNFalpha, HSP90, CFH, and IL-10 serum levels in patients with early or late onset Alzheimer's disease or mild cognitive impairment.* J Alzheimers Dis, 2013. **37**(1): p. 185-195.
7. Alaylioglu, M., et al., *Serum TNF alpha levels elevated in early and late-onset Alzheimer's disease but not in mild cognitive impairment.* Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association, 2013. **9**(4): p. P239-P240.
8. Ozyazgan, S., et al., *Lectin-like oxidised LDL receptor-1 as a marker of endothelial dysfunction in Behcet's disease.* Clinical and experimental rheumatology, 2012. **31**(3 Suppl 77): p. 71-76.
9. Ozyazgan, S., et al., *Relation of protein oxidation parameters and disease activity in patients with Behcet's disease.* Clinical laboratory, 2012. **59**(7-8): p. 819-825.
10. Demir, B., et al., *The relationship between ischemia modified albumin and oxidative stress parameters in patients with cardiac syndrome X.* Clinical laboratory, 2012. **59**(11-12): p. 1319- 1329.
11. Korucu, E., et al., *Cathelicidin as a link between sarcoidosis and tuberculosis.* Sarcoidosis vasculitis and diffuse lung disease, 2015. **32**(3): p. 222-227.