



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA İLE İNDÜKLENEN İNSAN
UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRELERİNDE PROFİLAKTİK
VE TERAPÖTİK OLARAK UYGULANAN BETULİNİK ASİTİN
ANTIATEROJENİK VE ANTİENFLAMATUVAR ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Hatice YEN
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet BERKÖZ

VAN-2024

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜMÖR NEKROZ FAKTÖR ALFA İLE İNDÜKLENEN İNSAN
UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRELERİNDE PROFİLAKTİK
VE TERAPÖTİK OLARAK UYGULANAN BETULİNİK ASİTİN
ANTIATEROJENİK VE ANTİENFLAMATUVAR ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Hatice YEN
TEMEL ECZACILIK BİLİMLERİ ANABİLİM DALI
(ECZACILIK PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehmet BERKÖZ

VAN-2024

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TYL-2023-10827 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanması ve yürütülmesi süresince yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Mehmet BERKÖZ'e teşekkür ederim. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Yavuz YARDIM'a, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekan Yardımcısı ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülhan BORA'ya, Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. Abdulahad DOĞAN'a, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Dr. Öğr. Üyesi Gülsüm YILDIZ'a, Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Oruç YUNUSOĞLU'na, tez çalışmamın proje olarak desteklenmesini sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne, yüksek lisans tez çalışmam süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarıma, tez çalışmam süresince yanımda olan yol arkadaşım eşime, çocuklarıma, anne ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

Hatice YEN

ÖZET

YEN H, Tümör Nekroz Faktör Alfa ile İndüklenen İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücrelerinde Profilaktik ve Terapötik Olarak Uygulanan Betulinik Asitin Antiaterojenik ve Antienflamatuvar Etkinliğinin İncelenmesi, Temel Eczacılık Anabilim Dalı, Biyokimya Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2024. Endotel hasarı sonrasında görülen lokal enflamasyon, aterosklerozun başlangıcıdır ve sadece başlangıçta değil, hastalığın her aşamasında enflamasyon önemli bir role sahiptir. Endotel hücrelerinin aktive olmasının ardından sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri salgılanmaya başlamaktadır. Çeşitli fitokimyasallar ile monosit adezyonunu ve hücre hasarını azaltmak üzerine yapılan çalışmalarda; hücre içi adhezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) gibi moleküllerin düzeylerinde azalma olabileceği gösterilmiştir. İnsan umbilikal ven endotelial hücrelerini (HUVEC) TNF- α ile indüklemek iyi bir koroner arter hastalığı modeli oluşturmaktadır. Bu çalışmada tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ile indüklenip enflamasyon ve ateroskleroz modeli oluşturulan HUVEC hücre hattında, yüksek antienflamatuvar etkiye sahip olan betulinik asitin, antienflamatuvar ve anti-aterosklerotik etkinliğinin biyokimyasal düzeyde araştırılması ve hedeflenmektedir. HUVEC hücre hattı TNF- α ile indüklenip enflamasyon ve ateroskleroz modeli oluşturulan insan umbilikal ven endotelial hücre kültüründe, 10 ng/mL dozunda TNF- α uygulamasının 6 saat öncesinde, 10 ng/mL TNF- α uygulaması ile eş zamanlı ve 10 ng/mL TNF- α uygulamasından 6 saat sonra olmak üzere her gruba betulinik asitin LD₅₀ konsantrasyonu uygulanmıştır. Toplamda 24 saat inkübasyondan sonra endotel hücrelerindeki nitrik oksit, TNF- α , interlökin 1-beta (IL-1 β), IL-10, ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B düzeyleri ELISAmetrik olarak ölçülmüştür. Analizler SPSS for Windows v22.0 paket programında yapılmıştır. TNF- α uygulanan grupta, nitrik oksit, TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B düzeyleri artmıştır ($p<0.05$). TNF- α uygulanan gruba kıyasla, betulinik asit uygulanan her üç grupta da bu parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi ($p<0.05$). IL-10 düzeyi ise TNF- α uygulanmasıyla değişiklik göstermemiş ($p>0.05$) ancak TNF- α ile birlikte betulinik asit uygulanmasıyla artış göstermiştir ($p<0.05$). TNF- α uygulamasının HUVEC hücrelerinde enflamatuvar parametrelerinin seviyelerini arttırması, endotel hasarı modelinin oluştuğunu göstermektedir. TNF- α ile birlikte betulinik asit uygulanmasının enflamatuvar parametrelerinin seviyelerini azaltması betulinik asitin, enflamasyon ve endotel hasarı gelişimi üzerine terapötik ve profilaktik etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Endotel disfonksiyonu, Tümör nekroz faktör alfa, Betulinik asit, Antiaterosklerotik aktivite, Antienflamatuvar aktivite

ABSTRACT

YEN H, Investigation of Antiatherogenic and Antiinflammatory Activity of Betulinic Acid Applied Prophylactically and Therapeutically in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Induced by Tumour Necrosis Factor Alpha, Department of Basic Pharmacy, Division of Biochemistry, Master's Thesis, Van, 2024. Local inflammation after endothelial damage is the beginning of atherosclerosis and inflammation has an important role not only at the beginning but at every stage of the disease. After activation of the endothelial cell, cytokines, chemokines and adhesion molecules are secreted. In studies conducted to reduce monocyte adhesion and cell damage with various phytochemicals, it has been shown that the levels of molecules such as intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and nuclear factor kappa B (NF- κ B) may decrease. Induction of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) with TNF- α constitutes a good model of coronary artery disease. In this study, we aimed to investigate the anti-inflammatory and anti-atherosclerotic activity of betulinic acid, which has a high anti-inflammatory effect, at the biochemical level in the HUVEC cell line induced with tumour necrosis factor-alpha (TNF- α) and created inflammation and atherosclerosis model. In human umbilical vein endothelial cell culture in which HUVEC cell line was induced with TNF- α and inflammation and atherosclerosis model was created, LD₅₀ concentration of betulinic acid was administered to each group 6 hours before, simultaneously with and 6 hours after 10 ng/mL TNF- α administration. Nitric oxide, TNF- α , interleukin 1-beta (IL-1 β), IL-10, ICAM-1, VCAM-1 and NF- κ B levels in endothelial cells were measured ELISAmetrically after 24 hours' incubation. Analyses were performed using SPSS for Windows v22.0 package programme. Nitric oxide, TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, VCAM-1 and NF- κ B levels increased in the TNF- α treated group ($p < 0.05$). A statistically significant decrease in these parameters was observed in all three groups treated with betulinic acid compared to the TNF- α -treated group ($p < 0.05$). IL-10 level did not change with TNF- α treatment ($p > 0.05$) but increased with TNF- α and betulinic acid treatment ($p < 0.05$). TNF- α administration increased the levels of inflammatory parameters in HUVEC cells, indicating that an endothelial damage model was formed. The decrease in the levels of inflammatory parameters with TNF- α and betulinic acid administration suggests that betulinic acid may have therapeutic and prophylactic effects on inflammation and endothelial damage development.

Key Words: Endothelial dysfunction, Tumor necrosis factor alpha, Betulinic acid, Antiatherosclerotic activity, Anti-inflammatory activity

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
TABLolar LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Endotel	4
2.1.1. Endotelin yapısı	4
2.1.2. Endotelin fonksiyonları	4
2.1.3. Endotel disfonksiyonu	5
2.1.4. Endotel hasarı ile ilişkili durumlar	6
2.1.5. Endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz	8
2.2. Ateroskleroz	9
2.2.1. Aterosklerozun tanımı	9
2.2.2. Aterosklerozun patogenezi	9
2.2.3. Aterosklerotik lezyonların gelişimi	12
2.2.4. Aterosklerozun komplikasyonları	13
2.2.5. İnflamasyon süreçleri ve ateroskleroz	14
2.2.6. Ateroskleroz patogenezinde inflamasyon tetikleyicileri	19
2.2.7. Ateroskleroz ve inflamatuvar süreçte etkili medyatörler	20
2.3. Oksidatif Stres	20
2.3.1. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri	21
2.3.2. Aterosklerozda endojen ROS/RNS oluşturan sistemler	22
2.3.3. Antioksidanlar ve oksidatif hasarın önlenmesi	23
2.4. Betulinik Asit	23

2.5. Çalışmanın Amacı	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Gereç	25
3.1.1. Hücre hattı	25
3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar	25
3.1.3. Kullanılan cihazlar	26
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Hücre kültürü ortamı	26
3.2.2. Dondurulmuş hücrelerin çözündürülmesi	27
3.2.3. Hücrelerin ekilmesi	27
3.2.4. Alt kültürleme (Pasajlama)	28
3.2.5. HUVEC hücrelerinin sayılması ve canlılık testi	29
3.2.6. HUVEC hücrelerinin dondurulması ve saklanması	30
3.2.7. MTT deney protokolü	31
3.2.8. Stok ve çalışma çözeltilerinin hazırlanması	31
3.2.9. Enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA) çalışmaları	33
3.3. İstatistik Analiz	34
4. BULGULAR	35
4.1. Betulinik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi	35
4.2. Betulinik Asit Uygulamasının Nitrik Oksit Düzeyine Etkisi	36
4.3. Betulinik Asit Uygulamasının TNF- α Düzeyine Etkisi	37
4.4. Betulinik Asit Uygulamasının IL-1 β Düzeyine Etkisi	38
4.5. Betulinik Asit Uygulamasının IL-10 Düzeyine Etkisi	39
4.6. Betulinik Asit Uygulamasının VCAM-1 Düzeyine Etkisi	40
4.7. Betulinik Asit Uygulamasının ICAM-1 Düzeyine Etkisi	41
4.8. Betulinik Asit Uygulamasının NF- κ B Düzeyine Etkisi	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	43
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	56
EKLER	57
EK 1. Çalışma Onay Belgesi	57
EK 2. Tez Orijinallik Raporu	58

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	: Adenozin difosfat
ALA	: Alfa lipoik asit
apo-E	: Apolipoprotein E
ATII	: Anjiyotensin II
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDFR	: Endotel kaynaklı hiperpolarize faktör
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
eNOS	: Endotelyal nitrik oksit sentaz
ESM	: Ekstrasellüler matriks
FBS	: Fetal bovine serum
GM-CSF	: Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GSH-Rx	: Glutasyon redüktaz
GST	: Glutatron-S-transferaz
HO-1	: Hem oksijenaz-1
HRP	: Horseradish peroksidaz
ICAM-1	: Hücre içi adhezyon molekülü-1
IFN-γ	: Interferon- γ
IL-1β	: Interlökin 1-beta
IκBα	: İnhibitör kappa B alfa
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LPO	: Lipoksijenaz
LPS	: Lipopolisakkarit
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1
M-CSF	: Makrofaj koloni uyarıcı faktör
MI	: Miyokard infarktüsü
MMP	: Matriks metalloproteinazlar
MPO	: Miyeloperoksidaz
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NADPH	: Nikotianamid adenin dinükleotid fosfat
NF-κB	: Nükleer faktör kappa B
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NOX	: NAD(P)H oksidaz
NO_x	: Nitrik oksit
oxLDL	: Okside düşük dansiteli lipoproteini
PAH	: Periferik arter hastalığı
PBS	: Phosphate buffered saline
PDGF	: Platelet kökenli büyüme faktörü
PGI₂	: Prostaglandin I ₂
PON	: Paraoksonaz
Prx	: Peroksiredoksinler
PVDF	: Polivinilidin florür
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SDS-PAGE	: Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamit jel elektroforezi
SOD	: Süperoksit dismutaz
SR-A	: Scavenger reseptör A
SVH	: Serebrovasküler hastalık
TBST	: Tween 20 içeren Tris tamponlu salin
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktör beta
TIMP	: Doku inhibitörleri
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
t-PA	: Doku plazminojen aktivatörü
TXA₂	: Tromboksan A ₂
VCAM-1	: Vasküler hücre adhezyon molekülü-1
VDKH	: Vasküler düz kas hücreleri
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
WBC	: Lökosit
XO	: Ksantin oksidaz

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Betulinik asitin kimyasal yapısı	24
Şekil 2. Neubauer lamının sayım alanı	29
Şekil 3. Betulinik asit uygulamasının hücre canlılık oranlarına etkileri	35
Şekil 4. Betulinik asit uygulamasının nitrik oksit düzeylerine etkisi	36
Şekil 5. Betulinik asit uygulamasının TNF- α düzeylerine etkisi	37
Şekil 6. Betulinik asit uygulamasının IL-1 β düzeylerine etkisi	38
Şekil 7. Betulinik asit uygulamasının IL-10 düzeylerine etkisi	39
Şekil 8. Betulinik asit uygulamasının VCAM-1 düzeylerine etkisi	40
Şekil 9. Betulinik asit uygulamasının ICAM-1 düzeylerine etkisi	41
Şekil 10. Betulinik asit uygulamasının NF- κ B düzeylerine etkisi	42

TABLÖLAR LİSTESİ



1. GİRİŞ

Endotel hücreleri bariyer olmanın yanı sıra kan dolaşımındaki değişken uyarılara yanıt veren dinamik bir yapıdır. Birçok hastalığın patogeneğinde rol alır. Endotel hücreleri aktive olarak koruyucu genlerin oluşumunu başlatır, doku tamiri ve savunma yapar (Matthay, 2001). Endotel disfonksiyonu, başlıca vazodilatör olan NOx biyoyaralanımında azalma ve endotel bağımlı vazodilatasyonda bozulmanın yanı sıra kasılma faktörlerinin artmasıyla seyreder. Endotel hücrelerinin aktivasyonu ve endotel disfonksiyonu koagülasyon ve inflamasyon için öncü rol alır (Bonetti ve ark., 2003). Endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulması aterosklerotik risk faktörlerinin ilk patofizyolojik etkilerinden biri gibi durmaktadır (Sukhovshin ve ark., 2015).

Ateroskleroz koroner arter hastalığı başta olmak üzere serebrovasküler hastalık (SVH), periferik arter hastalığı (PAH), miyokard infarktüsü (MI) gibi mortalite ve morbiditenin yüksek olduğu hastalıklardan sorumludur. Kronik, ilerleyici ve inflamatuvar bir sürece sahiptir (Taleb, 2016). Belirli risk faktörlerinin neden olduğu endotel hasarı sonucu endotel bağımlı vazodilatasyon azalır. Endotelde gerçekleşen vazokonstriksiyon, sitokin üretiminde artış, inflamatuvar hücrelerin endotelde toplanması ve düz kas hücrelerinin o bölgeye göç etmesi gibi olaylar silsilesi aterosklerotik plak oluşumuna neden olur. Endotel disfonksiyonu aterosklerotik plak oluşturarak aterosklerozda ilk basamağı oluşturmaktadır. Aterosklerotik plağın damar içinde genişlemesi ve yırtılması, sonrasındaki trombojenik olayların başlamasında da endotel disfonksiyonunun rolü vardır (Esper ve ark., 2006).

Bu süreçte endotelden çok çeşitli maddeler salınmaktadır. Bunlar arasında büyüme faktörleri, sitokinler, adezyon molekülleri, trombotik faktörler ve kemotaktik faktörler yer almaktadır (Harańczyk ve ark., 2022). Sağlam bir endotelde, kan akışı sağlanması için asetilkolin tarafından nitrik oksit (NOx) salınımı başlar ve vazodilatasyon olur. Hasarlı endotelde ise asetilkolin düz kas hücrelerini uyararak vazokonstriksiyona neden olur. Buna paradoks vazokonstriksiyon denir. Kardiyovasküler risk faktörlerini taşıyan ya da ateroskerozu olan kişilerde vazodilatasyon mekanizmasında asetilkoline yanıt azalmış ya da tamamen yok olmuştur (Wang ve ark., 2022).

Ateroskleroz kardiyovasküler hastalıkların başlıca sorumlusudur (Puddu ve ark., 2000). Aterogenezin histolojisi, patofizyolojisi, hipotezleri konusunda yıllardır

araştırmalar yapılmaktadır. İlk olarak Alman bilim insanı Rudolph Virchow, 1856 yılında aterogeneze arter duvarındaki inflamatuvar bir süreçten bahsetmiştir (Boulanger, 1999). Çeşitli düşünceler olmasına rağmen şuan en kabul gören hasara cevap hipotezidir (Zhou ve ark., 2010). Ateroskleroz damar duvarında lipid birikmesiyle oluşan kronik, proliferatif ve inflamatuvar bir hastalıktır. Koroner arter gibi küçük çaptaki damarlarda oluşabildiği gibi aorta gibi geniş çaplı damarları da etkileyebilir (Chandramohan ve ark., 2008). Koroner arterlerde olursa akut koroner sendroma, angina pektoris neden olabilirken, beyin damarlarında olursa geçici serebral iskemik atak ya da felce neden olabilir. Abdominal aortada anevrizmaya neden olabilirken, periferik arterleri etkilediğinde ülserasyon ya da gangren ile sonuçlanabilir (Puddu ve ark., 2000).

Biyolojik sistemlerdeki aerobik metabolizma bazal koşullarda bile prooksidanlar olarak bilinen reaktif oksijen türleri (ROS)'u oluşturur. DNA, lipidler, proteinler gibi moleküllerin prooksidan hasarlara direnebilmesi için endojen ve eksojen antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Vücutta aşırı miktarda prooksidan molekül birikimi meydana gelirse oksidatif hasar oluşur ve bu durum kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalığın temelini oluşturur. Antioksidanlar organizmadaki bu ROS temizleyerek ya da ROS oluşumuna engel olarak etki gösterirler. Eksojen kaynaklı antioksidanların çoğu yaygın olarak yediğimiz gıdalarda bulunurlar.

Doğal ürünler binlerce yıldır insan hastalıklarının tedavisinde kullanılmış olup, yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesinde önemli yere sahiptir. Günümüzde kullanılmakta olan çoğu antioksidan ve antiaterojenik ilaç, doğal ürünler sayesinde keşfedilmiştir. Doğal ürünler, yüksek verim ve düşük toksisite gibi önemli avantajlara sahiptir. Terapötik ilaçların toksik ve yan etkilerinin azaltarak hastaların yaşam kalitesini arttırmak amacıyla, düşük toksisiteye ve yüksek verime sahip ilaçlarının geliştirilmesi bilim insanlarının hedeflerinden biridir.

Betulin (lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol) lupan tip bir bileşik olup 200'e yakın farklı bitkiden izole edilebilmiştir. Ancak betulin bakımından en zengin bitki türünün huş ağacı (*Betula sp.*) türleri olduğu bulunmuştur. Betulin türevlerinden olan betulinik asit (3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid), betulinin oksidize formudur. Betulinik asit, antienflamatuvar, antibakteriyel, antiviral, antidiyabetik, antimalaryal, anti-HIV ve antitümör özellikler gibi biyolojik ve farmakolojik etkileri nedeniyle bilim insanlarının

dikkatini çekmiştir.

Betulinik asitin anti-enflamatuvar etkisi çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak betulinik asitin damar endoteli üzerine olan etkisini dolayısıyla da endotelial disfonksiyona etkisini araştıran çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Dolayısıyla betulinik asitin anti-aterojenik etkisi ve bu etkinin altında yatan mekanizmalar da tam olarak anlaşılamamıştır. Aterosklerozun önlenmesi ve tedavisi için nutrasötik bazlı yaklaşımların geliştirilmesi için betulinik asitin etkisinin daha iyi karakterize edilmesi gerekmektedir. Yaptığımız bu çalışmada tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ile indüklenerek endotel disfonksiyon modeli oluşturulmuş insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde (HUVEC hücre hattı), betulinik asitin tedavisinin tedavisinin NO_x, TNF- α , interlökin 1-beta (IL-1 β), IL-10, hücre içi adhezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adhezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve nükleer faktör kappa B (NF- κ B) düzeylerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışma TNF- α ile indüklenerek endotel disfonksiyon modeli oluşturulan HUVEC hücreleri üzerinde betulinik asit uygulamasının terapötik/profilaktik etkisini ortaya koymayı hedefleyen ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endotel

2.1.1. Endotelin yapısı

Endotel, damar duvarının iç yüzünü kaplamakta olup tek katlı yassı epitele sahip hücrelerden oluşur (Sarma ve Ward, 2011). Endotel hücreleri damar düz kası ile kan arasında bulunup çok miktarda reseptör içermektedir. Glikoproteinler ve glikozaminoglikanlar endotelin yüzeyinde bulunur ve negatif yük oluşturur (Bockus ve Kim, 2022). Endotel hücrelerinin başlıca fonksiyonları; damar tonusun düzenlenmesi, damar içi pıhtılaşmayı önlemek için trombosit kümelenmesini ve koagülasyonun aktivasyonunu baskılanması ve fibrinolizisi düzenlenmesi, kan ve dokular arasında madde geçişinin sağlanması ve kan hücrelerinin düzenlenmesi ile inflamasyona yanıtın oluşturulmasıdır (Bombelli ve ark., 1997).

2.1.2. Endotelin fonksiyonları

Bariyer görevi: Endotelin damar geçirgenliği bulunduğu damar tipine ve konuma göre değişkendir. Bazı maddeler ortamdaki yoğunluklarına göre geçebilirken bazı maddeler için endotel seçici davranır. Bu yarı seçici geçirgenlik damar içi ve damar dışı sıvı dengesini sağlamada önemli rol alır. Bu maddeler hormonlar, antikorlar, sitokinler gibi makromoleküllerdir. Endotel geçirgenliği bazı durumlarda artabilir. Örneğin inflamasyonda lökosit (WBC)'lerin endotele yapışması ve sonrasında endotel hasarına sebep olan oksidanların oluşması geçirgenliği artırır (Gimbrone ve García-Cardeña, 2016).

Vasküler tonusun düzenlenmesi: Endotelin önemli fonksiyonlarından biri olan vasküler tonusun ayarlanması, endotelden salınan vazokonstriktör ve vazodilatör maddelerin dengesi ile sağlanmaktadır. Prostoglandin I_2 (PGI_2), NO_x ve endotel kaynaklı hiperpolarize faktör (EDFR) vazodilatör maddeler iken, tromboksan A_2 (TXA_2), angiotensin, endotelin ve süperoksid radikalleri vazokonstriktör maddelerdir. Endotel dilatasyonundan sorumlu olan en önemli madde NO_x 'tir (Gimbrone ve García-Cardeña, 2013). NO_x ve PGI_2 vazodilatör görevleri dışında trombosit kümelenmesinde de rol oynar. İnflamasyonda oluşan süperoksid radikalleri PGI_2 aktivitesini baskılar, NO_x

yoğunluğunu azaltır (Katusic, 1996).

Pıhtılaşmayı düzenlemesi: Endotel kanın pıhtılaşmasında önemli role sahiptir. Sağlam bir endotel tabakası pıhtılaşmayı önleyici şekilde rol oynar. Ancak hasarlanmış endotel, kanı pıhtılaşmaya yatkın hale getirir. Endotelden salınan NO_x, prostosiklin ve PGI₂ trombosit kümelenmesini engeller. NO_x ve prostosiklin trombositlerin aktive olup kümelenmesini engeller, aynı zamanda düz kas hücrelerini gevşetir (Bombelli ve ark., 1997). Doku plazminojen aktivatörü (t-PA) başlıca endotel tabakasında üretilir ve fibrinolitik aktivitelerden sorumludur (Wu ve Thiagarajan, 1996). Koagülasyonun düzenlenmesinde farklı mekanizmalarla etkilidir. Endotel hücresi ve karaciğerde üretilen doku faktör inhibitörü ile faktör VIIIa- faktör Xa -doku faktörü kompleksi baskılanır. Protein S endotelden salınır ve intrinsiktenaz ve protrombinaz kompleksini baskılar. Bir diğer mekanizma ise trombinin endotelden salınan trombomodilin ile baskılanmasıdır. Son olarak da heparan sülfat antitrombinle bağlanıp koagülasyon faktörlerini baskılar. Sağlıklı bir endotel tabakası kanın akıcılığının sağlanması, doku kanlanması devami için bu mekanizmaları kullanır. Ancak hasarlanmış endotel tabakasında, koagülasyon faktörlerinin baskılanması durur ve kan pıhtılaşmaya eğilimli olur. Bunun yanı sıra bozulmuş endotel altına trombositler kümelenir ve fibrinolitik aktivite de bozulur (Lijnen ve Collen, 1997).

2.1.3. Endotel disfonksiyonu

Endotel hücreleri önemli bir görev üstlenmiştir. Bariyer olmanın yanı sıra kan dolaşımındaki değişken uyarılara yanıt veren dinamik bir yapıdır. Birçok hastalığın patogeneğinde rol alır. Endotel hücreleri aktive olarak koruyucu genlerin oluşumunu başlatır, doku tamiri ve savunma yapar (Matthay, 2001). Endotel disfonksiyonu, başlıca vazodilatör olan NO_x biyoyaralanımında azalma ve endotel bağımlı vazodilatasyonda bozulmanın yanı sıra kasılma faktörlerinin artmasıyla seyreder. Endotel hücrelerinin aktivasyonu ve endotel disfonksiyonu koagülasyon ve inflamasyon için öncü rol alır (Bonetti ve ark., 2003). Endotel bağımlı vazodilatasyonun bozulması aterosklerotik risk faktörlerinin ilk patofizyolojik etkilerinden biri gibi durmaktadır (Sukhovshin ve ark., 2015).

Ateroskleroz, endotel disfonksiyonu ve inflamasyon ile seyreden kronik, ilerleyici bir hastalıktır (Ross, 1999). Endotel kaynaklı maddeler damarlarda kasılma-gevşeme

dengeyi kurarak vasküler hemostasisi sağlar. Bu denge sigara, hipertansiyon, hiperlipidemi ve diyabet gibi kardiyovasküler risk faktörleri ve inflamasyon ile bozulur. Bozulan denge ile damarlarda aterosklerotik plakların oluşması için ortam hazırlanmış olur. Aterosklerozun her basamağında inflamatuvar mediyatörlerin ve endotel hücrelerinin önemli bir yeri vardır (Behrendt ve Ganz, 2002).

Endotel disfonksiyonu patogenezi çok faktörlüdür ve oldukça geniş bir kavramdır. Patofizyolojisinde; ROS'nin artması ve beraberinde NOx sentazın aktivitesinin azalması yer alır (Münzel ve ark., 2008). Bir başka deyişle endotel kaynaklı kasılma ve gevşemeden sorumlu faktörlerin dengesizliği ve NOx sentezinde bozulma olarak ifade edilmektedir (Cornwell ve ark., 1994).

NOx, kan için önemli bir düzenleyicidir. En önemli görevi damarın genişlemesini sağlamaktır (Brovkovich ve ark., 1999). Bu etkisi dışında trombositlerin aktivasyonu ve kümelenmesi üzerindeki etkisiyle trombozise, WBC'in endotel tabakasına sızmasını engelleyerek inflamasyona ve vasküler hücrelerin çoğalmasını kontrol ederek damarsal zararlanmaya karşı da koruyucu rol üstlenir (Cornwell ve ark., 1994).

Endotel tabakasının yapısı genişlemeye yatkın ve kaygandır. Kardiyovasküler risk faktörleri olan sigara, hipertansiyon, hiperlipidemi, diyabet, obezite ve yaş, endotel yapısını bozmaktadır (Davignon ve Ganz, 2004). Endotelin çeşitli sebeplerle hasar görmesi sonucu NOx üretimindeki aksaklık ve işlevselliğinin azalması ateroskleroz için bir başlangıç basamağı olan endotel disfonksiyonunun mekanizmasını açıklamaktadır (Sitia ve ark., 2010).

2.1.4. Endotel hasarı ile ilişkili durumlar

Hipertansiyon: Hipertansiyon kardiyovasküler risk faktörlerinin en önemlilerinden biridir. Hipertansiyon kaynaklı endotel disfonksiyonu sonucu endotelin-1 üretimi artarken NOx salınımı azalmaktadır. Bu durum damarların kasılması için ortam hazırlar. Anjiyotensin 2 konsantrasyonu artarak bazı sitokinlerin hücre içine geçişini sağlar (Tomasoni ve ark., 2010). Hipertansiyonu olan hastada ROS, endotelden salınan NOx'in etkilerini ortadan kaldırır (Heitzer ve ark., 2001). Bozulmuş endotel tabakası çok miktarda süperoksit radikali üretir. Endotel disfonksiyonuyla başlayan süreç sadece hipertansiyondan sorumlu değildir. Aynı zamanda hipertansiyon sonucu oluşan organ hasarlarından da sorumludur. Süperoksit radikalleri, NOx'den nitrat (NO₃) oluşturur ve

NO_x seviyesi azalır. NO₃'ün nitroz asite dönüşmesiyle deoksidatif stres artar. Bunların sonucu önemli olaylara yol açmaktadır. Bu sonuçları oksidatif nitratlanma, lipid peroksidasyonu, sitotoksisite, enzim inaktivasyonu ve DNA hasarı olarak sayabiliriz (Brovkovich ve ark., 1999).

Hiperlipidemi: Endotel disfonksiyonuna zemin hazırlayan diğer faktör hiperlipidemidir. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), hiperlipideminin endotel üzerindeki etkilerinde başroldedir. LDL okside hale gelip hem serotonin hem NO_x üzerindeki etkileriyle endotel bağımlı vazodilatasyonu baskılar. Trombositlerin kümelenmesine ve trombin oluşumuna zemin hazırlar. Bununla beraber çöpçü hücreler okside LDL'yi hücre içine alarak köpük hücre oluşturur. Artmış LDL ile endotel hücrelerinde endotelin üretimi artarken endotelin reseptörlerinin sayısı azalır (Bockus ve Kim, 2022).

Hiperhomosisteinemi: Kanda yüksek homosistein seviyesi endotel hasarına yol açarak ateroskleroz gelişimine ve beraberinde tromboza ortam hazırlamaktadır (Bockus ve Kim, 2022).

Diabetes mellitus: Diabetes mellitus metabolik sendromun bir parçası olarak hiperlipidemi ve obezite ile birliktelik gösterir. Endotel hasarına hiperlipidemik etkisiyle neden olmaktadır. Hiperglisemik bir kanda antioksidan madde üretimi azalmaktadır. Bir başka taraftan hiperglisemide prostanoit maddelerin sentezinde artış gözlenirken, NO_x sentaz aktivitesi azalır (Bockus ve Kim, 2022). İnsulin de endotel üzerinde düzenleyici etkiye sahiptir ve diyabet hastalarında insülin seviyesinde azalmaya bağlı olarak endotel hasarına zemin hazırlanmış olur. Beraberinde hipergliseminin endotel üzerindeki olumsuz etkileri de eklenince endotel disfonksiyonu kaçınılmaz hale gelir (Heitzer ve ark., 2001). Diabetes mellitus, vasküler dengeyi bozarak vazokonstriktör madde salınımı artırır, kan hücrelerinin endotele kontrolsüz şekilde bağlanmasına yol açar son olarak da NO_x aktivitesini bozup endotel yanıtını engeller. Bu nedenle endotel disfonksiyonunda önemli bir faktördür (Dandona ve Aljada, 2004).

Obezite: Metabolik sendromun bir parçası olan obezite, hipertansiyon, hiperlipidemi ve diyabet ile birlikte endotel hasarına yol açar. Aynı zamanda pıhtılaşma faktörlerine etki eder ve vücudu tromboza yatkın hale getirir (Bockus ve Kim, 2022).

İleri yaş: Yaşa bağlı NO_x aktivitesi azalır, ROS artar ve böylece endotel bağımlı vazodilatasyon azalır. İleri yaş diğer risk faktörlerinden bağımsız bir şekilde

ateroskleroza zemin hazırlamaktadır (Bockus ve Kim, 2022).

Sigara: Sigaranın etkileri oldukça karmaşık olmasına rağmen kardiyovasküler risk faktörleri arasında önemli bir yere sahiptir. Sigaranın vücuttaki etkilerinin büyük bir kısmı inflamatuvar bir sürece bağlanmaktadır. Bu süreçte hemoreolojik ve hemostatik mekanizmalar yol alır (Puranik ve Celermajer, 2003). Sigaraya bağlı birçok damarda endotel bağımlı vazodilatasyonda azalma olduğu gösterilmiştir. Bozulmuş endotel bağımlı vazodilatasyon, ateroskleroz oluşumu için başlangıç basamağı gibi görülmektedir (Sukhovshin ve ark., 2015). Sigara içenler ve içmeyenler karşılaştırıldığında NOx seviyesinde belirgin fark gözlenmiştir (Szmitko ve ark., 2003). Sigara başlıca vazodilatör olan NOx'i etkiler. NOx azalmasıyla endotel bağımlı vazodilatasyon bozulur (Soleimani ve ark., 2022). Diğer yandan plazma vizkozitesini artırarak endotel hasarına katkıda bulunmaktadır (Alkan ve ark., 2014).

2.1.5. Endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz

Ateroskleroz koroner arter hastalığı başta olmak üzere SVH, PAH ve MI gibi mortalite ve morbiditenin yüksek olduğu hastalıklardan sorumludur. Kronik, ilerleyici ve inflamatuvar bir sürece sahiptir (Taleb, 2016).

Belirli risk faktörlerinin neden olduğu endotel hasarı sonucu endotel bağımlı vazodilatasyon azalır. Endotelde gerçekleşen vazokonstriksiyon, sitokin üretiminde artış, inflamatuvar hücrelerin endotelde toplanması ve düz kas hücrelerinin o bölgeye göç etmesi gibi olaylar silsilesi aterosklerotik plak oluşumuna neden olur. Endotel disfonksiyonu aterosklerotik plak oluşturarak aterosklerozda ilk basamağı oluşturmaktadır. Aterosklerotik plağın damar içinde genişlemesi ve yırtılması, sonrasındaki trombojenik olayların başlamasında da endotel disfonksiyonunun rolü vardır (Esper ve ark., 2006).

Bu süreçte endotelden çok çeşitli maddeler salınmaktadır. Bunlar arasında büyüme faktörleri, sitokinler, adezyon molekülleri, trombotik faktörler ve kemotaktik faktörler yer almaktadır (Harańczyk ve ark., 2022).

Sağlam bir endotelde, kan akışı sağlanması için asetilkolin tarafından NOx salınımı başlar ve vazodilatasyon olur. Hasarlı endotelde ise asetilkolin düz kas hücrelerini uyarak vazokonstriksiyona neden olur. Buna paradoks vazokonstriksiyon denir. Kardiyovasküler risk faktörlerini taşıyan ya da ateroskleroza olan kişilerde vazodilatasyon mekanizmasında asetilkoline yanıt azalmış ya da tamamen yok olmuştur

(Wang ve ark., 2022).

2.2. Ateroskleroz

2.2.1. Aterosklerozun tanımı

Ateroskleroz kardiyovasküler hastalıkların başlıca sorumlusudur (Puddu ve ark., 2000). Aterogenezin histolojisi, patofizyolojisi, hipotezleri konusunda yıllardır araştırmalar yapılmaktadır. İlk olarak Alman bilim insanı Rudolph Virchow, 1856 yılında aterogeneizde arter duvarındaki inflamatuvar bir süreçten bahsetmiştir (Boulanger, 1999). Çeşitli düşünceler olmasına rağmen şuan en kabul gören hasara cevap hipotezidir (Zhou ve ark., 2010). Ateroskleroz damar duvarında lipid birikmesiyle oluşan kronik, proliferatif ve inflamatuvar bir hastalıktır. Koroner arter gibi küçük çaptaki damarlarda oluşabildiği gibi aorta gibi geniş çaplı damarları da etkileyebilir (Chandramohan ve ark., 2008). Koroner arterlerde olursa akut koroner sendroma, angina pectorise neden olabilirken, beyin damarlarında olursa geçici serebral iskemik atak ya da felce neden olabilir. Abdominal aortada anevrizmaya neden olabilirken, periferik arterleri etkilediğinde ülserasyon ya da gangren ile sonuçlanabilir (Puddu ve ark., 2000).

2.2.2. Aterosklerozun patogenezi

Ross ve arkadaşlarının hipotezine göre, ateroskleroz başlangıcında görev alan mekanizma; vasküler hasarlanma sonrasında inflamatuvar cevap olarak aterosklerozun gelişmesidir. Herhangi bir sebeple oluşan doku harabiyetine karşı hücrel ve humoral yanıtları içeren olayların toplamıdır. İnflamatuvar sürecin meydana gelmesindeki amaç, oluşan doku harabiyetinin onarılmasını sağlamaktır. Ross ve arkadaşlarının hipotezine göre ateroskleroz, vasküler yatakta oluşan bir harabiyete cevaben meydana gelen olayların tümü olarak değerlendirilebilir (Ross ve Glomset, 1976).

Ateroskleroza karşı ortaya çıkan ilk protektif yanıt, endotel hücreleri tarafından verilir. Bu sebeple aterosklerozun meydana gelmesinde endotelial hasar ve yanıt çok önemli bir rol oynamaktadır (Lee ve ark., 2005). Endotelial hücreler vasküler lümenin iç kısmını döşeyen yassı ve tek sıralı hücrelerden oluşan ve normalde hücre elemanlarına karşı bariyer görevi gören, geçişe izin vermeyen bir yapıdadır. Kesintisiz ve düzenli bir yüzey alanı oluşturarak kan ve vasküler duvar arasında bariyer görevi görürler. Bu bariyerin otokrin, endokrin ve parakrin fonksiyonları bulunmakta olup aynı zamanda hemostaz aracılığıyla damarsal fonksiyonların düzenlenmesinde görev alır (Davignon ve

Ganz, 2004).

Ateroskleroz, genellikle arterlerin dallanıp çatallaşma yaptığı alanlarda laminer akım düşüşü sebebiyle oluşan progresif bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan insan ve hayvan deneylerinde, ateroskleroz gelişimi sürecini başlatan etkinin, apolipoprotein-B içeren lipoproteinlerin endotel altına girerek burada birikimi olduğu ortaya konmuştur (Williams ve Tabas, 1995).

Aterogenez esnasında vasküler yapılarda bazı değişiklikler meydana gelir, özellikle monosit ve makrofajlar bu değişikliklerin ortaya çıkmasında kilit bir görev alırlar. Endotel, monosit ve makrofajlarda yapılan hücre kültürü çalışmaları sayesinde, aterosklerozun patofizyolojisine dair çeşitli mekanizmalar keşfedilmiştir ve inflamatuvar süreçte endotelin de çok önemli bir rolünün olduğu gösterilmiştir. Endotelyal adezyon yapısı çok sıkı olup, en fazla albumin boyutundaki moleküllerin geçişine izin verir.

Lipoproteinler ise albuminden daha büyük moleküllerdir, bu sebeple yalnızca plazma vezikülleri aracılığı ile bu bariyeri geçebilirler. Endotel harabiyeti sonucu vasküler geçirgenlik artar ve LDL gibi moleküller endotelden rahatlıkla geçebilir. LDL modifikasyonları çoğunlukla bu sırada meydana gelir (Landmesser ve ark., 2004). İntimaya giren LDL molekülleri öncelikle endotel tarafından modifiye edilir ve okside LDL'ye dönüştürülür. Okside LDL, sitokinlerin ekspresyonunu indükleyip nitrik oksit salınımını inhibe ettiğinden endotelyal harabiyet oluşturur ve ateroskleroz sürecini hızlandırır. Nitrik oksit, L-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi sayesinde sentezlenir ve endoteli koruyan temel moleküllerden biridir. Özellikle antiagregan etkisiyle trombüs gelişimini önlerken, antiinflamatuvar özelliğiyle de ateroskleroz oluşumunu azaltmaktadır. Bu sayede adezyon moleküllerinin endotel yüzeyinden salınımı önlenirken, lipidlerin damar içerisinde birikimi ve düz kasların proliferasyonu da önlenmiş olur (Tsao ve ark, 1997).

NOx en potent vazodilatatördür. Sigara kullanımı, hipertansiyon öyküsü, dislipidemi, obezite ve diyabet gibi durumlar, endotel harabiyeti meydana getirir. Bu tarz durumların mevcudiyeti endotelyal NOx yıkımının artmasına ya da salınımının azalmasına sebep olur (Li ve Förstermann, 2000). Sağlıklı endotel yapısı vazodilatasyon ve vazokonstriksiyon dengesini muhafaza eder. Bu dengenin bozulması durumunda endotel proaterojenik ve proinflamatuvar hale gelerek endotel hasarı oluşur (Libby ve ark.,

2002). Bu durumda histamin, adrenalin, serotonin, adenosin difosfat (ADP) gibi moleküller salınarak damar geçirgenliğinin artmasına sebep olurlar. NOx salınımı ya da aktivasyonunun azalması durumunda ise yeterli vazodilatasyon gelişemez ve LDL okside olur (Steinberg ve ark., 1989).

Okside LDL'nin düz kas ve makrofaj hücreleri üzerinde de aktivatör özelliği bulunmaktadır. Okside LDL sebebiyle meydana gelen endotel hasarının pıhtılaşmayı tetiklediği ve proinflatuar sitokinlerin üretiminde artışa sebep olduğu ortaya konmuştur. Lökositlere etkili kemoatraktan ve adezyon moleküllerinin salınımında da bir artış meydana gelmektedir. LDL oksidasyonuna sebep olan bir diğer hücre grubu da makrofajlardır (Aviram ve ark., 1998). Unstabil aterom plaklarında makrofaj ve T hücrelerinin haricinde IL-6, TNF- α gibi proinflatuar sitokinler, VCAM-1 gibi adezyon molekülleri, kemokinler, de görev almaktadır (Jara ve ark., 2006).

Aterosklerozun erken döneminde oluşan lezyonlar tip I lezyonlar olarak tanımlanır. Bu yapılar, az miktarda yağ birikimi ve köpük hücreleri ile karakterizedir. İntima tabakasının kalınlaşmasına yaygın intimal kalınlaşma ismi verilir. Yaygın intimal kalınlaşmanın içeriğinde; düz kas hücreleri, elastin, proteoglikanlar ve makrofajlar bulunur. Yaygın kalınlaşma aort ve koroner damarlarda gelişebilir ve bu durum yaşa bağımlı değildir (Sary ve ark., 1992).

Tip I lezyonlarda makrofajların geçişinden önce hücrelerin dışında lipid biriktiği ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalarda aorta intimasında da lipid birikimlerinin olduğu gösterilmiştir (Guyton ve Klemp, 1993). Koroner arterler incelendiğinde CD68⁺ makrofajların lipid oranıyla ilişkili olarak artış gösterdiği ortaya konmuştur (Nakashima ve ark., 2002). Lipoproteinlerin de transsitozis vasıtasıyla endotel altı alana taşındığı gösterilmiştir. Ekstraselüler matriksteki çeşitli proteoglikanlar subendotelyal alanda lipoproteinlerin birikimini kolaylaştırır (Olin-Lewis ve ark., 2002). Subendotele geçen LDL, çeşitli proteinler ve proteoglikanlarla reaksiyon göstererek değişimler geçirir (Faggiotto ve ark., 1984). Bu olaylar sonucunda LDL'lerden inflamasyonu tetikleyen moleküller meydana gelir. Bu süreçte, oksidasyon, lipoliz ve proteoliz izlenir. Endotel, düz kas hücreleri, monosit ve makrofajlar, okside düşük dansiteli lipoproteini (oxLDL) tutabilirler (Morel ve ark., 1984).

Sağlıklı endotel hücreleri lökositlerle meydana gelen adezyona karşı oldukça

dayanıklıdır. Ancak kolesterol yüksekliği olduğunda; lökositler endotel adezyonu sonrasında transmigasyon vasıtasıyla intima tabakasına göç ederek burada yağ birikimi ve köpük hücre formasyonu oluşturur. T lenfositler de tıpkı monositler gibi aterom plaklarında toplanırlar. Endotel yüzeyinde sentezlenen bazı adezyon moleküllerinin salınımı; monosit ve T lenfositlerin endotel adezyonunu düzenler. Bahsi geçen adezyon molekülleri iki gruba ayrılır; ilk grup, bir immunglobulin olan VCAM-1'dir. Bu konuyla ilgili çalışmalar, aterom plaklarındaki hücre yüzeylerinde VCAM-1 salınımının gerçekleştiğini göstermiştir. Bir diğer lökosit adezyon molekülü de ICAM-1'dir. ICAM-1 endotel tarafından düşük seviyede eksprese olduğundan ve bazı lökositlere bağlandığından ateroskleroz için daha az seçicidir (Libby, 2001).

2.2.3. Aterosklerotik lezyonların gelişimi

Subendotelyal alanda sarı renkli ve yüzeyden kabarık yağlı çizgilenmelerle kendini gösteren makrofaj köpük hücreleri tip II lezyonları oluşturur. Bu lezyonlar T lenfositler, mast hücrelerinden ve düz kas hücrelerinden zengindir. Değiştirilmiş lipoproteinlerin reseptör aracılı endositozu, Scavenger Reseptörler sayesinde meydana gelir ve oxLDL nin hücre içine alınmasında CD36 ve scavenger reseptör A (SR-A) reseptörleri görev alır. Köpük hücreleri, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), IL-6 ve matriks metalloproteinazlar (MMP)'ın salınımında artışa sebep olur (Klouché ve ark., 2000).

Tip III lezyonlar minimal hücre dışı yağ depolar. Lipidler, ateroskleroz lezyonlarının en derin kısımlarında yerleşirler. Bu birikimler intima organizasyonunu hasara uğratarak ekstraselüler matriks alanının genişlemesine katkıda bulunur. Yağlı çizgilenmeler, fibrozise uğrayarak plaklar oluşturur ve sürecin ara basamağını oluştururlar. Tip II lezyonlarda, lipid yapıları tüm lezyon boyunca dağılırlar. Lipidler en çok intimanın kalınlaştığı bölgelerde bulunan düz kaslarda depolanır. Bu depolar, intraselüler proteoglikanlar ve düz kasların yerine geçer. Ekstraselüler lipid birikimi sonucu ise vasküler duvara makrofajların kapasitesini aşacak kadar fazla lipid birikimi oluşur ve sonucunda aşırı kolesterol birikimi sonrası sitotoksikite ve apoptozis gerçekleşir (Libby, 2001).

Tip IV lezyonlar, ileri lezyonlar olarak değerlendirilir, burada ekstraselüler yağ miktarı artarak bir kolesterol havuzu oluşturur. Histolojik özellik olarak, çok sayıda hücre

dışı lipid çekirdekleri gözlemlenir ve bunlar aterom olarak isimlendirilir. Bahsi geçen lipid çekirdekleri, tip II lezyonlarda gözlemlenen yağlanmaların birleşimi sonucu meydana gelir ve takip eden süreçte apoptozise giden aşırı doygun makrofajlar da bu lipid çekirdeklerin gelişimine katkı sağlar (Ball ve ark., 1995).

Tip V lezyonlarda, yoğunlukla bağ doku bulunur. Lipid çekirdekler fibrotik bir kapsül tarafından sarılırlar. Lezyonlar çok büyük yapıda olduklarından arteriyel duvarda remodeling süreci gelişemez ve lümen daralır. Tip Va lezyonlara ise fibroateromlar ismi verilir. Bu lezyonlar, kalın bağ dokusu tabakaları ile birbirlerinden ayrılmış lipid çekirdeklerinin bir araya gelmesinden meydana gelir. Aynı zamanda lezyon yüzeyinin bozulması sonucu da bu tip lezyonlar meydana gelebilir. Bu aşamadan sonra hematoma ve tromboz, lezyonların ilerlemesi için uygun bir ortam oluşturur. Tip Vb lezyonlar ise mineralize ve kalsifiye olmuş lipid çekirdeklerinden oluşur. Tip Vc lezyonlar fibrotik lezyonlardır. Ekstraselüler lipid oldukça azdır ve bağ dokusu içerisinde bolca çekirdek mevcudiyeti ile karakterizedir. Ateroskleroz ile ilişkili morbidite ve mortaliteden çoğunlukla Tip IV ve Tip V lezyonlardaki yüzey deformasyonları, hemoraji, hematoma gibi komplikasyonlar sorumludur (Ball ve ark., 1995).

2.2.4. Aterosklerozun komplikasyonları

Aterom plak damar duvarından lümenine doğru damar çapını daraltacak şekilde büyüme gösterir. Bu şekilde lümen daralır ve kan akışı azalır. Sonuç olarak koroner arterlere kan akımı azalır, iskemi ve angina pectoris tabloları oluşur (Alexander ve ark., 2012). Plak rüptüründen birçok faktör sorumludur. Ancak genel olarak sistemik inflamasyon rüptürü artırır (Tommasi ve ark., 1999). Plak rüptürü akut tromboza neden olur. Hassas plak yırtılarak üç farklı şekilde klinik oluşturur. İlk aşamada aterom plak içeriği rüptüre olup içerik kana temas eder, koagülasyon basamakları aktive olur, trombositler aktive olur. Trombus yama şeklinde oluşmuş olur. İkinci aşamada mural trombus oluşmuştur, damar lümeni daralmıştır. Üçüncü aşamada ise damar tamamen tıkanmıştır. Hassas plak yırtılarak koroner damarda tıkanıklık oluşturup MI gibi önemli ve ciddi sonuçlara neden olur (Tokgözoğlu, 2009).

Hassas plaktaki fibröz örtünün ince olmasından inflamatuvar süreçler sorumlu tutulmuştur. İnflamatuvar hücreler düz kas hücresinin kollajen sentezini durdurur ve interstisyel kollejenazlarla fibröz örtünün yapı bileşenlerinin parçalanmasına neden olur

(Galis ve ark., 1994). Plakta düz kas hücresi arttıkça dayanıklılık artar ancak inflamatuvar hücreler ne kadar artarsa o kadar zayıf olur. Bu dengenin kurulmasında mast hücreleri, T lenfositler, makrofajlar ve trombositler yer alır. Tromboz ve inflamasyon arasında birbirini arttırıcı yönde bir ilişki vardır. Trombositlerden salınan bazı mediatörler inflamasyonun artmasına neden olur. Endotel disfonksiyonu ve oksidatif stres de plağın hassas olmasına yol açar (Halvorsen ve ark., 2008).

Üçüncü aşamada oluşan total tıkanıklık önemli klinik sonuçlara yol açar. Oluşan tıkanıcı trombüs gittiği yerde iskemiye neden olarak MI, SVH ve PAH gibi sonuçlara yol açar. Trombin bu aşamada önemli bir yer alır. Fibrinojenden fibrin oluşturarak trombüs oluşumu ve trombosit agregasyonunu tetikler (Martinod ve Wagner, 2014).

Kararlı yapıdaki plaklar ise yoğun düz kas hücresi içerir. Dolayısıyla fibröz örtü kalındır. Bu plaklarda inflamatuvar hücreler kararsız yapıdaki plaklara göre daha azdır. Sonuç olarak bu plakların kliniği erozyon ya da yırtılma olarak değil de olduğu yerde büyüyerek lümen içinde daralma yaparak otaya çıkar (Thålin ve ark., 2019).

2.2.5. İnflamasyon süreçleri ve ateroskleroz

Aterojenik diyet, hiperkolesterolemi ve diğer risk faktörleri kısa süre içerisinde intimada ve diğer subendotelyal tabakalarda lökosit birikimine sebebiyet verir (Onat ve ark., 2015). Endotel hücreleri, sağlıklı bir damar yapısında lökositlerin adezyonuna direnç gösterirler fakat aterosklerotik yapılar bu adezyonu kolaylaştırır. Endotel-lokosit adezyon molekülleri endotele mononükleer lokosit adezyonu için elzemdir. VCAM-1, özellikle erken evre aterom plaklarındaki monosit ve T lenfositlere bağlanır.

Sağlıklı endotel hücreleri lökositler ile uzun süreli temasa direnç gösterir. Endotelde inflamatuvar süreç başladığında lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonunda artış meydana gelir. VCAM-1'in monositlerin aterom plağına toplanması açısından büyük önemi bulunmaktadır. VCAM-1 salınımı sonrası çeşitli kemoatraktan moleküllerin de vasıtasıyla monositler endotelyal hücrelere doğru harekete geçerler. CCR2 ile birlikte MCP-1 gibi bazı kemokinler bu sürece dahil olurlar. Monosit intimaya girdikten sonra makrofaja dönüşür. Bu makrofajlar, intraselüler lipoproteinlerin oksidasyon veya glikasyon için modifiye edilmesini sağlayan scavenger reseptörleri eksprese ederler. Böylece intrastoplazmik lipid birikimi meydana gelerek arteriyel köpük hücreleri oluşur.

Makrofajlar tunika intima içerisinde meydana gelen ateroskleroz ve komplikasyonlarının çoğundan sorumludur. Proinflamatuvar sitokinlerin büyük kısmı bu köpük hücreleri tarafından salınır böylece lezyondaki inflamatuvar yanıt ve ROS'nin artışı meydana gelir. Aktive olan mononükleer fagositler MMP üretir. Bu matriks metalloproteinazları hücre dışı matriksi çökeltirerek ateroskleroz plağının fibrotik kapsülünü güçlendirir. Makrofajlardan bazıları apoptozis ile ölerek "nekrotik çekirdek" oluşumuna sebebiyet verir (Singh ve ark., 2002).

VCAM-1'in lökosit adezyonuna ek olarak, endotel hücrelerde, lezyonlu bölgelere kolesterol girişine cevaben de üretildiği gösterilmiştir (Mayerl ve ark., 2006). Bunun yanında yapılan çalışmalarda kolesterol ile indüklenen lezyon formasyonu gelişimi için VCAM-1'in lökosit migrasyonundan önce miktarının arttığı ortaya konmuştur (Cook-Mills, 2002). Farelerde yapılan deneylerde VCAM-1'in selektif adezyonlarının embriyonik ölümlere sebep olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında VCAM-1'in hipomorfik varyantları üzerinde yapılan çalışmalarda apolipoprotein E (apo-E) geninin inaktivasyonu ile ateroskleroza duyarlı hale getirilen farelerde lezyon oluşumunun azaldığı ortaya konmuştur (Nakashima ve ark., 1998).

Aterojenik diyet sonrası, VCAM-1'in indüksiyonu, yüksek ihtimalle hiperlipidemiye cevaben tunika intimada toplanan modifiye lipoproteinler sebebiyle oluşan inflamasyona bağlıdır. Lipoproteinler, okside fosfolipidler ve lipoprotein oksidasyonu sonucu oluşan kısa zincirli aldehytlar, VCAM-1 geninin NF- κ B aracılı transkripsiyon aktivasyonunu indüklemektedir (Fitzgibbons ve Czech, 2014). İnterlökin-1 β veya TNF- α gibi proinflamatuvar sitokinlerin de aynı mekanizma ile endotelde VCAM-1 ekspresyonunu artırdıkları ortaya konmuştur. Sonuç olarak proinflamatuvar sitokinler, VCAM-1 ekspresyonu ve hiperkolesterolemi ile bağlantılı moleküllerdir.

Son dönemde, lezyon gelişen arterlerde selektif VCAM-1'in ekspresyon mekanizması sıkça araştırılmıştır. Arteriyal dallanmalar genellikle kan akımı sebebiyle shear stres (kan akımının damarlara uyguladığı çapraz basınç ya da kayma direnci) yaşamaktadırlar. Bu çalışmalarda ortaya atılan ateroprotektif bakış açısına göre arterlerin dallandığı noktalar gibi ateroskleroz gelişimine yatkın bölgelerde bozulmalar oluşmaktadır. Ateroprotektif özellik taşıyan genler, promotör bölgelerinde shear stres yanıt elemanlarını barındırırlar ve inflamasyonu düzenlerler. Örneğin; laminar akım

bulunan bölgelerde yüksek seviyelerde eksprese edilen süperoksit dismutaz enzimi oksidatif stres ile savaşmakta, VCAM-1 ekspresyonuna ve diğer inflamatuvar yolların aktivasyonuna sebep olmaktadır (Almabrouk ve ark., 2014). Bir diğer gen vasıtasıyla ise endotelden nitrik oksit sentaz ile açığa çıkarılan NOx salınmakta, bu durum vasküler inflamasyonun transkripsiyonel kontrol noktası olan NF- κ Byi inhibe ederek VCAM-1 gen ekspresyonunu da azaltmaktadır (Preiss ve Sattar, 2007). Bu bakış açısı akımın bozulduğu bölgelere rağmen, hiperkolesterolemi gibi risk faktörlerinin oluşumu ile aterom oluşumuna yönelim için bir yanıt oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmalarda lökositlerin endotele adezyonu sonrasında mutlak suretle diyapedez vasıtasıyla intimaya girdiği gösterilmiştir. Bu durum yaklaşık 100 yıldır bilinmekte ancak henüz birkaç yıldır moleküler analizleri araştırılmaktadır. Bu sayede lökosit migrasyonuna sebep olan kemokinler tanımlanmıştır. MCP-1'in aterosklerotik plaklardaki aşırı ekspresyonu, mononükleer fagositlerin alımına ve plaklarda birikimine sebebiyet vermektedir. IL-8 ve interferon- γ (IFN- γ) tarafından indüklenen CXC kemokinleri de aterogenez sırasında benzer kemoatraktan role sahiptir (Martinez-Lemus, 2012). Mast hücrelerinin aterom plağında görülmesi de benzer şekilde plakta aşırı miktarda üretilen bir CC kemokini olan eotaksine bağlı olabilir (Falk, 2006).

Monositler, tunika intima içerisinde yerleşik hale geldiğinde makrofajlara dönüşmeye başlar ve köpük hücre formuna geleceği bir takım değişiklikler yaşar. Monositler, SRA ve CD36 gibi reseptörlerin ekspresyonunu artırarak modifiye proteinleri içine alıp sitoplazmik damlacıklar halinde biriken kolesterol esterleri haline getirir. Bu lipidle dolu makrofajlar köpük hücreleri olarak adlandırılırlar ve aterosklerotik lezyonların erken halidirler.

Makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF)'ün, monositlerin makrofajlara dönüşümünde pek çok basamağı aktive ettiği ortaya konmuştur. M-CSF, SRA'yı artırarak sitokin ve büyüme faktörlerinin ekspresyonlarını artırmakta, sağkalım ve komitojenik uyarıyı indüklemektedir. Hem deneysel hem de insan aterosklerotik plaklarının M-CSF'yi aşırı ürettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Clinton ve ark., 1992). İnaktif M-CSF mutasyonlu fareler öncesinde aterosklerotik duyarlılıklarına göre beslenmiş ve M-CSF'nin lezyon gelişimleri üzerine etkileri araştırılmıştır. M-CSF delesyonlu farelerde, makrofaj birikiminin bariz şekilde azaldığı ve lezyon gelişiminin geciktiği

gözlemlenmiştir (Smith ve ark., 1995). Bu etki aynı şekilde hem apo-E hem de LDL reseptör eksikliğinde de gözlemlenmiştir. Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) de aterosklerotik plaklarda inflamasyonu indükleyebilmektedir. GM-CSF mononükleer fagositlerin yaşamasını destekler. Bu fagositler ise Hipokloröz asit artışının kaynağı olan myeloperoksidaz enzimini içerir ve plaklarda potansiyel oksidatif stres artışı ve inflamasyona sebep olur (Sugiyama ve ark., 2001).

Yağlı çizgilenme sonrası oluşan aterom plağı daha karmaşık bir hal alır ve klinik belirtiler oluşur. 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 büyüyünce, arteryal lümen daralır ve klinik belirtiler ortaya çıkmaya başlar. Bu belirtiler koroner akımda; stabil olmayan anjina pectoris 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. Var olan deliller, plakların parçalanmasının trombozlar tarafından tetiklenmesi ile gerçekleşebileceğini ve bunun da aterosklerotik lezyonun aniden genişlemesine neden olduğunu göstermektedir (Virmani ve ark., 2002).

Aterom plaklarının içerisindeki mikrovasküler yapıların rüptürü, ani plak progresyonunu açıklayan bir başka hipotezdir (Lim ve Park, 2014). Aterom plaklarındaki mikrovasküler yapılar tıpkı diyabetik retinada olduğu gibi frajildir ve kanamaya yatkındır. Yapılan çalışmalarda aterogenez esnasında plak içinde görülen fibrin, fibrinden yıkım ürünleri ve hemosiderin birikimi plak içinde gelişen kanamalar ve in situ tromboza işaret etmektedir. Bunun sonucunda trombin meydana gelerek fibrinojen artışına; böylece düz kas göçü ve çoğalmasına sebep olur. Trombin, plateletlerden platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) gibi growth faktörlerinin ekspresyonunu ve düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü sağlar. Aktive plateletlerden transforme edici büyüme faktör beta (TGF- β) da salınır. Bu büyüme faktörleri, düz kas hücrelerinde hücre içi kollajen üretimi için en güçlü uyaranlardır. Böylece aterosklerotik damarların tunika intimasında gelişen mikrovasküler kanamalar plak gelişimini hızlandırmaktadır. En yaygın plak rüptürü ise; plağın fibröz şapkasının kırılarak inflamasyona eklenmesiyle gelişir.

Sağlıklı koroner arterlerde endotel hücreleri bazal membran üstünde arteryal

lümeni kaplarlar. Erişkin bir insanda tunika intima genelde eser miktarda düz kas h crei içerir. İnternal elastik lamina, tunika tabakası ile subintimal ortam arasında bir bariyer görevi görür. Bu ortam kollajen ve elastin açısından oldukça zengin olup, düz kas hücrelerinden meydana gelen çok katmanlı bir yapıya sahiptir. Aterogenezin erken döneminde, inflamatuvar hücrelerin toplanması ve lipid birikimi lipid çekirdeklerin oluşumuna sebep olurken damarlar dışa doğru genişler. Eğer dislipidemi gibi risk faktörleri direnç kazanırsa; IFN-  gibi proinflamatuvar sitokinler yeni kollajenlerin sentezini sınırlarlar, ancak bu esnada lipid çekirdek progrese olup, proteinazlar hücre dışı matriksi parçalayabilir. Bütün bu olaylar fibröz başlığın zayıflayarak frajil bir yapı oluşmasına sebep olur. Bu durumun sonucunda plak rüptüre olur ve plaktan gelen kan intrinsik faktörle etkileşime girerek pıhtılaşma gerçekleşir. Plateletler, pıhtılaşma kaskadı tarafından üretilen trombin ve intima teması sayesinde aktive hale geçerek trombus oluşumunu tetikler. Bunun sonucu olarak trombus damarı tıkarsa akut MI tablosu ortaya çıkar.

Pıhtılaşma sırasında ortaya çıkan trombin tarafından tetiklenen iyileşme yanıtı, düz kas hücrelerinin çoğalmasını uyabilir. Aktive plateletler tarafından eksprese edilen PDGF düz kas migrasyonunu uyarır. Aynı şekilde aktif plateletlerce eksprese edilen TGF- , da hücre içinde kollajen üretimini uyarır. Bu artan g   fibröz başlığın kalınlaşması ve intima tabakasının genişlemesine neden olarak lümeni daraltır bu durum özellikle kalp yükünün artması durumunda kan akışını sınırlandırabilir ve göğüs ağrısı gibi bulguları tetikleyerek iskemi oluşturur. Daha da kalınlaşan stenozlarda kopma veya yeniden tromboz meydana gelebilir. Kan yağ seviyesinin azaltılması bu inflamatuvar yanıtın azalmasını sağlayabilir bu sayede daha stabil bir plak ve korunmuş bir lümen (merkez) oluşur (Singh ve ark., 2002). Fibröz plak rüptürleri, MI vakalarının yaklaşık  /4' ne sebep olmakta ve çoğunlukla herhangi bir klinik bulgu göstermemektedir. Fibrinolitik mekanizmalar, pro-koagülan yollara üstün gelirse, mural trombuslar oluşur ve düz kas kümeleşmesi ve kollajen akreditasyonu aterom plaklarının daha da fibroz bir yapıya dönüşmesine sebebiyet verir.

Endotelial inflamasyon gelişiminin iki farklı mekanizması bulunmaktadır. Bunlardan ilki apoptozis ya da T hücreleri aracılı sitolitik atakla oluşan endotel  l m d r. Bu durum, lokal inflamatuvar aracılardan ortaya çıkmasına neden olur. İnterleukin-1, TNF- , IL-6 ve IL-8 gibi inflamatuvar faktörler MMP  retimi ve aktivasyonunu tetikler.

(Rajavashisth ve ark., 1998). Böylece inflamasyon uyarılır ve endotel kaybı oluşarak yüzeysel erozyon meydana gelir. Makrofajların da dahil olduğu plak içindeki inflamatuvar hücreler düz kas hücreleri için growth faktörlerinin salgılanmasına ek olarak asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) aracılığıyla da salgırlar (Brogi ve ark., 1993). Plak içindeki mikrovasküler yapılar hem in situ trombozda kanama bölgesi olarak hem de plak büyümesinde besin görevi taşırlar. Yapılan çalışmalarda, anjiyogenez inhibisyonunun ateroskleroz predispoze farelerde mikrovasküler oluşum ve lezyon gelişimini azalttığı gösterilmiştir (Moulton ve ark., 1999).

İntersitisyel kollajen, fibröz şapkanın sağlamlığını sağlamaktadır. IFN- γ gibi pro-inflamatuvar sitokinler damar düz kaslarında kollajen üretimini inhibe ederler. İntersitisyel kollajen lifleri genelde yıkıma dirençlidir ancak yine de kollajen lifleri içinde proteolitik çentikler oluşmakta ve üçlü helikal yapıda kollajen fibrilleri meydana gelmektedir. Bu çatlakların gelişimi sonrasında jelatinazlar kollajen yıkımına devam eder. Aterom plaklarında MMP-2 ve MMP-9 isimli jelatinazlar aktive olmuştur. Ancak arterler MMP'lerin antagonistlerini endojen olarak üreterek metaloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP) olarak görev yaparlardı (Sukhova ve ark., 1999). Bunun yanında aterom plağındaki IL-1 β , TNF- α , ve CD40 ligandı (CD154) gibi inflamatuvar araçların da MMP ekspresyonunu tetiklediği ortaya konmuştur. Mast hücreleri hem MMP'yi indükleyen TNF- α hem de MMP proenzim aktivatörü olan serin proteinazları eksprese eder (Sarén ve ark., 1996). Sonuç olarak; fibröz şapkadaki kollajen yapının degradasyonu plağı güçsüzleştirerek rüptürlere duyarlı hale getirir.

2.2.6. Ateroskleroz patogeneğinde inflamasyon tetikleyicileri

LDL kolesterol, ateroskleroz gelişimi için en büyük risk faktörlerinden biridir ancak Amerika'da koroner arter hastalığına sahip bireylerin büyük bir kısmında kolesterol düzeylerinin yüksek olmadığı da ortaya konmuştur. LDL kolesterolü düşürmeyi amaçlayan tedavi protokollerine rağmen beş yıllık tedavi süresince koroner olayların en fazla 1/3'ü engellenebilmektedir bu sebeple tedavide LDL kolesterol dışında risk faktörlerini de hedeflemek gerekmektedir. Bu risk faktörleri arasında; Chlamydia pneumonia gibi enfeksiyöz ajanlar, lipoprotein A, Herpes virüsü, homosistein, Anjiyotensin II (ATII) bağımlı oksidatif stres yer almaktadır. ATII, hem inflamasyonu

hem de oksidasyonu tetikleyerek hipertansiyon ve ateroskleroza sebep olabilmektedir (Navab ve ark., 1998). Obezite oranları her geçen gün tüm dünyada yükselmekte, insülin direnci, diyabet ve “metabolik sendrom” gibi hastalıklar, ateroskleroz için risk teşkil etmektedir. Adipoz doku sitokin ekspresyonunu artırarak insülin direnci oluşturabilir ve sistemik inflamasyonu tetikleyebilir. Metabolik sendromda bazı küçük ve yoğun lipid parçacıkları oksidasyonu tetikleyerek inflamasyonu artırabilir. Düşük HDL kolesterol ve yüksek trigliserid seviyeleri metabolik sendromda bir diğer endojen inflamatuardır ve ateroskleroza yatkınlığı artırabilir. Sonuç olarak LDL’ye ek olarak farklı risk faktörleri de aterogenezi şiddetlendirebilmektedir (Carlson ve ark., 1988).

2.2.7. Ateroskleroz ve inflamatuvar süreçte etkili medyatörler

Endotel hücreleri lökosit adezyon moleküllerini ve kemokinleri salgılayarak ateroskleroza katkıda bulunmaktadır. Selektinler; lökosit adezyonunu düzenlerler. Daha sonra kemokinler, lökositleri uyararak VCAM-1 ve ICAM-1’e sırasıyla $\alpha 4$ ve $\beta 2$ integrin bağlanmasını artırır. Hem VCAM-1 hem de ICAM-1 yapısal ve fonksiyonel açıdan benzer özelliktedir. Her ikisi de lökositlerin integrinlerine bağlanan sitokinlerle uyarılabilen immünoglobulinlerdir. Fare ve tavşanlarda yapılan çalışmalarda ateroskleroz predispozisyonu bulunan aortik endotelyum bölgelerinde hem VCAM-1 hem de ICAM-1 salındığı ortaya konmuştur. Kolesterol yüksekliği bulunan hayvanlarda periferdeki köpük hücre yapılarından hem ICAM-1 hem de VCAM-1 salgılanmaktadır.

2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif fosforilasyon için kullanılan oksijenin yaklaşık %1-3’ü mitokondride ROS’ne dönüştürülür. Çoğunu serbest radikallerin oluşturduğu bu ROS’nin kimyasal reaktivitesi moleküler oksijene kıyasla daha yüksektir. Reaktif ve kısa ömürlü olan serbest radikaller diğer moleküller ile reaksiyona girerek kararlı duruma geçme eğilimindedirler (Karabulut ve Gülay, 2016). Elektron taşıma sistemleri aracılığıyla aerobik solunum sırasında; nötrofil ve makrofaj hücreleri tarafından inflamatuvar koşullarda; araşidonik asit metabolizması esnasında, otooksidasyon reaksiyonları sırasında ve patojenlere yanıt olarak immün sistem hücrelerinin uyarılmasıyla endojen kaynaklı serbest radikaller oluşabilir. Bunun yanı sıra UV ışınları, X-ray, gamma ve mikrodalga ışınları, kimyasallar, hava kirleticiler, temizlik ürünleri, boya, tiner, sigara kullanımı, orman yangınları ve volkanik faaliyetler gibi ekzojen kaynaklara bağlı olarak

da serbest radikaller oluşabilir (Büyüksu ve Yigitbaşı, 2015).

Oksidanlar ve antioksidanlar arasında oksidanlar lehine, potansiyel olarak hasara yol açan dengesizliğe oksidatif stres adı verilir. Bununla birlikte oksidanların oluşumundaki artışa antioksidan kaybı ve/veya antioksidanların oksitlenmiş formlarının birikimi eşlik ederse ortaya çıkan dengesizlikle oksidatif strese yaklaşılr (Kattoor ve ark., 2017). Moleküler, hücresel ve doku düzeyindeki oksidatif hasara karşı koruma için biyolojik sistemlerdeki redoks dengesinin korunması yaşamsal önemlidir (Senoner ve Dichtl, 2019).

2.3.1. Reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türleri

Atmosferde bulunan oksijen, moleküler oksijen (O_2) olarak adlandırılır. Normalde O_2 , mitokondride elektron transport zinciri tepkimeleri sonucunda suya (H_2O) dönüşür. Bu esnada mitokondrideki O_2 'nin bir kısmı suya dönüşmeyip oksijen kaynaklı radikallerin oluşmasına neden olur. Serbest radikallerden oksijen kaynaklı olanları ROS olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikal özelliği gösteren ROS'lar arasında süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksil ($ROO^{\cdot}$), lipid peroksil ($LOO^{\cdot}$), alkoksil ($RO^{\cdot}$) radikalleri yer almaktadır. Biyolojik sistemlerde oluşan nitrojen kaynaklı serbest radikallere ise reaktif nitrojen türleri (RNS) adı verilmektedir. En önemli RNS'i nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) ve nitrojen dioksittir ($NO_2^{\cdot}$). ROS ve RNS kolaylıkla serbest radikal özelliği göstermeyen oksidanlara dönüşebilir. Bu oksidanlar dış orbitallerinde elektron içermediklerinden radikal özellikte değildir. Ancak patolojik veya fizyolojik koşullarda kolaylıkla radikale dönüşebilirler. Hidrojen peroksit (H_2O_2), singlet oksijen (1O_2), ozon (O_3), hipokloröz asit ($HOCl$), peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$), dinitrojen trioksit (N_2O_3) ve lipid peroksit ($LOOH^{\cdot}$) serbest radikal özelliği göstermeyen bazı ROS ve RNS'dir (Chen ve ark., 2018).

Düşük yoğunluklarda hem ROS hem de RNS'nin çeşitli hücre fonksiyonlarının ve biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir. Fagositoz aracılığıyla enfeksiyonlara karşı koruma, sitotoksik lenfosit ve makrofajlar tarafından kanser hücrelerinin öldürülmesi, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, ATP üretimi, hücre büyümesi ve mitojenik etki oluşturma, bazı transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu, intraselüler depolardan Ca^{+2} salınımı, büyüme faktörleri ve bazı sitokinlerin sinyal iletimi gibi çeşitli hücresel fonksiyonlara aracılık etme bu reaktiflerin düşük konsantrasyonlardaki rollerinden bazılarıdır (Sies, 2015).

Güçlü sinyal molekülleri olarak işlev gören düşük ROS seviyeleri, sağlıklı damar fonksiyonlarının sürdürülebilmesi için gereklidir. Bunun aksine üretim ve eliminasyondaki dengesizlikten kaynaklanan aşırı ROS üretimi; vasküler hücre hasarına, endotel disfonksiyonuna, proliferasyonun indüksiyonuna, vasküler düz kas hücreleri (VDKH)'nin migrasyonuna, inflamatuvar hücrelerin vasküler duvarda birikmesine, lipid peroksidasyonuna, MMP aktivasyonuna ve ekstrasellüler matriks (ESM) birikimine sonuç olarak da vasküler yeniden modellenmeye neden olur (Chen ve ark., 2018).

2.3.2. Aterosklerozda endojen ROS/RNS oluşturan sistemler

Yaş, cinsiyet, obezite, sigara kullanımı, hipertansiyon, diyabet, dislipidemi, hiperhomosisteinemi, nitrat intoleransı gibi risk faktörleri sadece endotel hücrelerinden değil aynı zamanda düz kas ve adventisya kaynaklı hücrelerde de ROS/RNS'nin artmış üretimi ile yakından ilişkilidir (Li ve ark., 2014). Daha da önemlisi; hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu, VDKH'nin proliferasyonu ve intimaya göçü, endotel hücrelerinin apoptozu, lipidlerin oksidasyonu, MMP aktivasyonu ve vazomotor aktivitelerinin değişmesi dahil olmak üzere birçok patolojik süreç ROS/RNS tarafından tetiklenir (Vogiatzi ve ark., 2009).

Damar duvarında birkaç enzim ve enzim sistemi potansiyel olarak ROS üretebilir. Pek çok çalışmada nikotianamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz, miyeloperoksidaz (MPO), ksantin oksidaz (XO), lipoksijenaz (LPO), disfonksiyonel endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve mitokondriyal solunum zincirinin enzimleri aracılığıyla artan ROS üretiminden bahsedilmektedir. NAD(P)H oksidaz (NOX), kardiyovasküler sistemde en önemli ROS üreten enzim sistemidir. NOX'lar, vasküler endotel hücrelerinin, düz kas hücrelerinin ve fibroblastların membranlarında ekprese edilen multikomponent enzimlerdir (Förstermann, 2008). Aktivasyonları, NAD(P)H'dan elektron transfer ederek oksijen molekülünden O_2^- anyonunun oluşmasına neden olur (Kattoor ve ark., 2017). Vasküler duvardaki oksidatif modifikasyonlar, oksidan/antioksidan dengesi bozulduğunda ateroskleroza katkıda bulunabilir. Bu nedenle oksidan kaynakların süperoksit dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-Rx), glutatyon-S-transferaz (GST), tiyol-disülfür oksidoredüktaz ve peroksiredoksinler gibi endojen antioksidanlar tarafından süpürülmesi dengenin korunması için önemlidir (Shaito ve ark., 2022).

2.3.3. Antioksidanlar ve oksidatif hasarın önlenmesi

ROS/RNS'nin neden olduğu oksidatif hasarı önleyen, durduran ve/veya onaran çok sayıda endojen ve ekzojen kaynaklı antioksidan bulunmaktadır. Bunlar, enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki grupta sınıflandırılırlar. Vasküler duvarda yer alan majör enzimatik antioksidanlar SOD, GSH-Px, katalaz, hem oksijenaz-1 (HO-1), peroksiredoksinler (Prx), paraoksonazlar (PON) iken, enzimatik olmayan antioksidanlar ise glutasyon, ürik asit, albumin, melatonin ve bilirubin gibi endojen metabolizma ürünlerini, ağırlıklı olarak vitamin A, C ve E olmak üzere antioksidan vitaminleri ve diyet ile alınan polifenolik bileşikleri ifade etmektedir (Förstermann, 2008). Koenzim Q₁₀, polifenoller (flavonol, tiyoflavin, epikateşin), antioksidan mineraller (bakır, çinko, mangenez, selenyum), folik asit ve alfa lipoik asit (ALA) diğer anti-oksidanlar olarak bilinmektedir (Büyükuslu ve Yigitbaşı, 2015).

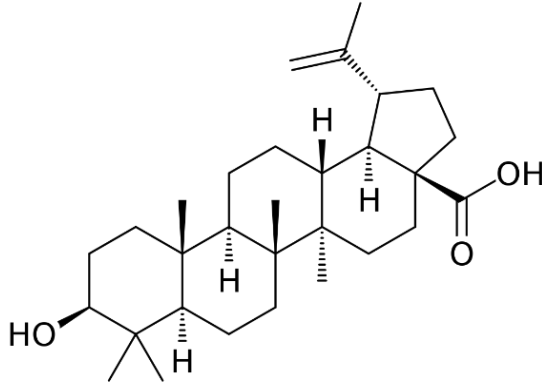
2.4. Betulinik Asit

Doğal ürünler binlerce yıldır insan hastalıklarının tedavisinde kullanılmış olup, yeni ilaçların keşfi ve geliştirilmesinde önemli yere sahiptir. Günümüzde kullanılmakta olan çoğu tümör veya enfeksiyon karşıtı ilaç, doğal ürünler sayesinde keşfedilmiştir. Doğal ürünler, yüksek verim ve düşük toksisite gibi önemli avantajlara sahiptir. Terapötik ilaçların toksik ve yan etkilerinin azaltarak hastaların yaşam kalitesini arttırmak amacıyla, düşük toksisiteye ve yüksek verime sahip anti-tümör ilaçlarının geliştirilmesi bilim insanlarının hedeflerinden biridir (Lou ve ark., 2021).

Betulin (lup-20(29)-ene-3 β ,28-diol) lupan tip bir bileşik olup 200'e yakın farklı bitkiden izole edilebilmiştir. Ancak betulin bakımından en zengin bitki türünün huş ağacı (*Betula sp.*) türleri olduğu bulunmuştur. Betulin türevlerinden olan betulinik asit, betulinin oksidize formudur (3 β -hydroxy-lup-20(29)-en-28-oic acid) (Şekil 1) (Lou ve ark., 2021).

Betulin, 1788 yılında Johann Tobias Lowitz tarafından bitkilerden izole edilmiş olup, beyaz huş ağacı kabuklarında en öne çıkan bileşendir (Zhong ve ark., 2021). Amerika ve Rusya'da beyaz huş ağacı kabuğunun mide ve barsak problemlerinde halk tarafından tedavi amacıyla kullanıldığı bilinmektedir. Betulinik asit, antienflamatuar, antibakteriyel, antiviral, antidiyabetik, antimalaryal, anti-HIV ve antitümör özellikler gibi biyolojik ve farmakolojik etkileri nedeniyle bilim insanlarının dikkatini çekmiştir

(Grymel ve ark., 2019; Lou ve ark., 2021).



Şekil 1. Betulinik asidin kimyasal yapısı (Lou ve ark., 2021)

2.5. Çalışmanın Amacı

Betulinik asitin anti-enflamatuvar etkisi çeşitli *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak betulinik asitin damar endoteli üzerine olan etkisini dolayısıyla da endotelial disfonksiyona etkisini araştıran çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Dolayısıyla betulinik asitin anti-aterojenik etkisi ve bu etkinin altında yatan mekanizmalar da tam olarak anlaşılamamıştır. Aterosklerozun önlenmesi ve tedavisi için nutrasötik bazlı yaklaşımların geliştirilmesi için betulinik asitin etkisinin daha iyi karakterize edilmesi gerekmektedir. Yaptığımız bu çalışmada TNF- α ile indüklenerek endotel disfonksiyon modeli oluşturulmuş insan umbilikal ven endotelial hücrelerinde (HUVEC hücre hattı), betulinik asit tedavisinin tedavisinin NOx, TNF- α , IL-1 β , IL-10, ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B düzeylerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışma TNF- α ile indüklenerek endotel disfonksiyon modeli oluşturulan HUVEC hücreleri üzerinde betulinik asit uygulamasının terapötik/profilaktik etkisini ortaya koymayı hedefleyen ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hücre hattı

Çalışmamızda kullanılan insan umbilikal ven endotel hücre hattı (HUVEC), Prof. Dr. Mirosław Krośniak'ın (Jagiellonian Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Gıda Kimyası ve Beslenme Anabilim Dalı) hücre kültürü koleksiyonundan temin edilmiştir.

3.1.2. Analizlerde kullanılan kimyasallar

Betulinik Asit	Xi'an Natural Field
Bidistile su	Sigma
Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat	Merck
Distile Su	Polifarma
DMSO	Merck
EDTA	Merck
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma
Hidroklorik asit	Merck
İnsan IL-10 ELISA kiti	Elabscience
İnsan IL-1 β ELISA kiti	Elabscience
İnsan Nitrik Oksit ELISA kiti	Elabscience
İnsan TNF- α ELISA kiti	Elabscience
İnsan VCAM ELISA kiti	Elabscience
İnsan ICAM ELISA kiti	Elabscience
İnsan NF- κ B ELISA kiti	Elabscience
L-Glutamin	Sigma
Penisilin	Sigma
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Potasyum klorür	Merck
RPMI 1640 medium	Sigma
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum klorür	Merck
Streptomisin	Sigma
Tripan Blue	Sigma
Tripsin/Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) çözeltisi	Sigma
Tris-HCl	Nzytech

3.1.3. Kullanılan cihazlar

Buzdolabı	Vestel
Çeker Ocak	Biolab
Dairesel Çalkalayıcı	Nüve
Derin Dondurucu (-20 °C)	Vestel
Derin dondurucu (-80 °C)	Elcold
Dikey Elektroforez Sistemi	Biorad
Distile Su Cihazı	Millipore
ELISA mikropate okuyucu	VersaMax
Etüv	Nüve
Hassas Terazı	Mettler Toledo
İnverted mikroskop	Euromex
Işık mikroskobu	Olympus
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Wisd
Jel Görüntüleme Sistemi	Biorad
Karbondioksit tüpü	Tüpaş
Karbondioksitli inkübatör	Biolab
Laminar Akım Kabini (Class II)	Nüve
Mikropipet Seti	Brand
Mini santrifüj	Nüve
Otoklav	Nüve
Otomatik Pipetör	Isolab
pH Metre	Mettler Toledo
Sıvı Azot Stok Tankı	Thermo
Soğutmalı Santrifüj	Nüve
Su Banyosu	Wisd
Trans Blot SD Semi-dry sistemi	Biorad
Ultrasonik Su Banyosu	Wisd
UV Lambası	Philips
Vorteks	Wisd

3.2. Yöntem

3.2.1. Hücre kültürü ortamı

Hücre kültürü çalışmaları steril laminar akım kabiniinde (Class II) gerçekleştirildi.

Hücre kültürü çalışmalarına başlamadan önce kabin % 70'lik etil alkol ile silindi. UV ışıktan etkilenmeyen ve kabin içerisinde kullanılacak olan malzemeler kabin içerisine bırakılarak 15 dakika UV ışığına maruz bırakıldı. Çalışma sonunda kabin % 70'lik etil alkol ile tekrar silindi ve kabinin kapağı kapatıldı. Kabin ve hücre kültürü odası 1 saat UV ışığa maruz bırakıldı.

3.2.2. Dondurulmuş hücrelerin çözündürülmesi

Çalışmamızda kullanılan HUVEC hücre hattı, çalışma yapılana kadar sıvı azot içerisinde (-196°C) saklandı. Çalışmaya başlamadan önce dondurulmuş hücreler 37°C sıcaklığındaki su banyosunda 1-2 dakika (yaklaşık 90 saniye) içerisinde çözüldü.

3.2.3. Hücrelerin ekilmesi

Hücre Besiyeri Ortamı (Komplete Medyum): Hücre kültüründe kullanılan hücre besiyeri ortamı şu şekilde hazırlandı;

RPMI 1640 besiyeri ortamı	100 mL
Fetal sığır serumu	% 10
L-Glutamin	2 mM
Penisilin	100 U/mL
Streptomisin	100 µg/mL

Tüm bu bileşenler otoklavlanmış kapaklı rekatif şişelerinin içerisinde hazırlanarak iyice karıştırıldı ve çalışma gününe kadar +4 °C'de saklandı. Çalışmamızda kullanılan HUVEC hücre hattında kriyoprotektif ajan olarak % 10'luk DMSO bulunmaktaydı. Bu DMSO'yu ortamdan uzaklaştırmak için çözündürülen hücreler 15 mL'lik falkon tüplere konuldu ve üzerine 9 mL komplete medyum eklenerek 1000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Süpernatant vakum ile hassas bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra altta kalan pellet üzerine taze hazırlanmış komplete medyumdan 6 mL eklenerek hücrelerin iyice süspande olması sağlandı ve 25 cm²'lik flasklara ekim yapılarak % 5 CO₂ ve % 95 hava içeren 37°C'deki inkübatöre kaldırıldı (Agrawal ve ark., 2021).

3.2.4. Alt kültürleme (Pasajlama)

Pek çok hayvan hücre hattı plastik ya da cam yüzeye yapışarak, tek bir hücre tabakası oluşturacak şekilde büyümektedir. Yüzey hücrelerle tam olarak kaplandığında (konflüe kültür) büyüme önce yavaşlar, sonra durur. Hücrelerin büyümeye devam etmesi için düzenli aralıklarla alt kültürleme (pasajlama) yapılması gerekmektedir. Alt kültürleme, hücre-hücre ve hücre-substrat arasındaki bağların tripsin, dispaz ya da kollajenaz gibi proteolitik enzimlerle kırılmasını gerektirir. Birbirlerinden ve tutundukları yüzeyden ayrılmış hücreler sayılır, istenilen dilüsyon yapılarak taze besiyeri içeren yeni kültür ortamına (flask, petri kabı vs.) alınır. Yeni kültür kabında hücreler önce yüzeye tutunur, daha sonra büyümeye ve bölünmeye başlar. Başlangıçta eklenen hücre sayısına, kültür koşullarına ve hücre hattına bağlı olarak inkübasyon zamanının sonunda kültür, yeniden konflüe hale gelir ve alt pasajlama tekrarlanır. Çalışmamızda kullandığımız HUVEC hücreleri % 80-90 konflüe hale geldiğinde yapıldı. Pasajlamada kullanılan çözeltiler ve hazırlanışları aşağıda belirtildi;

Stok Phosphate Buffered Saline (PBS) Tamponu (10X): 80 g NaCl, 2 g KCl, 11,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 son hacim 1 L olacak şekilde distile su içerisinde çözüldükten sonra, pH değeri 7,5'e ayarlandı, 121°C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edildi ve çalışma gününe kadar oda sıcaklığında saklandı.

PBS Çalışma Tamponu (1X): Hücre kültürü çalışmasından önce 10X stok PBS tamponu 1:10 oranında steril distile su ile seyreltilerek hazırlandı ve aynı gün içerisinde kullanıldı.

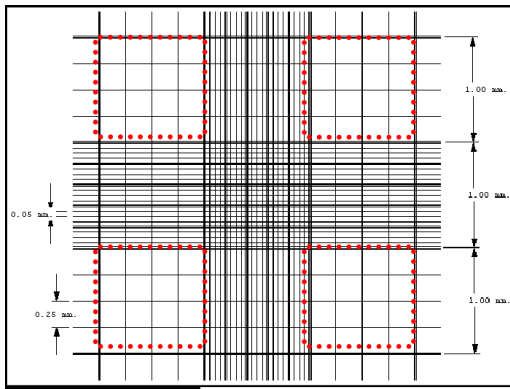
1X Trypsin-EDTA Çözeltisi: Ticari olarak elde edilen Trypsin-EDTA, steril 1X PBS ile 1:10 oranında seyreltilerek hücre pasajlamasında kullanıldı.

Çalışmada HUVEC hücreleri % 80-90 konflüe hale geldiklerinde 25 cm²'lik flasklardaki kültür besiyeri uzaklaştırıldı, hücreler 5 mL 1X PBS tamponu ile yıkandı ve 1 mL 1X tripsin-EDTA çözeltisi eklenerek 1 dakika boyunca hücrelerin üzerinde bekletildi. Daha sonra flasklar CO₂'li inkübatörde hücreler yüzeyden ayrılana kadar (yaklaşık 2 dakika) bekletildi. Hücrelerin PBS tamponu ile yıkanmasının sebebi, kültür ortamından tripsinin inhibitörü olan fetal sığır serumunu ortamdaki uzaklaştırmaktır.

İnkübasyon sonrası 5'er mL komplete medyum ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı. Tripsinin etkisinin ortadan kaldırılması için tripsinizasyon işleminden sonra hücrelere eklenen medyumun içeriğinde mutlaka % 10'luk fetal sığır serumu bulunmalıdır. Komplete medyum eklenen hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Süpernatant vakum ile hassas bir şekilde uzaklaştırıldıktan sonra altta kalan pellet üzerine komplete medyumdan 1 mL eklenerek hücrelerin iyice süspanse olması sağlandı. Hücre süspansiyonundan bir miktar örnek alınarak hücre sayımı yapılır. Hücre sayımı yapıldıktan sonra 25 cm²'lik flasklara uygun sayıda (yaklaşık 2x10⁵) hücre aktarıldı ve toplam besiyeri hacmi 5 mL'ye tamamlandı. Yaptığımız çalışmada hücre sayımı ile yapılan alt kültürlemede pasajlama oranı genelde 1:3 olarak bulunmuştur (Agrawal ve ark., 2021).

3.2.5. HUVEC hücrelerinin sayılması ve canlılık testi

Hücre kültürü testlerinde her kuyucukta eşit sayıda hücre olmalıdır. Çalışma öncesinde mL'deki canlı hücre sayısının hesaplanarak belirlenen sayıda hücrenin kuyucuklara alınması gerekmektedir. Bu amaçla hücreler tripan mavisi ile boyanarak canlı-ölü hücre sayımı yapılmaktadır. Hücrelerin sayımı için neubauer lamı kullanıldı. Neubauer lamı kalın, düz, sayım odacıklıdır. Neubauer lamı üzerinde 16'şar kareden oluşan, hacmi 0,1 µL olan toplam dört alan bulunmaktadır. Şekil 2'de neubauer lamının sayım alanları şematize edilmiştir.



Şekil 2. Neubauer lamının sayım alanı

Tripsinizasyon sonrası falkon tüplere toplanan hücrelerin 10 µL'si 10 µL tripan blue ile karıştırılarak karışım 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Karışım, pipet ile tekrar karıştırılarak 10 µL'si alındı ve neubauer lamına aktarıldı. Toplam dört alandaki

seçili kare çizgisi içindeki hücreler ışık mikroskobu altında 10x objektif kullanılarak sayıldı. Sayılan alanlardaki toplam hücre sayısı dörde bölünerek alan başına düşen ortalama hücre sayısı bulundu. Hücreler çok yoğun halde ise süspende hücreler seyreltilerek bunun sonucunda dilüsyon katsayısı ile çarpıldı. Neubauer lamında dört büyük karedeki hücreler sayılıp ortalaması alındıktan sonra mililitredeki hücre sayısı aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Tanaka ve ark., 1998);

$$1 \text{ mL'deki hücre sayısı (hücre/mL)} = \text{Ortalama canlı hücre sayısı} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 10^4$$

Tripan mavisi boyama yöntemi ile canlı-ölü hücrelerin sayısı ve canlı-ölü hücrelerin yüzdesi belirlenebilmektedir. Ölü hücrelerde meydana gelen membran hasarı sonucunda işlev görmeyen Na^+ - K^+ -ATPaz pompası nedeniyle boya membran tarafından absorblanmakta ve dışarı atılamamakta, dolayısıyla hücreler mavi renkte görülmektedir. Tripan blue ile boyanan hücrelerden canlı olanların membranları intakt durumda olduğundan küçük, yuvarlak ve refraktif yapıda olup sarı-yeşil renkte, ölü olanlar ise büyük ve şiş yapıda olup mavi renkte görülürler (Tanaka ve ark., 1998).

3.2.6. HUVEC hücrelerinin dondurulması ve saklanması

Pasajlanan hücrelerin bir kısmı daha sonra çalışılmak üzere dondurularak saklandı. Hücreleri dondurmak için öncelikle hücrelerin üzerindeki besiyeri uzaklaştırıldı. 5 mL PBS ile hücreler yıkandıktan sonra flasklara, 1 mL tripsin-EDTA çözeltisi eklendi. Eklenen tripsin 1 dakika boyunca hücreler üzerinde gezdirildi ve flasklar inkübatörde 2 dakika bekletildi. İnkübasyon sonrası 5'er mL % 10 FBS içeren RPMI 1640 ile hücreler falkon tüp içerisinde toplandı ve hücre süspansiyonu 400 g'de 5 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonunda süpernatant kısmı 1 mL kalacak şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL besiyeri içinde sulandırılarak sayıldı. Hücre sayısı mililitrede 2×10^5 olacak şekilde %20 FBS içeren RPMI 1640 ile seyreltildi ve kriyoviallere 900 μL bölüştürüldü. Buz üzerine alındı ve son hacminin %10'u olacak şekilde DMSO damla damla eklendi. DMSO eklenirken parmak ucuyla kriyovialler karıştırıldı. Kriyoviallerin kapakları kapatıldıktan sonra $+4^\circ\text{C}$ 'de 1 saat, -20°C 'de 1 saat ve daha sonra -80°C 'de 1 gece bekletildi. Kısa süre içinde kullanılacak hücreler -80°C de saklanmaya devam edildi. Uzun süre kullanılmayacak hücreler azot tankının buharında saklandı (Agrawal ve ark., 2021).

3.2.7. MTT deney protokolü

Betulinik asit uygulamasının HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerine etkisi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) testi ile değerlendirilmiştir. Bu yöntemde canlı hücreler tarafından tetrazolyum tuzu olan MTT boyasının indirgenmesi özelliğinden yararlanılmaktadır. Canlı hücreler, mitokondriyal enzimleriyle MTT boyasının tetrazolyum halkasını parçalayarak sarı renkli MTT boyasını mor renkli formazan ürününe dönüştürebilmektedir. Hücre içerisinde tutulan formazan kristalleri DMSO ile çözündürüldüğünde oluşan renk yoğunluğu 570 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür. Renk yoğunluğu ortamdaki canlı hücre sayısı ile orantılıdır. MTT testi için aşağıdaki işlemler uygulanmıştır.

Hücre sayımı yapıldıktan sonra 96 kuyucuklu hücre kültür pleytinin her kuyucuğuna 200 µL besiyeri içinde 1×10^4 hücre ekildi. 24 saat sonra pleyt inkübatörden alındı, içeriği uzaklaştırıldı. Farklı konsantrasyondaki betulinik asit çözeltisi (2-500 µM) için ayrılan kuyucuklara 200 µL eklenerek 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. Kontrol grubuna sadece 200 µL RPMI 1640 eklendi. İnkübasyondan sonra pleyt içeriği hızlıca ortamdan uzaklaştırıldı ve kağıt peçete üzerine ters çevrilerek kalan besiyerinin uzaklaştırılması sağlandı. Her kuyucuğa 200 µL RPMI 1640 eklendi ve üzerine son konsantrasyonu 0.25 mg/mL olacak şekilde 10 µL MTT boyası eklendi ve 2 saat 37 °C’de inkübe edildi. Pleyt içeriği uzaklaştırılarak tüm kuyucuklara 200 µL DMSO eklendi ve pleyt 20 dakika mikropleyt okuyucusunun çalkalayıcısında bekletildi. İnvert mikroskop altında kristallerin tamamen çözünüp çözünmediği kontrol edildi. Oluşan mor renkli bileşiğin absorbansı mikropleyt okuyucusunda 570 nm dalga boyunda, 620 nm referans dalga boyuna karşı okundu. Betulinik asitin her bir konsantrasyonu için elde edilen absorbans değerinin referans absorbans değerine oranı 100 ile çarpılarak % hücre canlılığı hesaplandı (Li ve ark., 2012).

$$\% \text{ Hücre Canlılığı} = \frac{A_{570} \times 100}{A_{620}}$$

3.2.8. Stok ve çalışma çözeltilerinin hazırlanması

Öncelikle betulinik asit için 1 mM konsantrasyonunda stok çözelti ve bu stok

çözeltiden hareketle farklı konsantrasyonlarda günlük çalışma çözeltileri hazırlandı.

Betulinik asit stok çözeltisi (1mM) (MW: 456.71 gr/mol): Bir miktar RPMI 1640 steril falkon tüpüne alındı, üzerine 4,567 mg betulinik asit eklendi, toplam hacim 10 mL olacak şekilde RPMI 1640 eklendi ve vortekslendi.

Farklı konsantrasyonlardaki betulinik asit çözeltilerinin hazırlanışı: 1 mM'lık stok çözeltiyle seri dilüsyon yöntemi kullanılarak 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 250 ve 500 μ M'lık betulinik asit çözeltileri RPMI 1640 ile seyreltilerek hazırlandı.

Çalışmamızda kullanılacak TNF- α için 50 mg TNF- α 1ml FBS ile çözüldü. Böylelikle, 50000 ng/mL olacak biçimde ana stok hazırlanmış oldu. Sonrasında ise, TNF- α uygulanan gruplara son konsantrasyon 10 ng/mL olacak biçimde eklendi (Spillmann ve ark., 2014). Yapılan 24 saatlik MTT değerlendirmesinin sonucunda betulinik asit LC₅₀ dozu 262,2 μ M olarak hesaplandı, değer 200 μ M'a yuvarlanarak çalışmalar gerçekleştirildi. Hücre kültürü aşamaları MTT testindeki ile aynıdır. Hücre kültürü çalışması için hücreler 6 kuyucuklu plate üzerine ekilmiş, gerekli uygulamalar yapılmış ve toplamda 24 saat inkübe edilmiştir.

Çalışmada 6 değerlendirme grubunu içerecek şekilde dizayn edilmiştir;

1. Kontrol grubu: Herhangi bir uygulama yapılmayan HUVEC hücreleri bu grupta yer almaktadır.

2. BET grubu: HUVEC hücrelerine 200 μ M betulinik asit uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. Bu grup betulinik asit ve TNF- α 'nın birlikte uygulandığı gruplar için pozitif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda betulinik asitin tek başına uygulandığında NOx, TNF- α , IL-1 β , IL-10, ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B düzeylerinin üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

3. TNF Grubu: HUVEC hücrelerine 10 ng/mL TNF- α uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. Bu grup betulinik asit ve TNF- α birlikte uygulandığı gruplar için negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda TNF- α 'nın tek başına uygulandığında NOx, TNF- α , IL-1 β , IL-10, ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B düzeylerinin üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

4. BET+TNF Grubu: 200 µM betulinik asit ve 10 ng/mL TNF- α 'nın HUVEC hücrelerine eş zamanlı olarak uygulanarak 24 saat inkübe edildiği gruptur. Bu grupta betulinik asitin endotelial hasarlanmanın başlangıcında alındığındaki tedavi edici özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

5. PreTNF+PostBET Grubu: Bu grupta HUVEC hücrelerine 10 ng/mL TNF- α önceden uygulanıp hücreler 6 saat inkübe edildikten sonra kuyucuğa 200 µM betulinik asit ilave edilerek inkübasyon süresi 24 saate tamamlanmıştır. Bu grubun amacı betulinik asitin endotelial hasarlanma meydana geldikten sonraki tedavi edici etkilerini incelemektir.

6. PreBET+PostTNF Grubu: Bu grupta HUVEC hücrelerine 200 µM betulinik asit önceden uygulanıp hücreler 6 saat inkübe edildikten sonra kuyucuğa 10 ng/mL TNF- α ilave edilerek inkübasyon süresi 24 saate tamamlanmıştır. Bu grubun amacı betulinik asitin endotelial hasarlanma öncesinde profilaktik olarak uygulandığındaki etkilerini incelemektir.

Bu gruplamalar sayesinde betulinik asitin profilaktik, inflamasyonla eş zamanlı ve hastalık sonrası tedavi edici etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Hem sağlıklı hücrelerle hem de betulinik asit ve TNF- α ile pozitif ve negatif kontrol edilerek sonuçların daha güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrasında grupların her birinde hücrelerden salınan NOx, TNF- α , IL-1 β , IL-10, ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B düzeyleri Enzim bağılı immünosorbent analizi (ELISA) kiti kullanılarak ve üretici firmanın çalışma protokolüne uygun olarak ölçülmüştür.

3.2.9. ELISA çalışmaları

İnvert mikroskopta kontrol edilen HUVEC hücreleri pasajlama için yeterli yoğunluğa ulaştığında, Tripsin/EDTA uygulaması ile flasktan kaldırıldı. Daha sonra kaldırılan hücreler Neubauer lamında sayıldıktan sonra, modelimizin koşullarına göre 96 kuyucuklu plaklara, her kuyucuğa 5×10^4 hücre son hacim 200 µl olacak şekilde her koşul için 5 kuyucuğa ekim yapıldı. Ekimi yapılan 96 kuyucuklu plaklar inkübatöre kaldırıldı. İkinci gün kullanılacak olan deney ortamı hazırlandı. FBS içermeyen ve L-Glutamin, Penisilin ve Streptomisin içeren renksiz RPMI 1640 ortam hazırlandıktan sonra su banyosunda ısıtılarak deney için uygun hale getirildi. Daha sonra 96 kuyucuklu plak inkübatörden alınarak deneye başlandı.

Öncelikle kontrol, lipopolisakkarit (LPS) ve LPS ve farklı konsantrasyonlardaki betulinik asit uygulanan gruplarındaki ortamlar vakum aracılığıyla çekildi. Daha sonra kontrol ve LPS gruplarına FBS içermeyen renksiz deney ortamı konuldu. LPS ve farklı konsantrasyonlardaki betulinik asit uygulanan gruplara ise kuyucuk başına 100 µl hacminde 2-500 µM konsantrasyonlarındaki betulinik asit çözeltileri eklendi ve 1 saat boyunca bu grup inkübe edildi. Her bir sekonder metabolit için ayrı ayrı kontrol ve LPS grupları kullanıldı. 1 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS grubundaki ortam çekilerek, kuyucuk başına 150 µl hacminde 10 ng/mL LPS içeren deney ortamı eklendi. Yine LPS ve farklı konsantrasyonlardaki betulinik asit uygulanan gruplara da kuyucuk başına 50 µl hacminde 30 ng/mL LPS (son konsantrasyon 10 ng/mL olacak şekilde) ve 2-500 µM konsantrasyonlarındaki betulinik asit çözeltileri içeren deney ortamı eklendi ve hücreler 4 saat boyunca inkübe edildi. 4 saatlik inkübasyon sonrasında, LPS grubuna kuyucuk başına 10 ng/mL LPS içeren deney ortamı eklendi. LPS ve farklı konsantrasyonlardaki betulinik asit uygulanan gruplara da 10 ng/mL LPS ve 2-500 µM konsantrasyonlarındaki betulinik asit çözeltilerini içeren deney ortamı eklendi ve bu basamakta tüm koşullardaki kuyucukların son hacimleri 200 µL'ye eşitlenmiş oldu. Tüm hücreler 1 saatlik inkübe edildi. Toplam 7 saatlik süreç sonrasında kuyucuklarda ki son hacimleri 200 µL olan plak inkübatörden alındı (González-Guerrero ve ark., 2013). Sonrasında hücrelerden salınan NO_x, TNF-α, IL-1β, IL-10, ICAM-1, VCAM-1, NF-κB düzeyleri ELISA kit (Elabscience Biotechnology Inc.) kullanılarak ve üretici firmanın çalışma protokolüne uygun olarak ölçülmüştür.

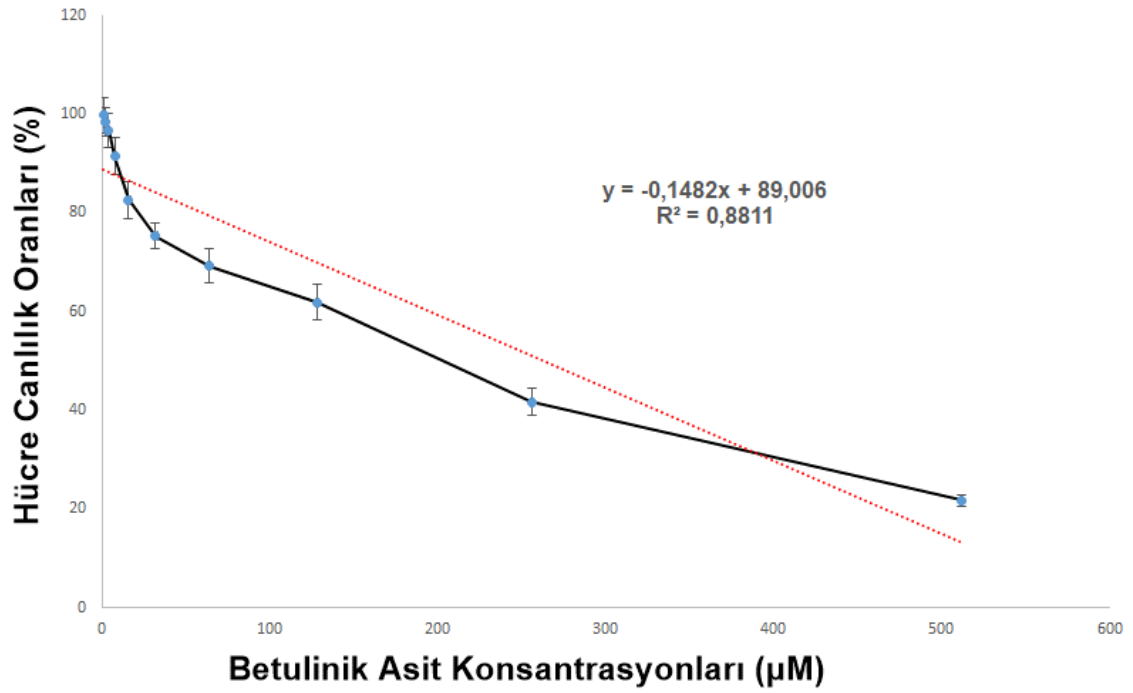
3.3. İstatistik Analiz

Çalışma sonunda elde edilen gruplara ait tüm veriler SPSS (versiyon 16.0) istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar tekrarlanan ölçümlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirildi. Varyans analizini takiben farklı grupları belirlemede Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanıldı. Tüm analizlerden elde edilen ham değerler, grupların ortalaması ± standart hata şeklinde sunuldu. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Betulinik Asit Uygulamasının Hücre Canlılığına Etkisi

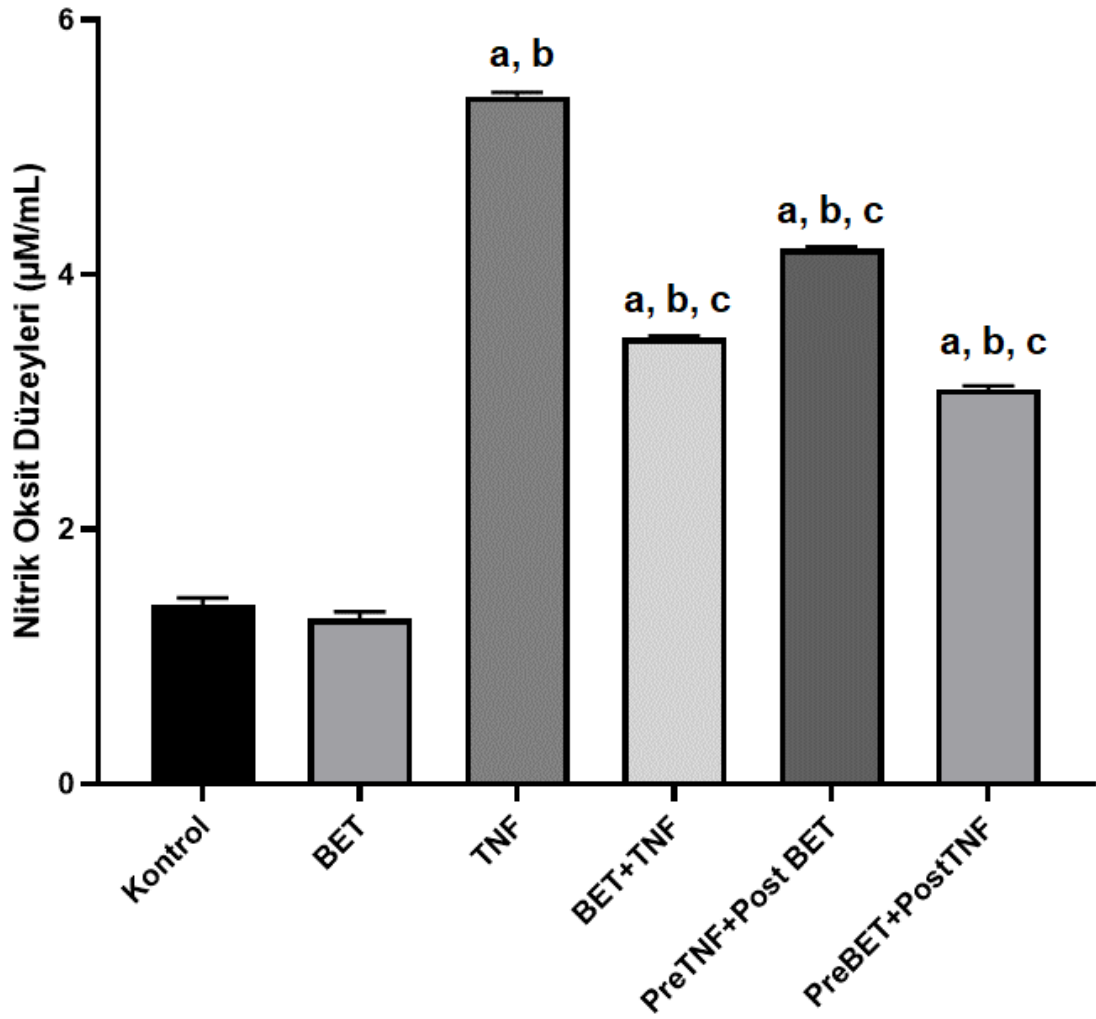
Tüm grupların hücre canlılık oranları Şekil 3’de gösterilmiştir. Tüm hücrelere betulinik asitin 0-500 µM konsantrasyonları uygulanmış ve 24 saatlik inkübasyonun sonrasındaki hücre canlılık oranları bulunmuştur. Betulinik asitin HUVEC hücreleri üzerindeki LC₅₀ konsantrasyonu 263,2 µM olarak bulunmuştur.



Şekil 3. Betulinik asit uygulamasının hücre canlılık oranlarına etkileri (%) (n=5).

4.2. Betulinik Asit Uygulamasının Nitrik Oksit Düzeyine Etkisi

Tüm grupların nitrik oksit düzeyleri Şekil 4’te gösterilmiştir. TNF grubunun nitrik oksit düzeyi, kontrol ve BET gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). BET+TNF, PreTNF+PostBET ve PreBET+PostTNF gruplarının nitrik oksit düzeyleri TNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 4. Betulinik asit uygulamasının nitrik oksit düzeylerine etkisi ($n=5$). (**BET:** Betulinik asit; **TNF:** Tümör nekroz faktör-alfa)

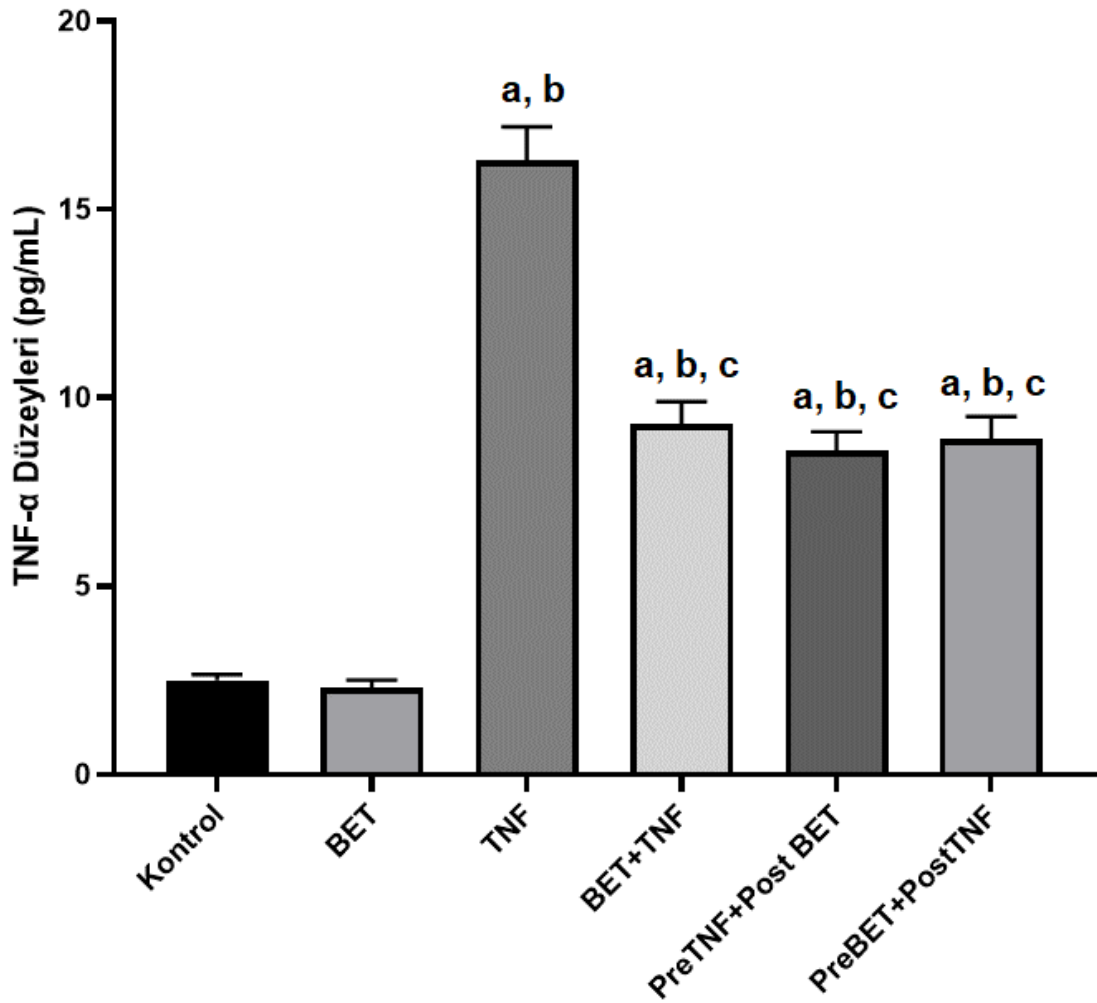
^aKontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^bBET grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^cTNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

4.3. Betulinik Asit Uygulamasının TNF- α Düzeyine Etkisi

Tüm grupların TNF- α düzeyleri Şekil 5’de gösterilmiştir. TNF grubunun TNF- α düzeyi, kontrol ve BET gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). BET+TNF, PreTNF+PostBET ve PreBET+PostTNF gruplarının TNF- α düzeyleri TNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 5. Betulinik asit uygulamasının TNF- α düzeylerine etkisi ($n=5$). (**BET:** Betulinik asit; **TNF:** Tümör nekroz faktör-alfa)

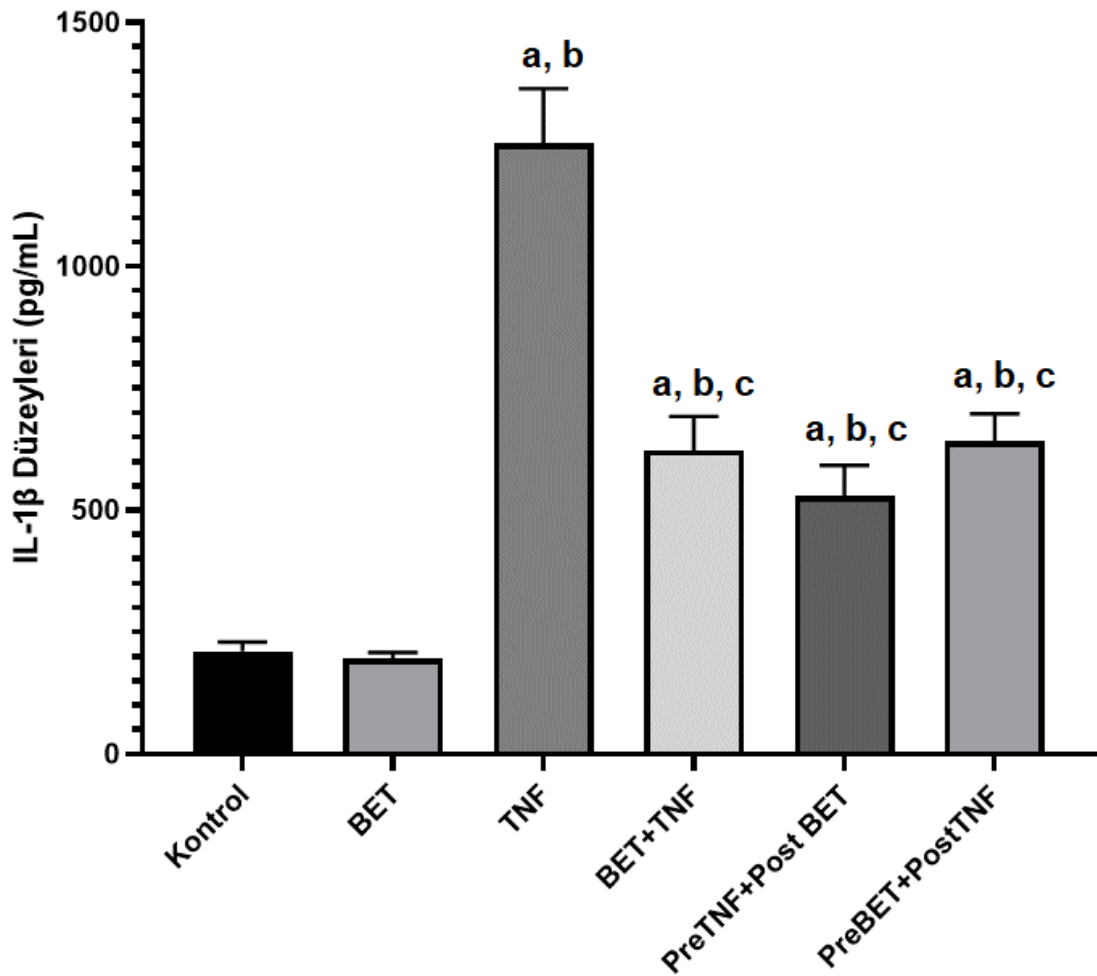
^aKontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^bBET grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^cTNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

4.4. Betulinik Asit Uygulamasının IL-1 β Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-1 β düzeyleri Şekil 6’da gösterilmiştir. TNF grubunun IL-1 β düzeyi, kontrol ve BET gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). BET+TNF, PreTNF+PostBET ve PreBET+PostTNF gruplarının IL-1 β düzeyleri TNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 6. Betulinik asit uygulamasının IL-1 β düzeylerine etkisi ($n=5$). (**BET:** Betulinik asit; **TNF:** Tümör nekroz faktör-alfa; **IL-1 β :** İnterlökin 1-beta)

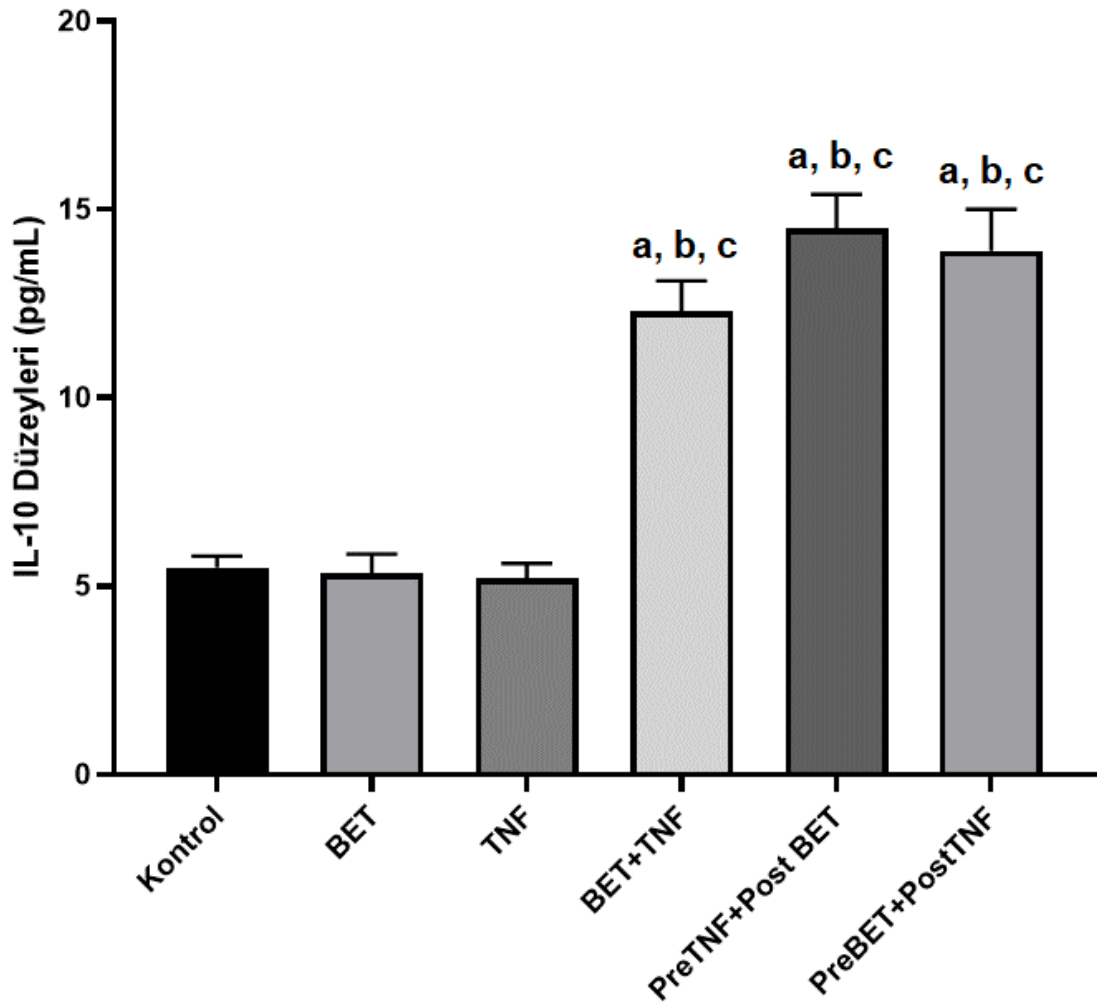
^aKontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^bBET grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^cTNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

4.5. Betulinik Asit Uygulamasının IL-10 Düzeyine Etkisi

Tüm grupların IL-10 düzeyleri Şekil 7’de gösterilmiştir. TNF grubunun IL-10 düzeyi, kontrol ve BET gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık göstermemektedir ($p>0.05$). BET+TNF, PreTNF+PostBET ve PreBET+PostTNF gruplarının IL-10 düzeyleri TNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 7. Betulinik asit uygulamasının IL-10 düzeylerine etkisi ($n=5$). (**BET:** Betulinik asit; **TNF:** Tümör nekroz faktör-alfa; **IL-10:** İnterlökin 10)

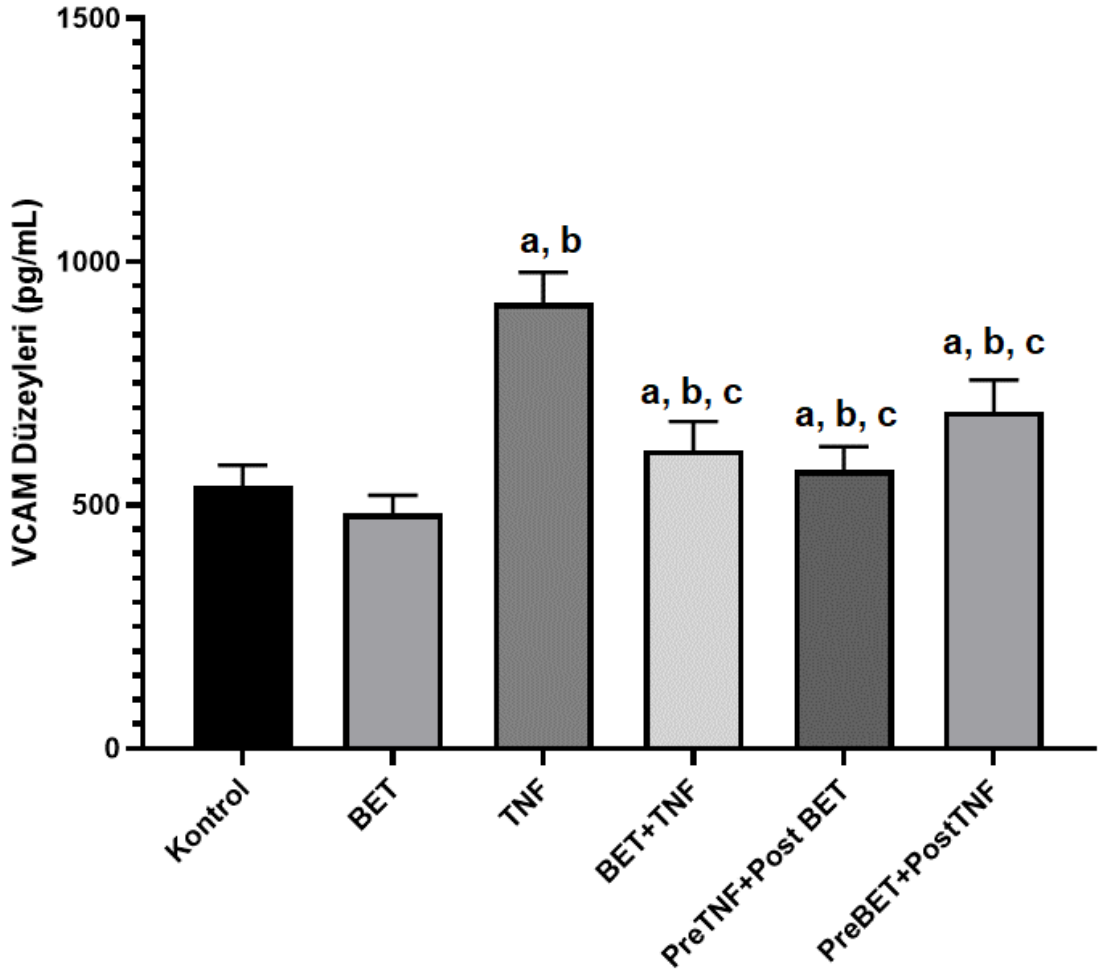
^aKontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^bBET grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^cTNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

4.6. Betulinik Asit Uygulamasının VCAM-1 Düzeyine Etkisi

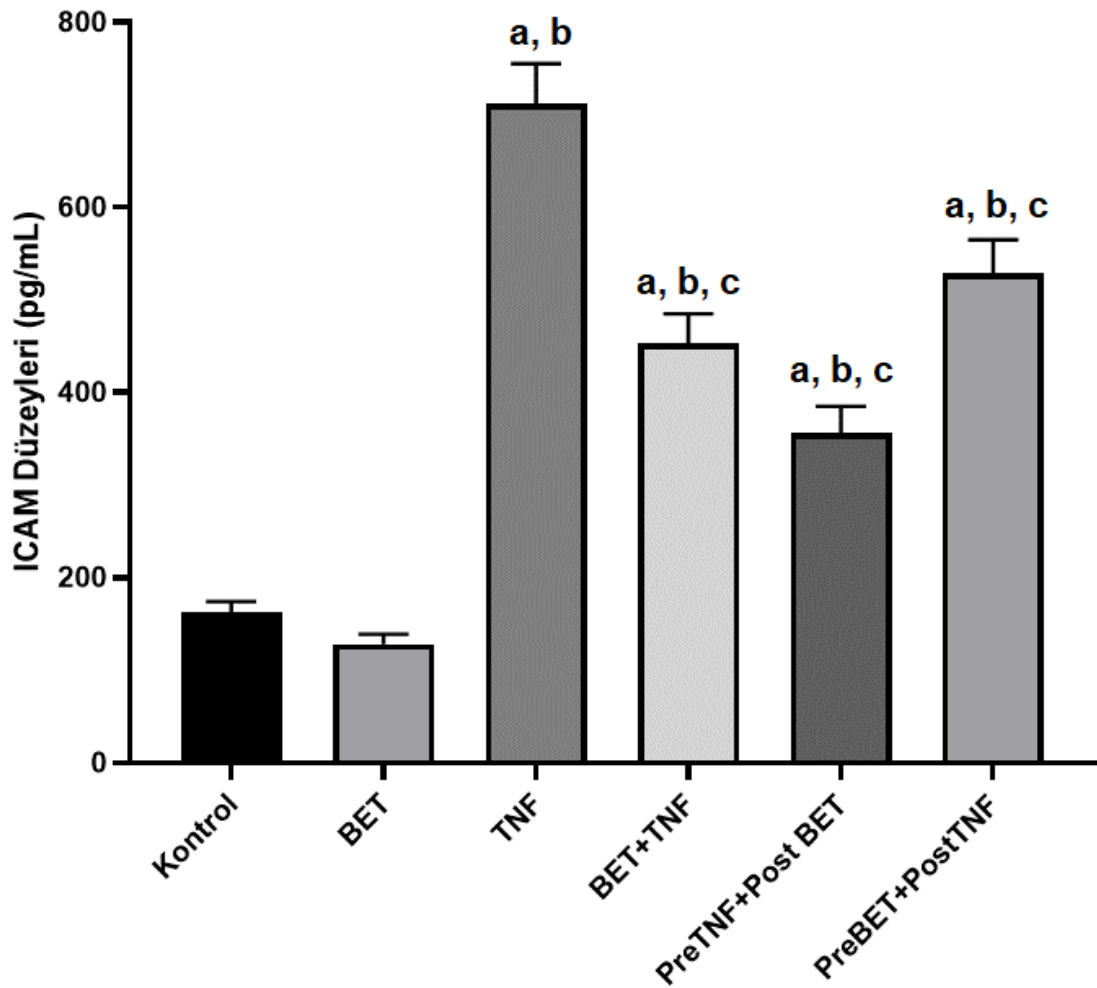
Tüm grupların VCAM-1 düzeyleri Şekil 8’de gösterilmiştir. TNF grubunun VCAM-1 düzeyi, kontrol ve BET gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). BET+TNF, PreTNF+PostBET ve PreBET+PostTNF gruplarının VCAM-1 düzeyleri TNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 8. Betulinik asit uygulamasının VCAM-1 düzeylerine etkisi ($n=5$). (**BET:** Betulinik asit; **TNF:** Tümör nekroz faktör-alfa; **VCAM-1:** Vasküler hücre adhezyon molekülü-1)
^aKontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)
^bBET grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)
^cTNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

4.7. Betulinik Asit Uygulamasının ICAM-1 Düzeyine Etkisi

Tüm grupların ICAM-1 düzeyleri Şekil 9'da gösterilmiştir. TNF grubunun ICAM-1 düzeyi, kontrol ve BET gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). BET+TNF, PreTNF+PostBET ve PreBET+PostTNF gruplarının ICAM-1 düzeyleri TNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 9. Betulinik asit uygulamasının ICAM-1 düzeylerine etkisi ($n=5$). (BET: Betulinik asit; TNF: Tümör nekroz faktör-alfa; ICAM-1: Hücre içi adhezyon molekülü-1)

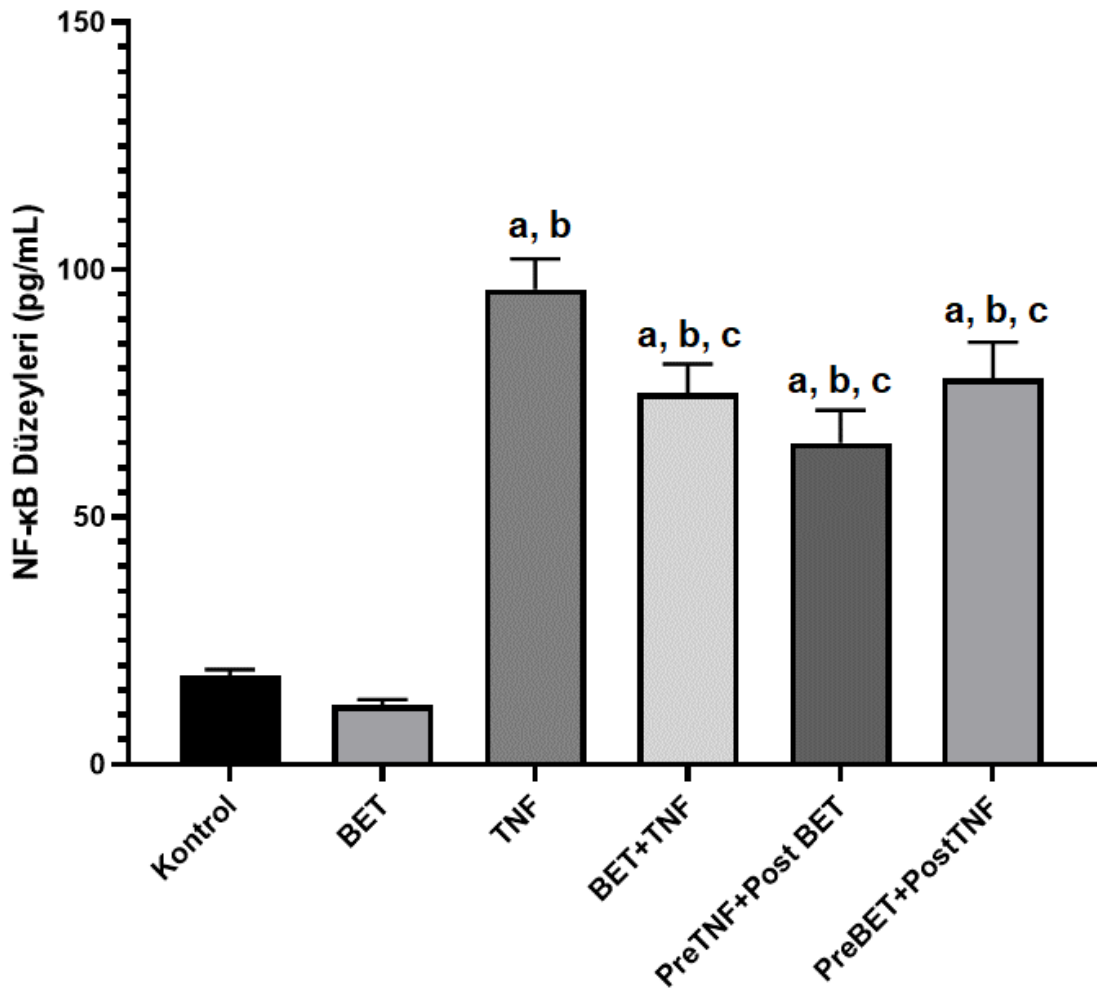
^aKontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^bBET grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^cTNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

4.8. Betulinik Asit Uygulamasının NF-κB Düzeyine Etkisi

Tüm grupların NF-κB düzeyleri Şekil 10’da gösterilmiştir. TNF grubunun NF-κB düzeyi, kontrol ve BET gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). BET+TNF, PreTNF+PostBET ve PreBET+PostTNF gruplarının NF-κB düzeyleri TNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 10. Betulinik asit uygulamasının NF-κB düzeylerine etkisi ($n=5$). (BET: Betulinik asit; TNF: Tümör nekroz faktör-alfa; NF-κB: Nükleer Faktör Kappa B)

^aKontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^bBET grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

^cTNF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark bulunmaktadır ($p<0.05$)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya'daki ölümlerin en önemli nedeni olan kardiyovasküler hastalıkların etiyolojisinde başta ateroskleroz olmak üzere dislipidemi, yüksek kan basıncı, yüksek kan glukozu, artmış enflamatuvar belirteçler, oksidatif stres ve protrombotik durum gibi kardiyometabolik risk faktörleri yer almaktadır (Ritchie ve Connell, 2007). Bu risk faktörleri arasında en fazla çalışılanı ise şüphesiz ki en yaygın olarak görülen ateroskleroz sürecidir. Ateroskleroz, insan sağlığına zararlı kronik bir kardiyovasküler hastalık olup dünyadaki en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Aterosklerozdaki ana lezyonlar, düz kas hücresi ve fibröz matriks proliferasyonu ile birlikte arterin bazı kısımlarında lipid birikimi ile başlar ve yavaş yavaş aterosklerotik plak oluşumu ile karakterize edilir. Ateroskleroz çocukluk çağında oluşmaya başlar ve on yıllarca sessiz bir şekilde ilerler. Gelişen aterosklerotik plak zamanla damar lümeninde daralmaya neden olarak kan basıncında artış ve dolaşım bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir (Vasquez ve ark., 2012; Abu-Saleh ve ark., 2016). Hatta bu lezyon bölgesinin yırtılarak veya erozyona uğrayarak trombüs oluşumuna yol açarak çevre dokularda iskemiye neden olduğu da bilinmektedir. Ateroskleroz gelişimine dislipidemi, enflamasyon, obezite ve diyabet gibi metabolik bozukluklar da katkı sağlar (Ye ve ark., 2022).

Ateroskleroza neden olan veya aterosklerozun neden olduğu birçok patoloji biliniyor olmasına olmasına rağmen aterosklerotik lezyonun patobiyolojisine ilişkin bilgiler oldukça sınırlıdır. Arterlerde ateroskleroza ilişkin patolojik değişiklikler ameliyat sırasında ve kadavralardan elde edilen kesitsel çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Stary ve ark., 1994). Günümüzde aterosklerotik lezyon bölgesi ile ilgili bilgilerin sınırlı kalmasında, birçok kimyasal ve hücrel etkileşimde önemli rol oynamaktadır (Ross, 1993).

İnflamasyonun, aterosklerozun ilerlemesinin her aşamasında majör role sahip olduğunun anlaşılmasının ardından enflamasyon medyatörlerinin hastanın kardiyovasküler riskini belirlemede ve tedavi hedeflerinin planlanmasında yarar sağlayacağı düşünülmüştür (Fatkhullina ve ark., 2016). Bu bağlamda damar greft açıklığı ve fonksiyonunun korunmasında özellikle pro-enflamatuvar sitokinlerin (TNF- α , IL-1, IFN- γ) rollerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Crook ve ark., 2000; Wu

ve ark., 2007). Güçlü bir pro-inflamatuvar sitokin olan TNF- α 'nın aterojenez patogeneğinde çok kapsamlı etkilere sahip olduğu bilinmektedir. ROS ve RNS oluşumu üzerine etkileri, NOx oluşumu ve biyoyararlanımını azaltıcı etkileri, hücre adezyon moleküllerinin sentez ve stimülasyonu üzerine etkileri, vasküler düz kas hücrelerinin farklılaşması, proliferasyon ve migrasyonuna etkileri, ekstrasellüler matriks moleküllerinin yıkımı ve matriks metalloproteinazların aktivasyonu üzerine etkileri TNF- α 'nın aracılık ettiği olaylardan bazılarıdır (Jayaraman ve ark., 2008; Sprague ve Khalil, 2009).

Bu çalışmada, HUVEC hücrelerine TNF- α uygulayarak oluşturduğumuz deneysel enflamasyon modelinde betulinik asit uygulaması sonrasında NOx, TNF- α , IL-1 β , IL-10, ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B düzeylerine ELISA yöntemiyle bakılmış ve betulinik asitin vasküler hasarlanma ve ateroskleroz üzerine olası etkileri araştırılmıştır.

Literatürde betulinik asitin hem *in vivo* hem de *in vitro* anti-enflamatuvar etkinliğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Betulinik asidin, enflamatuvar yanıtta yer alan çeşitli hücre tiplerinin ve moleküllerin aktivitesini modüle ettiği gösterilmiştir. Kritik bir enflamatuvar aracı, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) enziminin etkisiyle L-arginin'den üretilen NOx'tir (Förstermann ve Sessa, 2012). Aşırı üretilmesi halinde NOx, artrit, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve multipl skleroz gibi çeşitli inflamatuvar hastalıkların gelişimine yol açar (Sharma ve ark., 2007). Bu nedenle, iNOS ve/veya NOx üretiminin inhibisyonu, anti-enflamatuvar özellikleri değerlendirmek için değerlendirilebilir. İlginç bir şekilde, birkaç *in vitro* çalışma, betulinik asidin, özellikle bakteriyel LPS ve/veya IFN- γ ile uyarılan makrofaj kültürlerinde NOx üretimini inhibe edebileceğini göstermiştir (Meira ve ark., 2017; Ryu ve ark., 2020).

Ayrıca, betulinik asit COX-2 aktivitesini de inhibe eder ve bu nedenle PGE₂ sentezini azaltır (Kim vd., 2016). PGE₂ ateş, ağrı ve trombosit agregasyonu gibi enflamatuvar semptomlardan sorumludur ve bu nedenle PGE₂ üretiminin azaltılmasının ölçülmesi anti-enflamatuvar ilaçların keşfi için cazip bir stratejidir (Park ve ark., 2006). IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 ve TNF gibi kritik pro-enflamatuvar sitokinlerin üretimi de betulinik asit tedavisi ile azaltılır (Li ve ark., 2019). Bu etkilerin çoğu, çeşitli pro-enflamatuvar genlerin düzenlenmesinde rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B'nin inhibisyonu ile ilgilidir (Meira ve ark., 2017; Li ve ark., 2019). NF- κ B

aktivasyonunun betulinik asit tarafından inhibisyonu, endotel hücrelerinde ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu da azaltır, bu da vasküler inflamasyonun tedavisi için etkileri olabilir (Yoon ve ark., 2010).

Karragenan kaynaklı enflamasyonla ilişkili ana mekanizma iyi karakterize edilmiştir ve COX-2, IL-1 β , NO $_x$, PGE $_2$ ve TNF- α gibi enflamatuvar aracılardan azaltılmasını içerir (Tsai ve ark., 2011). Buna ek olarak, antioksidan enzimlerin inhibisyonu, lipid peroksidasyonu ve karaciğerde hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikali gibi serbest radikallerin üretimi, hücre hasarı ile ilgili karragenan kaynaklı inflamasyonda ortak özelliklerdir (Cuzzocrea ve ark., 1999). İlginç bir şekilde, betulinik asit ile tedavi, enflamasyon bölgesinde yukarıda açıklanan enflamatuvar aracılardan üretimini azaltmış ve karaciğerde süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz enzim aktivitesini artırmıştır (Ou ve ark., 2019). Ayrıca, betulinik asit, oksidatif stresin önemli bir aracı olan ve serbest radikal aracılı lipid peroksidasyon hasarının bir belirteci olarak yaygın şekilde kullanılan malondialdehit seviyelerini inflamasyon bölgesinde azaltmıştır (Tsai ve ark., 2011). Son olarak, Ou ve ark. (2019), betulinik asidin pençe ödemi dokusunda MAPK sinyal yollarını (ERK1/2, JNK ve p38) aşağı regüle ettiğine dair kanıtlar sunmuştur; bu da kısmen sitokin üretiminin (IL-1 β ve TNF), COX-2 ekspresyonunun ve PGE $_2$ üretiminin inhibisyonunu açıklamaktadır.

NF- κ B enflamatuvar sürece ve metabolik hastalıkların gelişimine katkıda bulunan önemli moleküllerden biridir. Betulinik asitin aterosklerozdaki vasküler hasarlanmayı düzenleyen etki mekanizmalarından birisi NF- κ B yolağını modifiye ederek anti-enflamatuvar etki göstermesidir. NF- κ B, önemli bir proenflamatuvar nükleer transkripsiyon faktörü olup primer ve indüklenmiş inflamasyon yanıtlarına katkıda bulunur. NF- κ B inhibitör proteinleri indirgeyerek aktive olup DNA'ya bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu artırır. Yapılan çalışmalarda, Visfatin, TNF- α , ve adiponektin gibi adipokinlerin ve adipokin ile azaltılan ya da artırılan MCP-1, IL-6, IL-8, E-selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi enflamatuvar medyatörlerin salınımının da endotelde NF- κ B üzerinden regüle edildiği ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalarda TNF- α 'nın ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Zhong ve ark., 2012). ICAM-1, endotel hücreleri ve lökositler tarafından normal koşullarda bazal seviyelerde eksprese edilir. Ayrıca; TNF- α , IFN- γ , IL-1 ve LPS gibi enflamatuvar uyaranlar ile de ekspresyonu artar (Pober ve ark., 1986; Sampath ve ark., 1995). ICAM-1, lökosit

transendotelial göçü ve antijen sunumu sırasında meydana gelen sıkı adezyonu sağlar ve ateroskleroz gelişimine katkıda bulunur (Springer ve ark., 1995). VCAM-1, özellikle yeni oluşan ateroskleroz üzerindeki monosit ve T lenfositlere bağlanır (Libby, 2002). IL-1 β veya TNF- α gibi proinflamatuar sitokinler, NF- κ B aracılı VCAM-1 transkripsiyonunu indüklemektedir. Bu da; proinflamatuar sitokinler, NF- κ B, VCAM-1 ve ateroskleroz arasındaki bağlantıyı anlaşılır kılmaktadır.

Çalışmamızda TNF- α uygulanan grupta NOx, TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B düzeylerinde artış görülmüş olup çalışmamızdan elde ettiğimiz bu veriler literatürle benzerlik göstermekteydi. Bu sonuç TNF- α ile indüklenen hücrelerde başarılı bir şekilde enflamasyonun tetiklendiği ve ilgili tüm medyatörlerin ekspresyonlarının arttığı ve NF- κ B yolunun aktive olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Betulinik asitin tek başına uygulandığı grupta ise NOx, TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B düzeylerinde kontrol grubuyla arasında anlamlı bir artışa neden olmadığı hatta bazı enflamatuar parametrelerini kısmen de olsa azalttığı ortaya konulmuştur. Bu durum betulinik asitin LC₅₀ dozunda uygulandığında HUVEC hücrelerinde sitotoksik etki açısından güvenli olduğu ve molekülün tek başına uygulanmasının herhangi bir şekilde enflamatuar yanıtı tetiklemediği şeklinde yorumlanmıştır.

Betulinik asitin, TNF- α ile eş zamanlı, öncesinde ya da sonrasında uygulandığı tüm gruplarda TNF- α 'nın tek başına uygulandığı gruba kıyasla NOx, TNF- α , IL-1 β , ICAM-1, VCAM-1 ve NF- κ B düzeylerinde düşüşe neden olduğu görülmüştür. Bu durum betulinik asitin hem profilaktik hem terapötik hem de profilaktik/terapötik olarak etki gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Çalışmamızda, TNF- α ile indüklenen HUVEC hücrelerine farklı zamanlarda betulinik asit uygulamasının hem ICAM-1 hem de VCAM-1 seviyesinde düşüşe neden olması betulinik asitin hem hücre-hücre bağlantısını hem de hücre-lökosit bağlantısını azaltarak adezyonu önlemeye de katkıda bulunduğu şeklinde yorumlanmıştır. Vasküler inflamasyon ve ateroskleroz patogeneğinde önemli rol oynayan adezyon moleküllerinin düzeylerindeki azalmanın en olası sebebinin, betulinik asit uygulamasının NF- κ B seviyesini azaltması olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda ayrıca HUVEC hücrelerinde IL-10 düzeylerine de bakılmıştır. Sitokin üretimini azaltıcı faktör olarak da adlandırılmış olan IL-10, yardımcı T lenfositler,

B lenfositler, mast hücreleri, eozinofiller, monositler, makrofajlar ve keratinositler tarafından salgılanırlar (Lalani ve ark., 1997). IL-10'un iki önemli etkisi vardır; bunlardan birincisi makrofajlar tarafından sitokinlerin üretimini engellemek, ikincisi ise makrofajların T hücresi aktivasyonundaki işlevleri engellemektir. Bu etkilerin sonucunda T hücresi aracılığı ile gelişen bağışıklık yanıtı inhibe edilir (Gröschel ve ark., 2017). T hücrelerinin proliferasyonunu ve sitokin salgılamasını baskılar. Pro-enflamatuvar sitokinlerin salgılanmasını engeller. Ayrıca IL-15, IL-6, IL-12 ve TNF- α 'yı baskılar. Nitrik oksit ve prostaglandin sentezinin baskılar, IFN- γ üretiminin baskılar, B hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonunu artırır, makrofajlarca IL-1 reseptör salgılanmasını artırarak enflamasyonu engelleyebilir (Lalani ve ark., 1997). Yaptığımız çalışmada TNF- α uygulaması HUVEC hücrelerinden IL-10 salınımını değiştirmedeği, betulinik asitin, TNF- α ile eş zamanlı, öncesinde ya da sonrasında uygulandığı tüm gruplarda TNF- α 'nın tek başına uygulandığı gruba kıyasla IL-10 düzeyini arttırdığı görülmüştür. Bu sonuç, betulinik asitin HUVEC hücreleri üzerinde anti-enflamatuvar etkinliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda HUVEC hücreleri üzerine kısa süreli betulinik asit uygulaması yapılarak, betulinik asitin enflamatuvar süreçler üzerine olan akut etkisi değerlendirilmiştir. Betulinik asitin ateroskleroz kökenli hastalıkların profilaksi ve tedavisinde NF- κ B yolağındaki adezyon moleküllerinin seviyesini azaltarak etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu sebeple, betulinik asitin etkinliği ve ateroskleroz patogenezi üzerine etkilerini daha detaylı inceleyecek ve altta yatan moleküler mekanizmaları ortaya koyacak ye

KAYNAKLAR

- Abu-Saleh N, Aviram M, Hayek T. Aqueous or lipid components of atherosclerotic lesion increase macrophage oxidation and lipid accumulation. *Life Sci.* 2016;154:1-14.
- Agrawal I, Sharma N, Saxena S, et al. Protocol for induction and characterization of microglia extracellular traps in murine and human microglia cells. *STAR Protoc.* 2021;2(3):100678.
- Alexander MR, Moehle CW, Johnson JL, et al. Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(1):70-9.
- Alkan FA, Cakmak G, Karis D, et al. The evaluation of plasma viscosity and endothelial dysfunction in smoking individuals. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2014;58(3):403-13.
- Almabrouk TA, Ewart MA, Salt IP, Kennedy S. Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases. *Br J Pharmacol.* 2014;171(3):595-617.
- Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998;101(8):1581-90.
- Ball RY, Stowers EC, Burton JH, Cary NR, Skepper JN, Mitchinson MJ. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis.* 1995;114(1):45-54.
- Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol.* 2002;90:40-8.
- Bockus L, Kim F. Coronary endothelial dysfunction: from pathogenesis to clinical implications. *Open Heart.* 2022;9(2):e002200.
- Bombeli T, Mueller M, Haeberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost.* 1997;77(3):408-23.
- Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(2):168-75.
- Boulanger CM. Secondary endothelial dysfunction: hypertension and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31(1):39-49.
- Brogi E, Winkles JA, Underwood R, Clinton SK, Alberts GF, Libby P. 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):2408-18.
- Brovkovich V, Dobrucki LW, Brovkovich S, et al. Nitric oxide release from normal and dysfunctional endothelium. *J Physiol Pharmacol.* 1999;50(4):575-86.
- Büyüksulu N, Yiğitbaşı T. Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *MÜSBED.* 2015;5(3):197-203.
- Carlson M, Nakamura Y, Payson R, et al. Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pMCT108.2) on chromosome 18 [D18S24]. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(9):4188.

- Chandramohan G, Bai Y, Norris K, Rodriguez-Iturbe B, Vaziri ND. Effects of dietary salt on intrarenal angiotensin system, NAD(P)H oxidase, COX-2, MCP-1 and PAI-1 expressions and NF-kappaB activity in salt-sensitive and -resistant rat kidneys. *Am J Nephrol.* 2008;28(1):158-67.
- Chen Q, Wang Q, Zhu J, Xiao Q, Zhang L. Reactive oxygen species: key regulators in vascular health and diseases. *Br J Pharmacol.* 2018;175(8):1279-92.
- Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P. Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol.* 1992;140(2):301-16.
- Cook-Mills JM. VCAM-1 signals during lymphocyte migration: role of reactive oxygen species. *Mol Immunol.* 2002;39(9):499-508.
- Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, Lincoln TM. Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol.* 1994;267:1405-13.
- Crook MF, Newby AC, Southgate KM. Expression of intercellular adhesion molecules in human saphenous veins: effects of inflammatory cytokines and neointima formation in culture. *Atherosclerosis.* 2000;150(1):33-41.
- Cuzzocrea S, Costantino G, Zingarelli B, Mazzon E, Micali A, Caputi AP. The protective role of endogenous glutathione in carrageenan-induced pleurisy in the rat. *Eur J Pharmacol.* 1999;372(2):187-97.
- Dandona P, Aljada A. Advances in diabetes for the millennium: diabetes and the endothelium. *MedGenMed.* 2004;6(3):6.
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109:27-32.
- Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation.* 2004;109(23):27-32.
- Esper RJ, Nordaby RA, Vilariño JO, Paragano A, Cacharrón JL, Machado RA. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol.* 2006;5:4.
- Faggiotto A, Ross R, Harker L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis.* 1984;4(4):323-40.
- Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8):7-12.
- Fatkhullina AR, Peshkova IO, Koltsova EK. The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis. *Biochemistry (Mosc).* 2016;81(11):1358-70.
- Fitzgibbons TP, Czech MP. Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations. *J Am Heart Assoc.* 2014;3(2):e000582.
- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012;33(7):829-37.
- Förstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5(6):338-49.

- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994;94(6):2493-503.
- Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circ Res*. 2016;118(4):620-36.
- Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2013;22(1):9-15.
- González-Gallego J, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. *Nutr Hosp*. 2007;22(3):287-93.
- Gröschel C, Sasse A, Röhrborn C, et al. T helper cells with specificity for an antigen in cardiomyocytes promote pressure overload-induced progression from hypertrophy to heart failure. *Sci Rep*. 2017;7(1):15998.
- Grymel M, Zawojak M, Adamek J. Triphenylphosphonium Analogues of Betulin and Betulinic Acid with Biological Activity: A Comprehensive Review. *J Nat Prod*. 2019;82(6):1719-30.
- Guyton JR, Klemp KF. Transitional features in human atherosclerosis. Intimal thickening, cholesterol clefts, and cell loss in human aortic fatty streaks. *Am J Pathol*. 1993;143(5):1444-57.
- Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, et al. Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque?. *Prog Cardiovasc Dis*. 2008;51(3):183-94.
- Harańczyk M, Koniecznyńska M, Płazak W. Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea patients. *Sleep Breath*. 2022;26(1):231-42.
- Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T. Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2001;104(22):2673-8.
- Jara LJ, Medina G, Vera-Lastra O, Amigo MC. Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases. *Autoimmun Rev*. 2006;5(3):195-201.
- Jayaraman T, Paget A, Shin YS, et al. TNF-alpha-mediated inflammation in cerebral aneurysms: a potential link to growth and rupture. *Vasc Health Risk Manag*. 2008;4(4):805-17.
- Karabulut H, Gülay MŞ. Serbest radikaller. *MAKÜ Sag Bil Enst Derg*. 2016;4(1): 50-9.
- Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017;19(11):42.
- Katusic ZS. Superoxide anion and endothelial regulation of arterial tone. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(3):443-8.
- Kim KS, Lee DS, Kim DC, et al. Anti-Inflammatory Effects and Mechanisms of Action of Coussaric and Betulinic Acids Isolated from *Diospyros kaki* in Lipopolysaccharide-Stimulated RAW 264.7 Macrophages. *Molecules*. 2016;21(9):1206.
- Klouché M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation*. 2000;101(15):1799-805.

- Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997;79(6):469-83.
- Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?. *Circulation.* 2004;109(21):27-33.
- Lee KW, Lip GY, Tayebjee M, Foster W, Blann AD. Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood.* 2005;105(2):526-32.
- Li H, Förstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol.* 2000;190(3):244-54.
- Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014;237(1):208-19.
- Li N, Gong Z, Li X, et al. Betulinic acid inhibits the migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2019;67:186-93.
- Li Z, Chen J, Lei T, Zhang H. Tamoxifen induces apoptosis of mouse microglia cell line BV-2 cells via both mitochondrial and death receptor pathways. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2012;32(2):221-6.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002;105(9):1135-43.
- Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation.* 2001;104(3):365-72.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420(6917):868-74.
- Lijnen HR, Collen D. Endothelium in hemostasis and thrombosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 1997;39(4):343-50.
- Lim S, Park S. Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. *BMB Rep.* 2014;47(1):1-7.
- Lou H, Li H, Zhang S, Lu H, Chen Q. A Review on Preparation of Betulinic Acid and Its Biological Activities. *Molecules.* 2021;26(18):5583.
- Martinod K, Wagner DD. Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood.* 2014;123(18):2768-76.
- Matthay MA. Severe sepsis--a new treatment with both anticoagulant and antiinflammatory properties. *N Engl J Med.* 2001;344(10):759-62.
- Mayerl C, Lukasser M, Sedivy R, Niederegger H, Seiler R, Wick G. Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. *Virchows Arch.* 2006;449(1):96-103.
- Meira CS, Espírito Santo RFD, Dos Santos TB, et al. Betulinic acid derivative BA5, a dual NF-kB/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity. *Eur J Pharmacol.* 2017;815:156-65.
- Meira CS, Espírito Santo RFD, Dos Santos TB, et al. Betulinic acid derivative BA5, a dual NF-kB/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity. *Eur J Pharmacol.* 2017;815:156-65.

Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis*. 1984;4(4):357-64.

Moulton KS, Heller E, Konerding MA, Flynn E, Palinski W, Folkman J. Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 1999;99(13):1726-32.

Münzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Ann Med*. 2008;40(3):180-96.

Nakashima Y, Chen YX, Kinukawa N, Sueishi K. Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. *Virchows Arch*. 2002;441(3):279-88.

Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. 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):842-51.

Navab M, Hama SY, Hough GP, et al. High density associated enzymes: their role in vascular biology. *Curr Opin Lipidol*. 1998;9(5):449-56.

Olin-Lewis K, Krauss RM, La Belle M, et al. ApoC-III content of apoB-containing lipoproteins is associated with binding to the vascular proteoglycan biglycan. *J Lipid Res*. 2002;43(11):1969-77.

Onat A, Karakoyun S, Akbaş T, et al. Turkish Adult Risk Factor survey 2014: Overall mortality and coronary disease incidence in Turkey's geographic regions. *Turk Kardiyol Dern Ars*. 2015;43(4):326-32.

Ou Z, Zhao J, Zhu L, et al. Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Biomed Pharmacother*. 2019;118:109347.

Park JY, Pillinger MH, Abramson SB. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: the role of PGE2 synthases. *Clin Immunol*. 2006;119(3):229-40.

Pober JS, Gimbrone MA Jr, Lapierre LA, et al. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*. 1986;137(6):1893-6.

Preiss DJ, Sattar N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis?. *Int J Clin Pract*. 2007;61(4):697-701.68. Martinez-Lemus LA. The dynamic structure of arterioles. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012;110(1):5-11.

Puddu P, Puddu GM, Zaca F, Muscari A. Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol*. 2000;55(4):221-32.

Puranik R, Celermajer DS. Smoking and endothelial function. *Prog Cardiovasc Dis*. 2003;45(6):443-58.

Rajavashisth T, Qiao JH, Tripathi S, et al. Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor- deficient mice. *J Clin Invest*. 1998;101(12):2702-10.

Ritchie SA, Connell JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17(4):319-26.

- Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med*. 1976;295(8):420-5.
- Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-9.
- Ryu SY, Oak MH, Yoon SK, et al. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris*. *Planta Med*. 2000;66(4):358-60.
- Sampath R, Kukiela GL, Smith CW, Eskin SG, McIntire LV. 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):247-56.
- Sarén P, Welgus HG, Kovanen PT. TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol*. 1996;157(9):4159-65.
- Sarma JV, Ward PA. Oxidants and redox signaling in acute lung injury. *Compr Physiol*. 2011;1(3):1365-81.
- Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target?. *Nutrients*. 2019;11(9):2090.
- Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc*. 2010;69(3):273-8.
- Shaito A, Aramouni K, Assaf R, et al. Oxidative Stress-Induced Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2022;27(3):105.
- Sharma JN, Al-Omran A, Parvathy SS. Role of nitric oxide in inflammatory diseases. *Inflammopharmacology*. 2007;15(6):252-9.
- Shen J, Cheng J, Zhu S, et al. Regulating effect of baicalin on IKK/I κ B/NF- κ B signaling pathway and apoptosis-related proteins in rats with ulcerative colitis. *Int Immunopharmacol*. 2019;73:193-200.
- Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-3.
- Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS. Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. *Exp Clin Cardiol*. 2002;7(1):40-53.
- Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev*. 2010;9(12):830-4.
- Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. 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):8264-8.
- Soleimani F, Dobaradaran S, De-la-Torre GE, Schmidt TC, Saeedi R. Content of toxic components of cigarette, cigarette smoke vs cigarette butts: A comprehensive systematic review. *Sci Total Environ*. 2022;813:152667.
- Spillmann F, Van Linthout S, Miteva K, et al. LXR agonism improves TNF- α -induced endothelial dysfunction in the absence of its cholesterol-modulating effects. *Atherosclerosis*. 2014;232(1):1-9.

- Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2009;78(6):539-52.
- Springer TA. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:827-72.
- Sary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, 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):120-34.
- Sary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1994;89(5):2462-78.
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med.* 1989;320(14):915-24.
- Sugiyama S, Okada Y, Sukhova GK, Virmani R, Heinecke JW, Libby P. Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. *Am J Pathol.* 2001;158(3):879-91.
- Sukhova GK, Schönbeck U, Rabkin E, et al. Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. *Circulation.* 1999;99(19):2503-9.
- Sukhovshin RA, Yepuri G, Ghebremariam YT. Endothelium-Derived Nitric Oxide as an Antiatherogenic Mechanism: Implications for Therapy. *Methodist Deakey Cardiovasc J.* 2015;11(3):166-71.
- Szmitko PE, Wang CH, Weisel RD, de Almeida JR, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. *Circulation.* 2003;108(16):1917-23.
- Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis.* 2016;109(12):708-15.
- Tanaka J, Toku K, Matsuda S, et al. Induction of resting microglia in culture medium devoid of glycine and serine. *Glia.* 1998;24(2):198-215.
- Thålin C, Hisada Y, Lundström S, Mackman N, Wallén H. Neutrophil Extracellular Traps: *Thromb Vasc Biol.* 2019;39(9):1724-38.
- Tokgözoğlu L. Dyslipidemia, atherosclerosis, and vulnerable plaques: the effect of atorvastatin on atherosclerosis and plaque structure. *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2009;37(S2):11-6.
- Tomasoni L, Sitia S, Borghi C, et al. Effects of treatment strategy on endothelial function. *Autoimmun Rev.* 2010;9(12):840-4.
- Tommasi S, Carluccio E, Bentivoglio M, et al. C-reactive protein as a marker for cardiac ischemic events in the year after a first, uncomplicated myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 1999;83(12):1595-9.

- Tsai JC, Peng WH, Chiu TH, Lai SC, Lee CY. Anti-inflammatory effects of *Scoparia dulcis* L. and betulinic acid. *Am J Chin Med*. 2011;39(5):943-56.
- Tsao PS, Wang B, Buitrago R, Shyy JY, Cooke JP. Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. *Circulation*. 1997;96(3):934-40.
- Tuñón MJ, García-Mediavilla MV, Sánchez-Campos S, González-Gallego J. Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Curr Drug Metab*. 2009;10(3):256-71.
- Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS. Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J Biomed Sci*. 2012;19(1):22
- Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler*
- Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the unstable plaque. *Prog Cardiovasc Dis*. 2002;44(5):349-56.
- Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol*. 2009;50(5):402-9.
- Wang L, Cheng CK, Yi M, Lui KO, Huang Y. Targeting endothelial dysfunction and inflammation. *J Mol Cell Cardiol*. 2022;168:58-67.
- Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15(5):551-61.
- Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu Rev Med*. 1996;47:315-31.
- Wu TC, Chen YH, Leu HB, et al. Carvedilol, a pharmacological antioxidant, inhibits neointimal matrix metalloproteinase-2 and -9 in experimental atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2007;43(11):1508-22.
- Ye J, Li L, Wang M, et al. Diabetes Mellitus Promotes the Development of Atherosclerosis: The Role of NLRP3. *Front Immunol*. 2022;13:900254.
- Yoon JJ, Lee YJ, Kim JS, Kang DG, Lee HS. Protective role of betulinic acid on TNF- α -induced cell adhesion molecules in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(1):96-101.
- Zhong X, Li X, Liu F, Tan H, Shang D. Omentin inhibits TNF- α -induced expression of adhesion molecules in endothelial cells via ERK/NF- κ B pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;425(2):401-6.
- Zhong Y, Liang N, Liu Y, Cheng MS. Recent progress on betulinic acid and its derivatives as antitumor agents: a mini review. *Chin J Nat Med*. 2021;19(9):641-7.
- Zhou MS, Schulman IH, Raij L. Vascular inflammation, insulin resistance, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension: role of nuclear factor kappa B activation. *J Hypertens*. 2010;28(3):527-35.
- Zusso M, Lunardi V, Franceschini D, et al. Ciprofloxacin and levofloxacin attenuate microglia inflammatory response via TLR4/NF- κ B pathway. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):148.