



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL HİPERLİPİDEMİDE KAN DOKU FAKTÖRÜ,
LİPİD PEROKSİDASYON ÜRÜNLERİ ve SİYALİK ASİT
İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

N. BENUN KILIÇ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. NESRİN EMEKLİ

İSTANBUL - 2011

İBEBYAN

TEZ ONAYI

ÖRNEK

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()

Anabilim Dalı : *Ercelik Fak. Biyokimya Ana Bilim Dalı*

Tez Sahibi : *Narlı Benur Kılıç*

Tez Başlığı : *Deneyel Hiperlipidemide kan dokü faktör, lipid peroksidasyon ürünleri ve Sialik asit değerlerinin incelenmesi.*

Sınav Yeri : *M.Ü. Dışlek. Fak. Biyokimya Bölüm Dalı*

Sınav Tarihi : *22.12.2011*

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Nesrin Emekli

Kurumu

*M. Ü.
Dışlek. Fakültesi*

İmza

[İmza]

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan,

Adı, Soyadı)

Prof. Dr. Erol Hoca

*İ.Ü. Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi*

Prof. Dr. İhsan Yayımlı Ertaç

İ.Ü. DETAM

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun *12/01/2012* tarih ve *11* sayılı kararı ile onaylanmıştır.

[İmza]
Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

I.BEYAN

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

Tarih

N. Benun KILIÇ

İmza

II. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamın her kademesini büyük bir özveri ile takip eden, bilgi ve deneyimlerinden devamlı olarak yararlandığım, Danışmanım Marmara Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyokimya Bilim Dalı Başkanı Sayın Hocam **Prof. Dr. Nesrin Emekli**'nin, çalışmam süresince büyük yardım, ilgi ve desteğini gördüm. Onun teşviki ve yönlendirmesi olmasaydı bu çalışmayı sonuçlandıramazdım. Kendisine şükranlarım sürekli ve kalıcı olacaktır.

Çalışmamın laboratuvar deneylerini M.Ü. Diş hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Biyokimya Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirdim. Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım ve bu çalışmalarım sırasında her türlü bilgi destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Ayşen Yarat'a,

Doç. Dr. Ebru Işık Alturfan'a, Dr. Leyla Koç Öztürk'e ve çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Şehkar Nihal Oktay'a ve Ali Şahin'e,

M.Ü. Haydarpaşa Kampüsünde deney hayvanlarımızın bakımında Veteriner Hekim Dilek Özbeyli'ye, tezin basım aşamasındaki yardımlarından dolayı Biyolog arkadaşım İsmail Şekerci'ye ve Biltek Copy'e,

Yüksek Lisans çalışmalarımı içtenlikle destekleyen maddi ve manevi gücüyle her zaman yanımda olan aileme, *anneme*, en içten teşekkürlerimi sunarım.

N. Benun KILIÇ

III.İÇİNDEKİLER

Sayfa No

I.BEYAN	ii
II.TEŞEKKÜR	iv
III.İÇİNDEKİLER.....	v
IV.TABLO LİSTESİ.....	viii
V.ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
VI.KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Doku Faktörü	6
2.1.1. Doku Faktörünün Dünü Bugünü	6
2.1.2. Doku Faktörünün Bulunduğu Yerler ve Moleküler Yapısı	7
2.1.3. Doku Faktörünün Hemostazdaki Rolü	10
2.1.4. Doku Faktörünün Trombofilideki Rolü.....	10
2.1.5. Doku Faktörü İnhibitörü	11
2.1.6. Doku Faktörü İnflamasyon ve Sitokin İlişkisi.....	12
2.1.7. Doku Faktörünün Sinyal İletiminde Rolü.....	15
2.1.8. Doku Faktörünün Genetiği	16
2.2. Koroner Arter Hastalığı ve Doku faktörü.....	16
2.3. Koroner Arter Hastalıklarında Risk Faktörleri	20
2.4. Koroner Arter Hastalıklarında Hemostazın Yeri.....	21
2.5. Hemostatik Sistem.....	22
2.5.1. Damar sistemi	24
2.5.1.1. Damar Endoteli ve Özellikleri	25
2.5.1.2. Normal ve Aterosklerotik Endotel	27
2.5.2. Hemostatik Sistemde Trombositler	30
Trombosit Agregasyonu	37
2.5.3. Hemostatik Sistemde Pıhtılaşma Proteinleri	41
2.5.4. Fibrinolitik Sistem	44
2.6. Hiperlipidemi.....	45
2.6.1. Primer Hiperlipidemi	45

2.6.2. Sekonder Hiperlipidemi.....	45
2.6.3. Deneysel Hiperlipidemi.....	45
2.7. Apolipoproteinler.....	46
2.8. Karaciğer ve Yağ dokusu.....	50
2.9. Lipid Peroksidasyonu ve Ateroskleroz.....	51
2.10. Antioksidan Sistemler.....	53
2.11. Sialik Asid ve Doku Faktörü.....	54
3. METOD VE MATERYAL.....	55
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	55
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	55
3.3. Kullanılan Deneysel Hayvanları ve Oluşturulan Gruplar.....	55
3.4. Deneysel Hayvanlarının Beslenmeleri.....	56
3.5. Hiperlipidemi Oluşturulması ve Apo-B Konjugatı Verilmesi.....	56
3.6. Kan ve Doku Örneklerinin Alınması ve İncelenen Parametreler.....	57
3.7. Serumda Total Lipid Tayini.....	57
3.7.1. Deneysel prensibi.....	57
3.7.2. Kullanılan çözeltiler.....	57
3.7.3. Deneysel yapılışı.....	58
3.8. Serumda Total Kolesterol Tayini.....	58
3.8.1. Deneysel prensibi.....	58
3.8.2. Kullanılan çözeltiler.....	59
3.8.3. Deneysel yapılışı.....	59
3.9. Serumda LDL Kolesterol Tayini.....	60
3.9.1. Deneysel prensibi.....	60
3.9.2. Kullanılan çözeltiler.....	60
3.9.3. Deneysel yapılışı.....	61
3.10. Elisa Yöntemi ile Doku Faktörü Tayini.....	61
3.10.1. Deneysel prensibi.....	61
3.10.2. Kullanılan çözeltiler.....	62
3.10.3. Deneysel yapılışı.....	63
3.11. Karaciğer Homojenatında Doku Faktörü Aktivitesi Tayini.....	64
3.11.1. Deneysel prensibi.....	64
3.11.2. Kullanılan çözeltiler.....	64
3.11.3. Deneysel yapılışı.....	64

3.12.Karaciğer Homojenatında Glutasyon(GSH) Tayini	65
3.12.1. Deneyin prensibi	65
3.12.2. Kullanılan çözeltiler.....	65
3.12.3. Deneyin yapılışı	65
3.13.Karaciğer Homojenatında Lipid Peroksidasyon (LPO) Tayini.....	66
3.13.1. Deneyin prensibi	66
3.13.2. Kullanılan çözeltiler.....	66
3.13.3. Deneyin yapılışı	67
3.14.Karaciğer Homojenatında Sialik Asid Tayini	67
3.14.1. Deneyin prensibi	67
3.14.2. Kullanılan çözeltiler.....	67
3.14.3. Deneyin yapılışı	68
4. BULGULAR	70
4.1. Çeşitli Grupların Lipid Göstergelerinin Sonuçları	70
4.1.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması.....	71
4.1.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması	72
4.2. Elisa Yöntemi ile Serum TF Sonuçları.....	73
4.2.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Serum TF Değerlerinin Karşılaştırılması	73
4.2.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması	74
4.3. Karaciğer Dokusunda Doku Faktörü Aktivitesi Sonuçları.....	75
4.3.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması.....	75
4.3.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması	76
4.4. Karaciğer Homojenatında Glutasyon ve Lipid Peroksidasyon Sonuçları.....	77
4.4.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması.....	77
4.4.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması	78
4.5. Karaciğer Homojenatında Sialik Asid Sonuçları.....	79
4.5.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması.....	79
4.5.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması	80
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	81
6. KAYNAKLAR.....	92
7. ETİK KURUL ONAYI	102
8. ÖZGEÇMİŞ	103

IV.TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Çeşitli Dokularda TF Ekspresyonu.....	8
Tablo 2: Bazı Hücrelerde TF Sentezini Aktifleştiren ve İnhibe Eden Moleküller....	18
Tablo 3: Normal ve Fonksiyonları Bozulmuş Damar Endotelinin Özellikleri	30
Tablo 4: Pıhtılaşma Faktörlerinin Bazı Özellikleri	44
Tablo 5: İnsan Plazması Lipoproteinlerinin Apolipoproteinleri	47
Tablo 6: Laboratuvar şartlarında hazırlanan yemlerin içeriği.....	56
Tablo 7: Serumda Lipid Göstergelerinin Sonuçları	70
Tablo 8: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Lipid Parametre Değerleri	71
Tablo 9: Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Lipid Parametre Değerleri.....	72
Tablo 10: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Serum TF Değerleri	73
Tablo 11: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Serum TF Değerleri.....	74
Tablo 12: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karaciğer Homojenatında TF Aktivitesi Değerleri	75
Tablo 13: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karaciğer Homojenatında TF Aktivitesi Değerleri	76
Tablo 14: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların GSH ve LPO Değerleri.....	77
Tablo 15: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların GSH ve LPO Değerleri	78
Tablo 16: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Sialik Asid Değerleri	79
Tablo 17: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Sialik Asid Değerleri.....	80

V.ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: TF' nin Pıhtılaşma Faktörleri İle Etkileşimi ve TFPI Tarafından Bu Etkilerin Kontrol Altında Tutulması.....	12
Şekil 2: Koagulyasyonda TF ve Sitokin İlişkisi.....	13
Şekil 3: Doku Faktörünün Aterosklerotik Plak İçinde Görünüşü.....	16
Şekil 4: Tavşan Karotid Arterlerinde TF Ekspresyonu ve Trombus Oluşumu ve Hirudinin Trombus Oluşumuna Etkisi	19
Şekil 5: Endotelin Tromborezistans Özelliklerine Bazı Örnekler.	23
Şekil 6: Arter (A) ve Ven (B) Kesitinde Damar Katmanlarının Şematik Görünümü. ...	25
Şekil 7: Damar Endotelinden Salınan Bazı Moleküller	26
Şekil 8: Trombositlerin Aktivasyonunun Şematik Görünümü.	32
Şekil 9: Çeşitli Uyarıcılarla Trombosit Granül İçeriklerinin Aspirin ve GRPB İle İnhibisyonu	35
Şekil 10: Uyarıdan Sonra Membran Fosfolipidlerinden Araşidonik Asit ve Prostaglandinlerin Meydana Gelişi ve Aspirinin İnhibisyonu.....	36
Şekil 11: Trombosit Agregasyonu Oluşumunda Gerçekleşen Olaylar ve Işık Geçirgenliği Doğrultusunda Agregasyonun Kademeli Şekilde Oluşumu	40
Şekil 12: İntrensek ve Ekstrensek Pıhtılaşma Mekanizması.....	43
Şekil 13: Apoproteinlerin Değişik Lipoproteinlerdeki Dağılımı	49
Şekil 14: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Lipid Parametrelerinin Karşılaştırılması	71
Şekil 15: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Lipid Parametrelerinin Karşılaştırılması	72
Şekil 16: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Serum TF değerlerinin Karşılaştırılması .	73
Şekil 17: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Serum TF Değerlerinin Karşılaştırılması .	74
Şekil 18: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karaciğer Homojenatındaki TF Aktivitesi Değerlerinin Karşılaştırılması	75
Şekil 19: Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karaciğer Homojenatındaki TF Aktivitesi Değerlerinin Karşılaştırılması	76

Şekil 20: Kontrol ve Hiperlipidemik Gruplarının GSH ve LPO Değerlerinin Karşılaştırılması	77
Şekil 21: Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının GSH ve LPO Değerlerinin Karşılaştırılması	78
Şekil 22: Kontrol ve Hiperlipidemik Gruplarının Sialik Asid Değerlerinin Karşılaştırılması	79
Şekil 23: Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Sialik Asid Değerlerinin Karşılaştırılması	80

VI.KISALTMALAR

Apo-B	: Apolipoprotein B-100
CVH	: Kardiyo Vasküler Hastalıklar
CETP	: Kolesterol Ester Transfer Proteini
CRP	: C- Reaktif Protein
ECM	: Ekstra Sellüler Matriks
EDRF	: Endotelden Türeyen Reaktif Faktör
GSH	: Glutasyon
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
ICAM	: Hücre İçi Adhezyon Molekül
IL	: İnterlökin
INF	: İnterferon
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
LCAT	: Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LPO	: Lipid Peroksidasyon
MDA	: Malondialdehit
MI	: Miyokard İnfarktüsü
NAD	: Nikotinamid Adenin Dinukleotid
NOS	: Nitrik Oksid Sentaz
Ox-LDL	: Oksidlenmiş Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
PAI	: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü
PDGF	: Trombosit Bağımlı Büyüme Faktörü
PG	: Proteoglikan
SMC	: Düz Kas Hücreleri
SOD	: Süper Oksid Dismutaz
TF	: Doku Faktörü
TFI	: Doku Faktörü Yolu İnhibitörü
TM	: Trombomodulin
TXA	: Trombaksan
VLDL	: Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
VCAM	: Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü
vWF	: von Willebrand Factor

1. ÖZET

Deneyisel Hiperlipidemide Kan Doku Faktörü, Lipid Peroksidasyon Ürünleri ve Sialik Asid İlişkisinin Değerlendirilmesi

Aterosklerozun gelişmesinde hiperlipidemi ve hiperkoagulasyon önemli yer tutar. Özellikle içinde bol miktarda Apo B-100 bulunduran LDL-C aterom plakları içinde görülmektedir. Bu çalışmada deneyisel Apo B-100 konjugatı ilaveli ve ilavesiz deneyisel hiperlipidemi yapıldı. Çalışmada 24 adet C57BL/6 türü fare kullanıldı. Deney hayvanları her biri 8 adet olmak üzere 3 gruba ayrıldı. 1-Kontrol grubu (n=8), 2-Hiperlipidemi grubu (n=8), 3-Hiperlipidemi + Apo B grubu. 2 ay sonunda sakrifiye edilen hayvanların rutin lipid parametreleri, kanda ve karaciğer dokusunda doku faktörü (TF) miktarı ve aktivitesi, Glutasyon (GSH), Lipidperoksidaz (LPO) ve sialik asid değerleri ölçüldü. Lipid parametreleri ticari kit ile, kandaki TF Elisa yöntemi ile, karaciğer dokusunda tromboplastik aktivite Quick metodu ile, Glutasyon (GSH), Lipidperoksidaz (LPO) ve sialik asid sırasıyla, Edman, MDA-tiyobarbitürük asid, Waren yöntemi ile ölçüldü.

Total lipid, Kolesterol, LDL-C değerleri kontrol grubuna göre hiperlipidemik grupta anlamlı olarak arttı, LDL-C değeri Apo-B konjugatı ilave edilen grupta azalırken, total lipid ve total kolesterol değerleri arttı. Kandaki TF değerleri anlamlı bir artış gösterdi, Apo B konjugatı verilen grupta kandaki TF sonuçları değişmedi. TF aktivitesi karaciğer homojenatında hiperlipidemik grupta hızlandı, Apo B verilen grupta sonuç değişmedi. Karaciğer homojenatında lipid peroksidasyon ürünleri hiperlipidemik grupta arttı, Apo B konjugatı ile GSH artarken, LPO 'da değişmedi. Karaciğer homojenatında sialik asid hiperlipidemik grupta arttı, Apo B konjugatı verilen grupta sonuçlar değişmedi.

Anahtar Kelimeler: Hiperlipidemi, doku faktörü, Apo B-100, lipid peroksidasyonu, sialik asid.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından **SAG-C-YLP-310510-0176** No'lu proje ile desteklenmiştir.

2.SUMMARY

Investigation of the blood tissue factor, lipid peroxidation products and sialic acid in experimental hyperlipidemia.

Hyperlipidemi and hypercoagulation are the major risk factor in atherosclerotic events. Low density lipoproteins (LDLs) are the main source of lipids in the athresclerotic plaques within the foam cells. Apoprotein B-100 (Apo-B) is the main protein in the LDL- cholesterol (LDL-C). 24 C57BL/6 mice were enrolled into the study. Mice were divided into three groups. Control group (n=8), hyperlipidemic group (n=8), hyperlipidemic + Apo-B group. Mice were sacrificed at the end of two months. Blood samples and liver tissues were taken for routine blood lipid parameters, TF in the blood.and in the liver tissues, lipid peroxidation products and sialic acid in the liver tissues. Serum lipid parameters were determined by using commercial kits. Blood TF values were determined by Elisa. Liver TF activities were measured by Quick method. Glutation (GSH), lipid peroxidation (LPO) and sialic acid of the liver homogenates were determined by using Elman, MDA-tiobarbitürük asid and Warren methods respectively.

Serum levels of total lipid, cholesterol, LDL-C were significantly increased in hyperlipidemic group, LDL-C significantly decreased in both Apo-B and LDL conjugate given hyperlipidemic groups. Serum TF increased significantly in short term hyperlipidemia, TF activities in the liver homogenate also increased significantly. There was no effect Apo - B conjugates on TF values in blood and liver homogenate. Lipid peroxidation in short term hyperlipidemia significanly increased in liver homogenates. Apo-B conjugates affected this increased differently sialic acid values also increased in short term induced hyperlipidemia, there was no effect of Apo-B conjugates on sialic acid values.

Key words: Hyperlipidemia, tissue factor, Apo B-100, lipid peroxidation, sialic acid.

This study was supported by Marmara University Scientific Research Projects Commission, **Project No. SAG-YLP-310510-0176**

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Geçmiş antik çağlara kadar uzanan aterosklerozla ilgili pek çok hipotezler ileri sürülmüştür (1,2,3). Bu hipotezlerin içinde koagulasyon ve damar endotelindeki lipid birikimleri hep yer almıştır (4,5,6). Günümüzde arteryal tromboembolizmin gelişiminde inflamasyon ön plana çıkarılmıştır (7,8). Fakat koagulasyon inflamasyon ilişkisi nedeniyle hemostatik sistem, arteryal tromboembolizmin patogenezinde hiç ayrı düşünülmemiştir (9,10,11,12).

Koagulasyon mekanizması; negatif ve pozitif feedback reaksiyonları, multienzim sistemleri, humoral ve hücrel prokoagulant ve antikoagulantları içinde barındıran kompleks bir reaksiyon dizisidir. Günümüzde hayati organları tehdit eden arteryal tromboembolizmin başlıca sorumlusu olarak kabul edilen koagulasyon inflamasyon olaylarında, ekstrinsek ve intrinsek koagulasyon mekanizmasının tetikleyicisi durumunda olan doku faktörü önemli bir yer tutar (10,11,12).

Doku faktörü ile ilgili çalışmalar 1800' lü yıllarda başlamış günümüzde ise, bu membran proteinin pek çok metabolik faaliyet içinde olduğu vurgulanmıştır (13-16). 1886 yılında Wooldridge kanda bulunmayan fakat dokuda bulunan bir maddenin pıhtılaşmayı hızlandığını bildirmiş (3) ve bu doku homojenatları çok dilüe olarak dahi hayvanlara zerkedildiğinde ani ölümlerin görülmesi (17), dokuda pıhtı oluşturan çok güçlü bir ajan olduğu fikrinin ortaya atılmasına neden olmuştur (18). Bu düşüncelerden hareketle günümüze gelen çalışmalar CD142 olarak da isimlendirilen doku faktörünün kanda da bulunduğunu, çok yönlü fonksiyon yaptığını, sitokinlerle ilişkili oldukları için inflamasyonun da tetiklendiğini, ya da artan sitokinlerin doku faktörünü etkileyerek trombus oluşumunu hızlandığını bildirmektedir (18,19,20,21).

Ateroskleroz ve kalp damar hastalıklarının patogenezinde lipidler önemli bir risk faktörüdür. Çünkü aterom plaklarındaki makrofajların lipid yüklü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu hücreler köpük hücreleri olarak anılır. Histokimyasal boyalarla aterom plaklarında doku faktörünün arttığı da günümüzün bulguları arasındadır (7,10).

Aterom plaklarında proinflamatuvar sitokinlerin varlığı, gözleri ateroskleroz ve inflamasyon konularına çevirmiştir. Bu noktadan bakıldığında doku faktörü acaba bir proinflamatuvar ajan mı? sorusu gündeme gelmiş ve araştırmacılar doku faktörünün proinflamatuvar sitokinlerle ilişkisini incelemeye başlamışlardır (22).

Kanın içinde dolandığı endotel hücreleri koagülasyon ve inflamasyon arasında ortak bir noktadır. İnflamasyon esnasında hasar görmüş endotel, hem koagülasyonla hem de inflamasyonla ilgili proteinleri harekete geçirir. Doku faktörü, trombin, trombositler, sitokinler, kemotaksisle ilgili proteinler, adezyon molekülleri, trombomodilin, protein C, hem koagülasyon hem de inflamasyonun içinde yer alan moleküllerdir. Burada doku faktörü hem arteryal tromboemliizm oluşumunda, hem de sinyal iletim sisteminde yer aldığı için başlıca rolü oynar.

Yüksek kolesterol içeren diyetle beslenen tavşanlarda gelişen aterosklerozun erken safhalarından itibaren T lenfositlere rastlanmıştır (23).

Burada önemli olan zincirin üçüncü halkası olarak kabul edebileceğimiz lipid birikiminin nasıl meydana geldiği koagülasyon, inflamasyon ile ilişkisinin nasıl olduğunun anlaşılmasıdır.

Dolaşımında bulunan, ya da lokal olarak endotelde bulunan endotoksinlerin doku faktörü ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (24). Bokarewa ve ark (22) doku faktörünün güçlü bir inflamatojenik ajan olduğu bunu da, monosit ve içindeki kemokinleri salgılatarak yaptığını bildirmişlerdir. Damar endotelinde gerçekleşen bu olaylar endotel disfonksiyonuna neden olacaktır. Bu istenmeyen olaylar esnasında damar içinde oksidatif stresin de gelişmesi mümkündür. Bütün bu gelişmeler kandaki kolesterolün oksidasyonuna ve oksidlenmiş kolesterolün de bozulmuş endotelden kolayca endotelin altına kaçması ve aterosklerotik plağın oluşumunun hızlanmasının mümkün olacağı günümüzün üzerinde durduğu konuları arasındadır.

Lipid peroksidasyonu hücre gelişmesi esnasında kaçınılmaz bir süreçtir (6,7,25). Burada önemli olan oksidatif stresin artmaması, arttığında hücrenin antioksidatif savunma sisteminin iyi çalışması ya da çalışmasının çeşitli metabolik değişimlerle engellenmesidir. Bu denge olumsuz yönde ilerlediğinde, istenmeyen lipid

peroksidasyon ürünleri ve protein modifikasyonu meydana gelir (26). Bu ürünler ateroskleroz patogenezinde önemlidir. Çünkü peroksidasyon ürünlerinin neden olduğu serbest radikaller doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girer. Bu etki en fazla kolesterol taşıyan ve Apo B içeren LDL kolesterolde görülür. LDL içindeki yağ asitlerinin oksidasyonu ile reaktif aldehidler meydana gelir. Bu reaktif moleküller proteinlerin de modifiye olmasına neden olur. Oksidasyonu yapan iki önemli aldehitten biri malondialdehid (MDA). Bu aldehidler proteinlerle kovalent bağ oluşturur. Hayvan hücrelerinde T hücrelerinin de MDA tarafından aktive edildiği görülmüştür (27). Bu bilgilerden T hücre aracılığı ile meydana gelen inflamasyon reaksiyonları için antijenin oksidasyonla meydana gelen aldehidler olduğu anlaşılmaktadır. MDA'nın oluşturduğu antijenle aktive edilen T hücreleri, aterosklerotik lezyonda inflamasyona cevap olacak şekilde aktive edilir. Serbest radikallerle kolayca okside olan LDL partikülleri, normal LDL'lerin aksine, monosit/makrofajlardaki çöpcü reseptörleri ile kontrolsüz bir şekilde toplanır, endotelin altında köpük hücrelerini oluşturur. Aterom plağının başlangıcını teşkil eden, yağlı çizgi olarak isimlendirilen, bu durum hücre proliferasyonuna, ekstraselüler komponentlerin açığa çıkmasına, damar duvarında inflamatuvar cevabın başlamasına neden olur. Daha ileri safhalarda stenoz başlar, kan akımı yavaşlar, böyle bir durumda trombofili gelişmesi ve infarktüs kaçınılmaz olur (6,7,28,29,30).

Hayvanları yüksek dozda kolesterol ile besleyerek yapılan hiperlipidemi insandaki ateroskleroza anlamak için yapılan iyi bir modeldir. Kolesterol artışı ile kalp damar hastalıkları riskinin arttığı günümüzde artık iyi bilinen bir konudur.

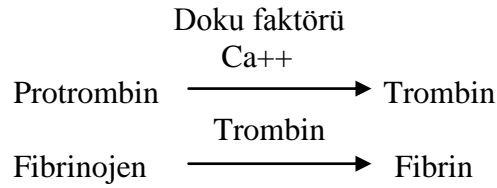
Biz bu bilgilerden hareketle, kısa süreli hiperlipidemi yapılan ve ateroskleroza meyilli olduğu bilinen C57BL/6 tipi farelerin kanlarında kısa süre içinde TF miktar ve aktivitesinde, lipid peroksidasyon ürünlerinde bir değişim olup olmayacağını, aterosklerozdan sorumlu tutulan LDL kolesterolün içeriğini dolduran Apo B konjugatları enjekte edilen hayvanlarda, incelediğimiz parametrelerin bir değişim gösterip göstermeyeceğini inceledik. Son yıllarda koroner arter hastalığı olanlarda önemli olduğu bildirilen siyalik asidin bu sürece nasıl etkileyeceğini de çalışmamız kapsamına alarak bu noktada literatüre katkıda bulunmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DOKU FAKTÖRÜ

2.1.1. Doku Faktörünün Dünü Bugünü

Doku homojenatlarının kan pıhtılaşmasını hızlandırması araştırmacıların uzun yıllardan beri dikkatini çekmeye başlamış ve dokulardaki bu etkin madde doku faktörü olarak isimlendirilmiştir. Doku faktörü hemostatik sistemin fizyolojik tetikleyicisidir. Pıhtılaşma sisteminin bugünkü akış şeması, 1960' lı yıllarda pıhtılaşma bozukluğu olan hastalar nedeniyle şekillendiği için, 1900' lü yılların başından itibaren pıhtılaşma sistemindeki gelişmeler doku faktörü yani ekstrenek sistem merkezli olmuştur. Çünkü Alexander Schmidt 1800' lü yılların sonunda kandaki pıhtıyı (fibrin) oluşturan maddenin dokudan kaynaklandığını hayvan deneylerine dayanarak ileri sürmüştür. Bu bilgilerden yararlanan Morawitz 1905 yılında, doku faktörünün başlattığı fibrin oluşumunu aşağıda görüldüğü şekilde iki reaksiyonla göstermiştir (3).



1935 yılında Quick; doku faktörünü kullanarak halen günümüzün en çok kullanılan, kendi adı ile anılan, protrombin zamanı (PT) testini keşfetmiştir (3).

Bu tarihsel gelişim içinde doku faktörü; trombokinaz, tromboplastik aktivite olarak anılmıştır (14). 1960' lı yıllarda bugünkü pıhtılaşma sisteminde yer alan proteinler ve kofaktörler bulunuş sırasına göre numaralandırılmıştır. Bu numaralamada doku faktörü üçüncü sırada yer almış ve Faktör III olarak isimlendirilmiştir.

Emekli ve Ulutin (17) tavşan beyninden elde ettikleri doku faktörü ile oluşturdukları yaygın damar içi pıhtılaşmasında Protein C' nin etkisini gösterdiler.

Tunalı ve Yarat (15) çeşitli dokulardan elde ettikleri doku faktörü ile oluşturdukları yaygın damar içi pıhtılaşmasında bazı ilaçların etkisini incelediler.

Günümüzün modern teknolojisi ile molekül yapısı ve fonksiyonları daha iyi tanımlanan doku faktörü CD 142 olarak da bilinir. Geçmiş yıllarda doku faktörünün kanda bulunmasını düşünmek bile yanlış olurdu. Çünkü beyin gibi doku faktörü yönünden zengin dokulardan elde edilen doku faktörünün çok az miktarları bile yaygın damar içi pıhtılaşması için yeterli olmaktadır. Doku faktörü in vitro çalışmalarda Quick yöntemiyle PT ölçümünde kullanıldığı için ekstrinsek sistemin faktörü olarak bilinir. Günümüzde doku faktörünün hem ekstrinsek, hem de intrinsek pıhtılaşmayı başlatan ve kanda ölçülebilen miktarlarda bulunan bir molekül olduğu, ayrıca sinyal iletiminde etkin olduğu bildirilmiştir. Aşağıda bu özelliklerinden söz edilmektedir.

2.1.2. Doku Faktörünün Bulunduğu Yerler ve Moleküler Yapısı

Hücrede transmembran protein olarak yer alan doku faktörünün bulunış yerleri devamlı çalışma ve tartışma konusu olmuştur. Önceki yıllarda doku faktörünün sadece ekstravasküler dokularda makrofajlar, monositler ve fibroblastlar tarafından eksprese edildiği kabul edilmekteydi. Daha sonraki çalışmalar dokuların farklı bölgelerinde doku faktörü ekspresyonunun olduğunu göstermiştir. Drake ve ark (31) tarafından yayınlanan bir çalışmaya göre, çeşitli dokuların doku faktörü aktivitesi dağılımları tablodaki gibidir (Tablo 1). Sağlıklı kişilerin plazma ve serumunda ölçülebilecek miktarlarda bulunan ve inaktif olan doku faktörü, çeşitli ajanların etkisi ile ve patolojik durumlarda değişim gösterir. Beyin, akciğer, miyokardium, plasenta ve uterusda doku faktörünün fazla olması bu organlardaki kanamanın çabuk durdurulması anlamına gelir. Kanama doku faktörünün olduğu dokularda ekstrinsek yolla, olmadığı dokularda ise intrinsek pıhtılaşma yolu ile kanama durdurulur. Bu bilgilerden dokuya spesifik hemostazın olduğu anlaşılmaktadır.

Tablo 1: Çeşitli Dokularda TF Ekspresyonu (31)

Deri	Epidermis	(+++)
	Dermis	(-)
Barsak	Mukoza	(+++)
	Submukoza	(-)
	Muscularis	D(+)
Damarlar	İntima	(-)
	Media	D(+)
	Adventisya	(++)
	Kapiller	(-)
Kalp	Miyokard	(+++)
	Endokard	(-)
	Kardiak kapaklar	(-)
Akciğer	Bronşial mukoza	(++)
	Bronşial submukoza	(-)
	Alveolar septae	(+)
	Alveolar epitel hücresi	(++)
	Alveolar makrofaj	D(+)
Beyin	Meninges	(+)
	Serebral korteks	(+++)
Böbrek	Glomerüller	(+++)
	Tubuller	(-)
	Interstiyum	(-)
Dalak	Kapsul	(++)
	Trabekul	(+++)
	Splenic cord	(-)
	Limhoid yüzeyler	(-)
Karaciğer	Hepatositler	(+)
	Kupfer hücreleri	(-)
	Safra yolu epiteli	(-)
Adrenal glands	Korteks	(-)
	Medulla	(+)
Periferel sinir	Schwan hücreleri	(++)
	Aksonlar	(-)
İskelet kası	Miyosit	(-)
	Perimisyum	(-)

(+++): çok yoğun, (++): yoğun, (+): normal değerde, D(+): değişebilir, (-): görülmemekte

Hücresel bir kofaktör ve reseptör olan doku faktörünün molekül yapısı ve içeriği elde edildiği kaynağa göre farklılık gösterir. İçeriğinde değişik oranlarda fosfolipid, protein ve karbohidrat olan doku faktörünün molekül ağırlığı geniş bir aralık içinde değişir. Wintrobe Klinik Hematoloji de doku faktörünün molekül ağırlığının 53,000-425,000 kDa arasında değiştiği, aktif protein agregatlarının ise 1,500,000 kDa kadar büyük olabileceği bildirilmiştir (32). Çok fonksiyonlu doku faktörünün molekül yapısı 3 bölümde incelenir;

1-Amino terminalin bulunduğu ekstraselüler bölge,

2-Hücre membranının içinde kalan bölge,

3-Sinyal iletiminde görev alan ve karboksi terminal ucunu içeren bölge.

Doku faktörünün toplam 263 amino asid içerdiği, 219 tanesinin ekstraselüler bölgede, 23 amino asidin transmembran bölgede ve 21 amino asidin intraselüler bölgede bulunduğu bildirilmiştir (33).

Molekülün ekstraselüler kısmı hidrofilitir. Postranslasyonel modifikasyonla proteine karbohidrat eklenir. Doku faktörünün ekstraselüler bölgesinde FVII için bağlanma noktası vardır. Molekülde ayrıca 3 glikozilasyon bölgesi mevcuttur. Doku faktörünün karboksi terminalinin bulunduğu intraselüler bölgedeki sistein kalıntıları palmitik ve stearik asid gibi yağ asidlerine bağlıdır. Doku faktörünün lipid kısmı; kolesterol, serebrozid, gangliosid ve fosfolipidlerden oluşur. Fosfolipid içeriği; fosfotidiletanolamin, fosfotidilserin, fosfotidilkolin, sfingomyelin, fosfotidilinositol lizofosfotidin etanolaminden oluşur. Protein kısmı doku faktörü aktivitesine sahiptir, ancak lipid bileşinin eklenmesiyle aktivitesi 950 kez artar. Doku faktöründe bulunan fosfolipilerin negatif yükünün koagulan aktivite için kritik rol oynadığı bilinmektedir. Doku faktörünün kofaktör fonksiyonunun tam olması için yapısındaki proteinler ve fosfolipidlerin bir arada olması gereklidir. Doku faktörünün protein ve lipid kısımlarının organik çözücülerde birbirinden ayrıldığı ve bunun sonucunda molekülde aktivite kaybı olduğu bildirilmiştir (14,33,34).

Doku faktörünün amino terminal bölgesinin bulunduğu sitoplazmik bölgenin yapısı tam aydınlatılmamış olmasına rağmen, bu bölgede sinyal peptidi ihtiva eden tek bir polipeptidin sentezlendiği daha sonra bu sinyal peptidin ayrıldığı bildirilmiştir (35,36).

2.1.3. Doku Faktörünün Hemostazdaki Rolü

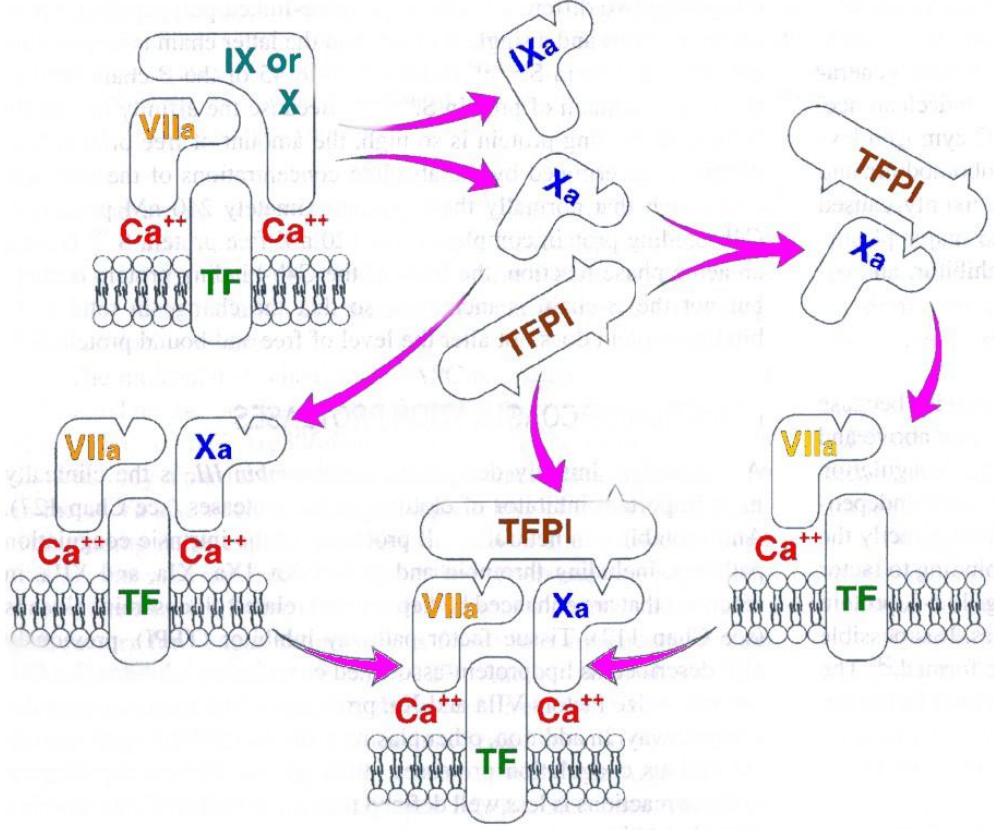
Arter duvarındaki doku faktörü fizyolojik hemostazı başlatan hücresel elemandır. Doku faktörünün, yukarıda anlatılan molekül sel yapısı hemostazda yer alan diğ er prokoagulanlardan çok farklıdır. Ekstraselüler ve intraselüler ortam ile temasda olan membrana yerleşmiş bir proteindir. Damar hasarını takiben doku faktörü kan dolaşımındaki fizyolojik görevini yapar. Bir taraftan FVII ile diğ er taraftan FIX ve FXI ile etkileşime girerek hem ekstrensek, hem de intrensek pıhtılaşma mekanizmasını başlatır, trombin oluşumunu sağlar. Trombin bir taraftan trombositleri etkileyerek primer hemostazın başlamasını diğ er taraftan fibrinojenden fibrin oluşumunu sağlayarak sekonder hemostazı başlatırken, diğ er taraftan da inhibitör sistemleri etkileyerek hemostazdaki dengeyi sağlar (4,14,37,38).

2.1.4. Doku Faktörünün Trombofilideki Rolü

Trombofili pıhtıyı yani trombusu seven anlamında son günlerde sıklıkla kullanılan bir terimdir. Denge bozulduğ unda trombus oluşumunu tetikleyen doku faktörünün kanda artması trombofilinin başlıca nedeni kabul edilir. Önceleri kanın damar duvarındaki doku faktörüne maruz kalması trombus için önemli bir risk kabul edilirdi. Günümüzde kan veya plazma kökenli doku faktörünün dolaşımda bulunması tromboza neden olan etken olarak kabul edilir. Doku faktörünün ekspresyonunun artış lehine bozulması aterosklerozun başlıca nedenleri arasındadır. Çünkü koroner kalp hastalıklarında doku faktörü antijeni artmıştır (16). Aterosklerozda doku faktörü aterosklerotik plaklardaki makrofajlardan türeyen köpük hücrelerinde eksprese edilir. Plak yırtılması sonucunda açığ a çıkan doku faktörü miyokard infarktüsünün başlıca nedeni arasındadır. Dolaşımdaki doku faktörü miktarı ve aktivitesinin diyabet, hiperlipidemi, ateroskleroz ve sigara içenlerde sağlıklı kişilere göre arttığı bildirilmiştir (7,10,38,40).

2.1.5. Doku Faktörü İnhibitörü

Doku faktörü yolu inhibitörü (TFPI) kılcal damarların endotel hücrelerinde sentezlenen bir proteaz inhibitördür. TF' nin düzenleyicisidir. Bu inhibitör trombositlerde % 3 oranında, dolaşımında lipoproteinlerle ilgili olarak % 10 oranında ve endotel hücre yüzeylerinde % 85 oranında bulunur. Molekül ağırlığı 34.000 ile 42.000 arasında değişen TFPI' nin etki ettiği başlıca molekül Faktör Xa ve FVIIa/TF kompleksidir. Bu molekülün genetik eksikliği bildirilmemiştir. TFPI eksikliği hayvanlarda genetik mühendisliği teknikleri ile yapılmış ve kanamaya bağlı embriyolojik ölüm olmuştur (41). Endotel hücrelerinde sitokin ve endotoksinler doku faktörünü regüle ettiği halde, bu faktörlerin TFPI üzerine uyarıcı etkisi yoktur. Olgunlaşmış TFPI proteini daha önceleri, lipoprotein ile ilgili koagülasyon inhibitör veya ekstrinsek yol inhibitörü olarak bilinmekteydi. Plazmada bulunan TFPI önemli bir trombin inhibitörü olarak da görev yapar. Bu inhibitörün düz kas hücrelerinde de sentez edildiği gösterilmiştir. Plazmadaki TFPI' nin lipoproteinlerle ve de özellikle LDL ile ilgili olduğu ve heparin verildiğinde önemli miktarlarda TFPI' nin salındığı bildirilmiştir. Doku faktörünün aşırı uyarılması yaygın damar içi pıhtılaşması sendromunda olduğu gibi yaygın trombotik tıkanmalara neden olacağından bu sistemin kontrolü sağlanmalıdır. TFPI yaşam için elzemdir. TFPI geninin olmamasının farelerde ölümcül olduğu bildirilmiştir. TFPI; TF, Faktör VIIa ve Xa' yı dörtlü kompleks (TFPI, TF, VIIa, Xa) oluşturarak inhibe eder. Şekil 1' de bu kompleksler görülmektedir. Bu kompleksin oluşumu için kalsiyum iyonları ve anyonik fosfolipid membran gereklidir. TFPI faktör Xa' yı fosfolipid ortamdan bağımsız direkt olarak da inhibe edebilir (42,43,44,45).



Şekil 1: TF' nin Pıhtılaşma Faktörleri İle Etkileşimi ve TFPI Tarafından Bu Etkilerin Kontrol Altında Tutulması (43)

2.1.6. Doku Faktörü İnflamasyon ve Sitokin İlişkisi

Doku faktörünün ekstraselüler bölgesi yapısal olarak sitokin reseptörlerine benzer. Bu özelliğine dayanarak doku faktörü sitokin ailesinin bir üyesi olarak kabul edilir. Lökosit ve damar hücreleri sitokinlerin hem kaynağı hem de hedefleridir. Hemostatik denge kan hücreleri, endotel hücreleri, koagulasyon, fibrinolitik sistem ve sitokinlerle sağlanır. Son yıllarda yapılan çalışmalar sitokinlerin hemostazın fizyolojisine ve patolojisine önemli katkılarda bulunduğunu göstermiştir (34,46).

doku faktörünün de kaynağı damar içindeki hücreler özellikle monositlerdir. Özellikle inflamatuvar sitokinler doku faktörü ekspresyonunu arttırarak kanda trombus oluşumuna zemin hazırlarlar (47,48,49).

Koagulasyon reaksiyonlarının pek çoğu negatif yüklü fosfolipid yüzeylerde gerçekleşir. Fosfotidilserin bu reaksiyonlarda anahtar rol oynar. Hücre membranında negatif yüklü lipid ortamın açığa çıkması, Faktör X, VII ve VIII'in aktivasyonunu kolaylaştırır. Bir diğer nokta da proenflamatuvar sitokinlerden IL-1 ve TNF endotelden salınan önemli vazoaktif maddeleri uyarır. Bunlar; PGI₂ , Nitrik oksit, PAF ve endotelindir. Sitokinler endotel hücrelerinde protrombotik ve proenflamatur sistemin programlayıcısı gibi hareket ederler. Septisemi enflamasyon ve hemostatik sistem arasındaki ilişkiyi gösteren en iyi örnektir. Buradaki hemostatik değişimler pek çok organda mikrovasküler trombus yapar. Sepsiste hemostatik anomalilerle ilgili sitokin değişimlerini gösteren çeşitli çalışmalar vardır (50).

Yukarıda özetlenen sitokin inflamasyon ilişkisinde en etkin rol TF' nin üretimine neden olduğu trombindir. Hücre yüzeylerinde bulunan ve çeşitleri oldukça fazla olan PAR' lar (proteazla aktifleşen reseptörler) trombinin koagulasyondan bağımsız görevlerini yapması için gereklidir. Trombinin inflamasyonla ilgili fonksiyonlarında etkin rol oynayan PAR grubu reseptörlerin bir kısmının yapısı ve fonksiyonu aydınlatılmıştır. PAR-1; 7 tane tane transmembran domaini olan G proteinleri ailesidir (51,52). Trombinin ligandı olan multifonksiyonel reseptör trombin tarafından aktivasyona uğrar. Bu noktadan hareketle trombinin inflamasyon esnasındaki fonksiyonlarını şöyle sıralayabiliriz:

- Vazodilasyonu ve PAR-1' i uyarmak,
- PAR-1 aracılığı ile hücrede degranülasyon yapmak,
- Sitokin/kemokin üretimini aktive etmek,
- Fibrin(ojen) aracılığı ile makrofaj adezyonunu sağlamak.

Yukarıdaki özellikler dikkate alındığında TF' nin uyarısı ile meydana gelen trombin inflamasyon olaylarında fizyolojik mediyatör gibi davranır.

2.1.7. Doku Faktörünün Sinyal İletiminde Rolü

Yapılan çalışmalar doku faktörü ekspresyonunun kanserli olgularda arttığı yönündedir. Doku faktörünün aktivasyonu ile meydana gelen trombin tümör büyümesi ile de ilgilidir. Trombin sinyal iletiminde bütün bu fonksiyonlar için en önemli proteazdır.

TF-FVIIa-FIXa koagülasyonun çeşitli kademelerinde PAR1 ve PAR2' yi aktifleştirir. Bu işlemler TF'nin sitoplazmik bölgesinin fosforilasyona uğratılması ile gerçekleştirilir. PAR 2' nin dışındaki PAR' lar trombin tarafından aktive edilir. Trombosit aktivasyonu gibi hemostatik cevaplarda etkin olan PAR sistemi hemostazın dışında da yani hemostaza bağlı olmadan da işlevini sürdürür. Trombin PAR' lar aracılığı ile anjiogenezi hızlandırır, bu da tümör büyümesi ve metastaz için önemli bir noktadır. Trombinin doku faktörü ve kanser ilişkisi ile ilgili görüşler ve hipotezler özellikle sinyal iletimi yönünden dikkat çekicidir. Sonuç özellikle proanjiogenik faktör olan VEGF' nin (vasküler endotelyal growth faktör) artışına ve anjiogenezin artışına bağlanmaktadır. Doku faktörü VIIa kompleksi hücre içindeki sinyalizasyonu ya trombin üzerinden ya da doğrudan doğruya sinyalizasyonu hızlandırır. Jiand ve ark (51) TF-FVIIa kompleksinin meme kanserlerinde hücre içi sinyallerini arttırdığını bildirmişler ve bu mekanizmada PAR' lar ve MAPK' ların etkin olduğunu bildirmişlerdir. Hücrede kanser gelişmesi yönünden de önem taşıyan aşağıda sıralanan reaksiyonların büyük çoğunluğunun doku faktörü ile indüklenen PAR' ların etkisi ile gerçekleştiği düşünülmektedir (36,52,53,54).

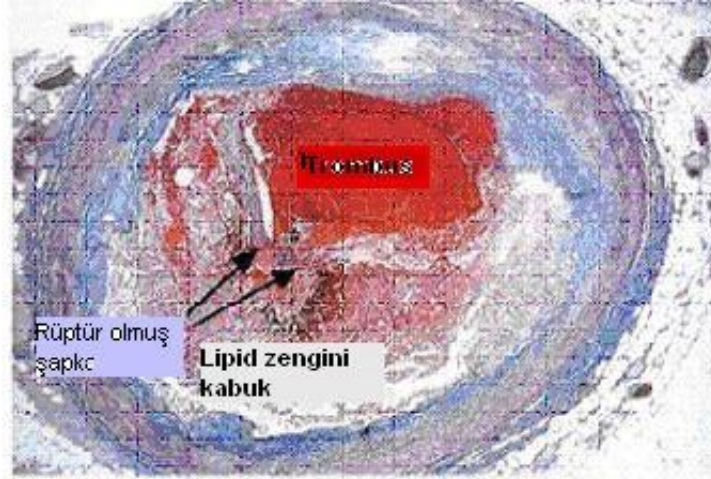
- * Hücre içi sinyallerin hızlanması,
- *Anjiogenezin düzenlenmesi,
- *Tümör büyümesi ve metastazın hızlanması,
- *Kalsiyum çıkışı,
- *Mitojenle aktifleşmiş protein kinazların (MAPK) fosforilasyonu,
- *Protein kinazların fosforilasyonu,
- *Büyüme ilgili olan çeşitli genlerin up regülasyonu
- *Bağ dokusu büyüme faktörlerinin up regülasyonu.

2.1.8. Doku Faktörünün Genetiği

Doku faktörü geninin dizilişi tamamen aydınlatılmıştır. Bu genin lokalizasyonu kromozom üzerinde 1p21-p22 bölgesindedir. Doku faktörünün DNA sekuensi tespit edilmiş 6 ekson ve 5 introndan oluşmuştur. Yaklaşık 13 kb uzunluğundadır. Birinci ekson sinyal peptidini kodlar. 2, 3, 4 ve 5. eksonlar ekstraselüler kısmı kodlar, 6. ekson transmembran ve sitoplazmik kısmının kodlayıcısıdır. Ayrıca 6. eksonun doku faktöründe 3'-UTR olarak isimlendirilen tranlasyona uğramayan bölgeyi kodladığı bildirilmiştir. Bu genin promotor bölgesi -383 ve -121 baz çifti (bp) arasındadır (55,56).

2.2. KORONER ARTER HASTALIĞI VE DOKU FAKTÖRÜ

Doku faktörü, günümüzde akut koroner sendromunda önemli bir trombus ajanı olarak kabul edilir (50,58,59). TF, aterosklerotik plak ihtiva eden bütün hücresel elementlerde ortaya çıkarılabilir. TF' nin en bol bulunduğu yerler, köpük hücreleri, makrofajlar, düz kas hücreleri intiması, plak içinde bulunan lipidden zengin nekrotik merkezlerdir. TF antijeni aynı zamanda plak içinde yayılmış olan düz kas hücrelerinde (SMC) ve endotel hücrelerinde bulunur. Aşağıdaki şekilde aterosklerotik plak içinde özel boyası ile boyanan TF molekülleri görülmektedir (7).



Şekil 3: Doku Faktörünün Aterosklerotik Plak İçinde Görünüşü (7)

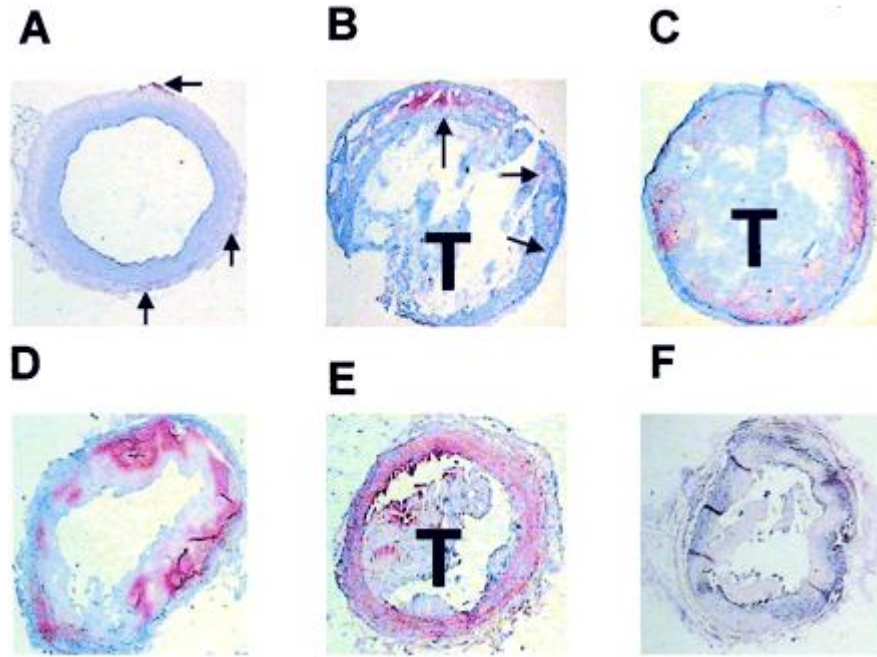
TF aktivitesi koroner aterektomi yapılan örneklerin %90' nında bulunmuştur (7) .

Normal şartlarda TF damarın mediasında az miktarda eksprese edilir. Fakat damar hasarını takiben indüklenir ve artmaya başlar. Damar duvarındaki doku faktörü ekspresyonu her zaman sabit değildir. Damar hasarının dışında Tablo 2' de görüldüğü gibi TF çeşitli uyarımlarla modüle edilir. Bunlar arasında; bazı interlökinler, endotoksinler, trombin, TNF, serbest oksijen radikalleri, forbol esterleri, immun kompleksler ilerlemiş glikozilasyon ürünleri, CD40' ın ligantına bağlanması gibi çeşitli etkenler sayılabilir. Ayrıca monosit, makrofaj gibi diğer hücrelerden eksprese edilen TF bu ajanların dışındaki indükleyicilerden etkilenebilir. Doku faktörü ekspresyonunun balon anjioplasti uygulaması yapılan ratlarda arttığı gösterilmiştir. Diğer taraftan PGI2 ve analoglarının TF ekspresyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (7).

Tablo 2: Bazı Hücrelerde TF Sentezini Aktifleştiren ve İnhibe Eden Moleküller (46)

Hücre tipi	Aktivatörler	inhibitörler
endotel hücreleri	TNF- α Endotoksin lipopolisakkarit (LPS) VEGF TGF- β Trombin o-LDL forbol esterleri PDGF	Heparin bağlı büyüme faktörü Artan cAMP (forskolin,dibutyryl cAMP)
düz kas hücreleri	Trombin Angiotensin II MCP-1 Serum Forbol esterleri	
monosit/makrofaj	Endotoksin lipopolisakkarit VEGF İmmün kompleksler o-LDL T lenfositler ve ürünleri (örn:CD40) Forbol esterleri TGF- β Serum PDGF	TGF- β Artan cAMP Salisilatlar IL-4,10,13
fibroblastlar		

Andrea ve ark (10) endotel hasarı yaptıkları tavşan karotid arterlerinde dairesel akım değişimleri (CFVs) uygulayarak meydana getirdikleri stenozlarda TF ekspresyonunu ve zamana bağlı olarak meydana gelen TF ekspresyonu ile birlikte trombus oluşumunu incelemişler ve daha önce hirudin uygulanan tavşanlarda CFVs' ye bağlı TF ekspresyonu ve trombus oluşumunun kontrole benzer şekilde geliştiği yani hirudinin TF oluşumunu ve de trombus meydana gelişini önlediğini bildirmişlerdir.



Şekil 4: Tavşan Karotid Arterlerinde TF Ekspresyonu, Trombus Oluşumu ve Hirudin'in Trombus Oluşumuna Etkisi (10)

Yukarıdaki şekilde kontrol grubu olarak kullanılan endotel hasarı oluşturulmamış karotid arterlerindeki ve CFV' nin zamana bağlı olarak uygulamasını takip eden sürelerde TF ekspresyonu ve trombus oluşumu görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi kontrol olarak kullanılan arterlerde intima ve mediada TF görülmemektedir. Sadece damarın adventisia bölgesinde çok az pozitif reaksiyon veren TF' ler görülmektedir (Şekil-4A). CFV' yi takip eden 30. dakikada TF damarın mediasında, adventisiasına göre daha fazla eksprese edilir (Şekil-4B). Lümende, şekilde T harfi ile gösterilen trombus görülmeye başlanmıştır. CFV' yi takip eden 2 saat sonunda damar lümeninde yoğun TF ekspresyonu vardır ve

trombus oluşumu artmıştır (Şekil-4C). CFV' yi takip eden 4 saat sonunda damar lümenindeki TF yoğunluğu ve trombus oluşumu daha da artmıştır (Şekil-4D). CFV' yi takip eden 8 saat sonunda daha yoğun TF ve daha yoğun trombus görülmektedir (Şekil-4E). Daha önce hirudin uygulaması yapılan gruptaki damar lümeni kontrole benzer şekildedir. TF ekspresyonu ve buna bağlı olarak meydana gelen trombus oluşumu inhibe olmuştur (Şekil-4F).

2.3. KORONER ARTER HASTALIKLARINDA RİSK FAKTÖRLERİ

Genetik faktörler tarafından belirlendiği genellikle kabul edilen koroner arter hastalıklarının risk faktörleri aşağıda sıralanan risk faktörleri arasına doku faktörü de girmiştir (7).

- Yüksek LDL
- Düşük HDL kolesterol
- Yüksek trigliserid
- Artmış beden kitle indeksi
- Hipertansiyon(sistolik basınç>140 mmHg, diastolik basınç >90mmHg)
- Artmış lipoprotein (a)
- Artmış homosistein
- Tip 2 diabetes mellitus
- Yükselmiş fibrinojen
- Trombosit agregasyonunun artması
- Artmış C-reaktif protein
- **Artmış doku faktörü**
- Cinsiyetin erkek olması
- Yaş
- Koroner arter hastalığının ailesel hikayesi
- Sigara içimi

- Diyet
- Egzersiz
- İnfeksiyon
- Hava kirliliği (partiküller)

2.4. KORONER ARTER HASTALIKLARINDA HEMOSTAZIN YERİ

Koroner arter hastalıklarının (KAH) trombusla ilgisi ilk defa 1912 yılında Herrick tarafından bildirilmiştir. Daha sonra koroner trombus ‘miyokard infarktüsü’ (MI) olarak isimlendirilmiştir. 1966 yılında MI’ den ölen bir hastada yapılan otopside trombotik tıkanmanın aterosklerotik plakla ilgili olduğu ve akut iskemik sendromların (ani ölümler) bu durumla ilgili olduğu bildirilmiştir (1,4,7,58,59).

Son yıllarda koroner anjiyografisi ile trombus daha iyi tanındı ve tıkanmış damarlar açılmaya başlandı. Stabil olmayan anjinada aspirinin başarısı ile trombosit agregasyonunun kritik rol oynadığı anlaşıldı. Akut koroner sendromları için yeni antiagregan ilaçlar denendi. Trombusun oluşum mekanizması çok iyi anlaşılmamakla beraber, aterosklerotik plaktaki yırtılma ile oluşan trombus ani ölümlerin nedeni olabilmektedir (7,69).

Koroner arter hastalığı (KAH)’nın birincil nedeni olan ateroskleroz birçok farklı hücre tipini ve organı etkiler. Ateroskleroz (AS) büyük, orta ve küçük musküler arterleri tutan, intimal damar duvarında lipid, kolesterol, Ca⁺⁺ ve hücre kalıntılarının mevcut olduğu, endotel disfonksiyonu ve vasküler inflamasyon ile seyreden bir hastalıktır. Bu hastalık damar duvarının inflamasyonu ve proliferasyonu ile seyrederek, hemostatik parametreleri tetikleyerek trombus oluşumuna neden olur. Aterosklerotik plağın rüptürü gerçekleştiğinde trombus ön plana çıkar. Akut koroner sendromlarında trombus oluşumu ön planda olduğu için çeşitli antitrombotik ilaçlar geliştirilmiştir (4,58).

Koroner tromboz oluşumu için plak rüptürü ve endotel hasarı, en önemli sebeplerdir. Plak rüptüründe doku faktörü gibi protrombotik mediatörlerin etkisi olduğu biliniyor. Plak rüptürü makrofaj ve immun hücrelerin aktivasyonu ile, fibröz kılıfın ince olduğu bölgeden gerçekleşmektedir (7).

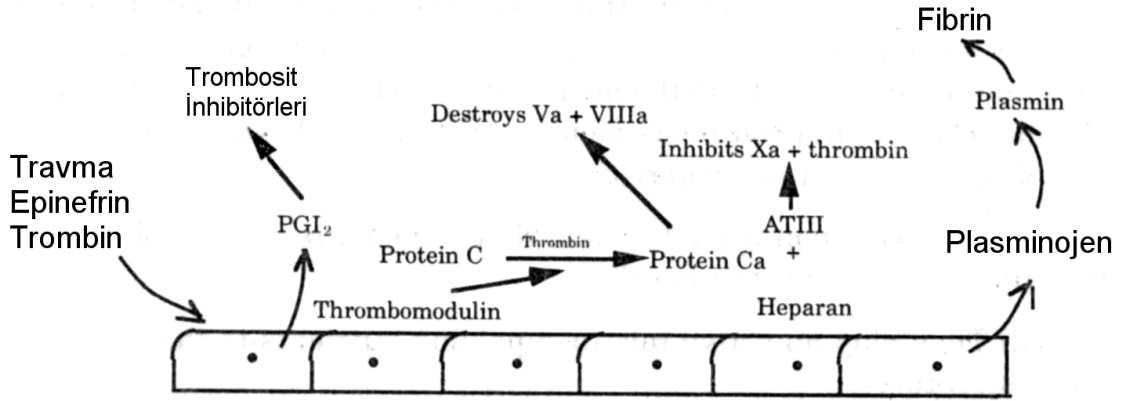
Aterosklerozun başlangıç lezyonu damar endotelindeki sarı yağlı çizgilenmelerdir ve bunlar çocukluk çağında oluşmaya başlar. Ateroskleroz gelişiminde ilk basamak endotel disfonksiyonudur ve damar endotelinde gevşetici ve kasıcı faktörlerin dengesinin bozulmasıyla karakterizedir (61,62).

Koroner arter hastalığın son safhasında hemostazın çeşitli kademeleri özellikle koagülasyon sistemi aktifleşir ve trombus kaçınılmaz olur. Burada TF' nin rolü ön plandadır. Koroner arterlerin tıkanması anlamına da gelen akut koroner sendromu adı verilen bu tabloda tedavi planlamasında hekimler, hemostazın bütün kademelerini dikkate alarak tedavi planlaması yapmaktadır.

2.5. HEMOSTATİK SİSTEM

Kan; endotel hücreleri ile kaplı damarlarda pıhtılaşmadan dolunur. Oysa kan endotel dışında yabancı bir yüzeyle karşılaştığında, örneğin enjektörle alınıp tüpe konulduğunda hemen pıhtılaşır. Dolaşan kanda mikro düzeylerde dahi bir pıhtı olması, kılcal damarları tıkayarak ilgili organın oksijenlenmesini ve de beslenmesini engelleyeceği için hayati tehlike oluşturur. Dolaşan kanda pıhtının meydana gelmemesi; hemostaz adı verilen sistemin çeşitli bölümleri arasındaki biyokimyasal dengenin iyi işlemesine bağlıdır (4).

Damarların iç yüzünü kaplayan endotel hücrelerinden salınan pekçok kimyasal ve bu kimyasallar arasında meydana gelen çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar dolaşan kanın pıhtılaşmasına engel olur. Kanın sıvı halde kalmasını sağlayan fizyolojik olayda damar yapısı önemlidir. Endotelin özel yapısı endotele tromborezistant özellik kazandırır. Şekil 5 ' de endotelin bu özelliği gösterilmektedir.



Şekil 5: Endotelin Tromborezistans Özelliklerine Bazı Örnekler (4)

Endotelde meydana gelebilecek bir hasar ya da kesilme hemostatik sistemi harekete geçirir. Yaralanmayı takiben trombositler endotele ya da endotelin altında bulunan subendotel tabakaya adhere olur yani yapışır. Adezyon trombositlerin özel bir fonksiyonudur. Bu esnada kanda dolaşan pıhtılaşma faktörleri de subendotele temas ettiği için aktifleşir ve koagülasyon sistemindeki “kontakt faz” başlar. Bu koagülasyonun intrinsek sistemidir. Bu esnada subendotelde ve makrofajlarda bulunan TF ekstrinsek sistemi başlatır. Yine aynı anda subendotelde bulunan kollajen açığa çıkmıştır. Kollajen hem trombositler için hem de kanda bulunan F XII için ciddi bir uyarıcıdır. Kollajen trombositlerde membran glukoproteinleri ile temas edince trombosit agregasyonu için hücre içinde değişimler başlar. Hücre içi değişimleri ile aynı anda gerçekleşen olay membran fosfolipidlerinden arasıdonik asid salınması ve bunu trombaksan A2’ nin takip etmesidir. Bu etkiler ile hücre içi kalsiyum serbestleşir ve trombosit granüllerinden agregasyonu başlatıcı ajanlar salgılanmaya başlar. Hageman Faktör yani F XII’ nin de aktivasyonu ile bir taraftan da koagülasyon kaskadı işlemektedir. Sonuçta fibrin oluşur. F XIII ile fibrinolizise resistans fibrin polimerler meydana gelir. Plasminojen yine endotelden salınan aktivatörlerle plazmine dönüşür. Bir taraftan yara iyileşirken diğer taraftan da pıhtı eritilerek o bölgedeki kan akımı fibrinolizis sayesinde normale döner. Bu olaylarda rol oynayan sistemler, hücreler ve proteinler şöyle sıralanabilir:

- Damar sistemi
- Trombositler

- Pıhtılaşma sistemi
- Fibrinolitik sistem
- İnhibitör proteinler

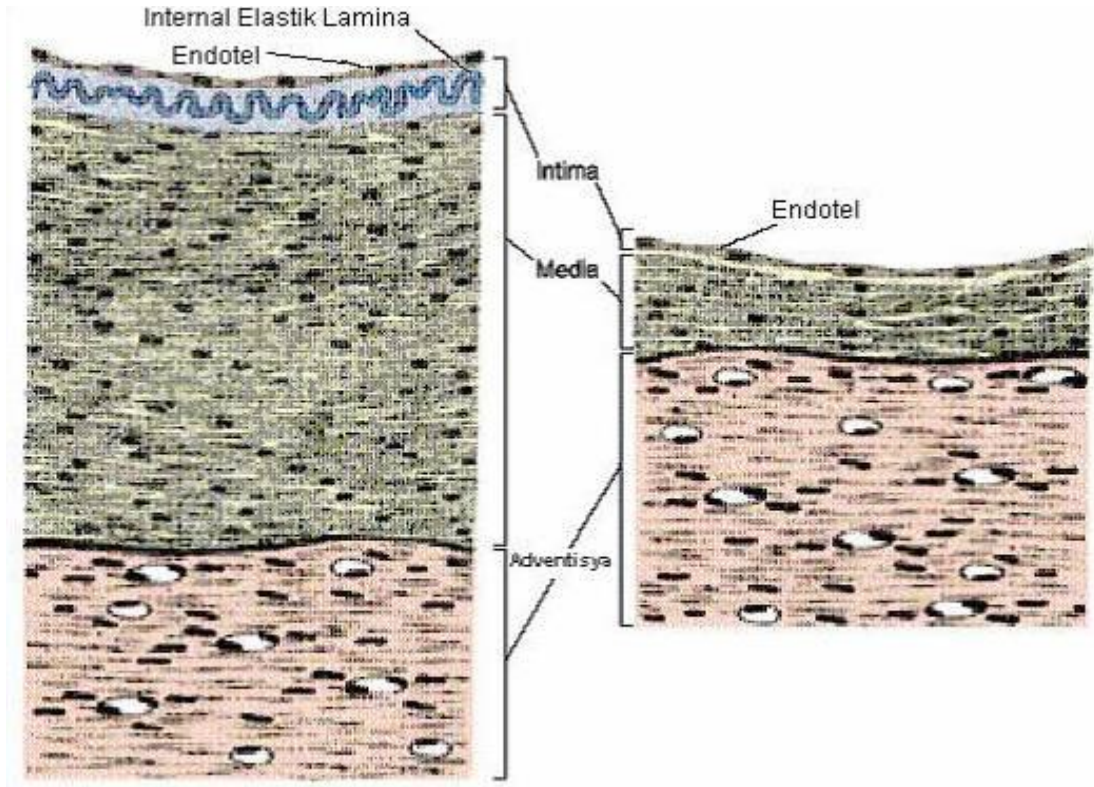
2.5.1. Damar sistemi (60,65)

Kan damarları üç katmandan (tunika) oluşmuştur : intima, media ve adventisya. Şekil 6' da arter (A) ve venlerdeki (B) damar yapısı ve endotelin bulunuş şekli görülmektedir.

İntima; damarın iç yüzeyini döşeyen endotel hücrelerinin oluşturduğu kattır, hücreler bazal lamina üzerinde bulunurlar. Bu hücrelerin her gün %1' i yenilenir. Endotelin altında seyrek düz kas hücreleri içeren gevşek bağ dokusunun oluşturduğu subendotel tabakası bulunur. Arterlerde intima, mediadan elastik lamine interna ile ayrılmıştır. Bu kısım üzerinde madde geçişine izin veren ve hücrelerin beslenmesini sağlayan pencereler (fenestralar) bulunur.

Media; başlıca sarmal biçimde dizilmiş düz kas hücrelerinin oluşturduğu tabakalardan meydana gelir. Bu kas hücreleri arasında elastik lifler ve lameller, retiküler lifler ile proteoglikan yapılar vardır. Düz kas hücreleri bu hücre dışı matriksin hücrel kaynağıdır. Daha büyük arterlerde media ile adventisya arasında ince bir eksternal elastik lamina mevcuttur. Kapiler ve post kapiler venüllerde media tabakası perisit denilen hücrelerden oluşur.

Adventisya; kollajen ve elastik liflerden oluşur. Adventisyadaki kollajen, tip I kollajendir. Adventisya tabakası, genellikle içinden geçtiği organın etrafını saran bağ dokusu ile kaynaşır.

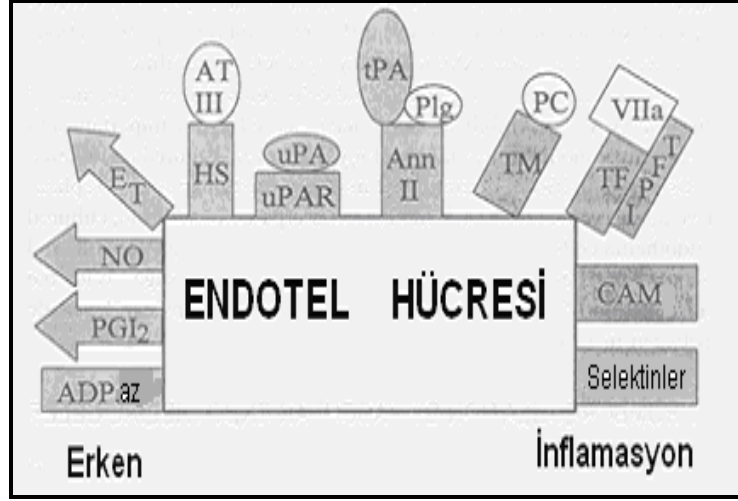


Şekil 6: Arter (A) ve Ven (B) Kesitinde Damar Katmanlarının Şematik Görünümü (65).

2.5.1.1. Damar Endoteli ve Özellikleri (4,60,62,65,66)

Vasküler endotel insan vücudundaki tüm kan damarlarının yüzeyini kaplayan, arter duvarı ile kan elamanları arasında bariyer oluşturmak ve damar permeabilitesini kontrol etmek üzere özelleşmiş tek sıra dizilmiş epitelyal hücrelerden oluşan tabakadır. Endotel hücresi, bariyer oluşturmak ve kan-arter permeabilitesini kontrol etmek üzere özelleşmiş, ince uzun bir epitel hücrelidir. Kapiler lümeni sadece endotelden ibarettir.

Endotel hücrelerinden çeşitli reaksiyonlar için farklı zamanlarda çeşitli ürünler sentezlenir. Bu ürünler kanın tromboregulasyonunu sağlar.



Şekil 7: Damar Endotelinden Salınan Bazı Moleküller (66)

PGI₂ : prostasiklin ; NO: nitrik oksit ; ET: endotelin ; HS: heparan sülfat ; AT III: antitrombin;
uPA: ürokinaz plazminojen aktivatör ; uPAR: uPA reseptör ; Ann II: annexin II; tPA: tissue plazminojen
aktivatör ; Plg : plazminojen ; TM: trombomodulin ; PC: protein C ; TF: tissue faktör ; TFPI: doku faktörü yolu
inhibitörü ; CAMs: hücresel adhezyon molekülleri.

Şekilde görüldüğü gibi endotel hücreleri birçok madde sentezleme kabiliyetinde olduğundan aşağıdaki özelliklere sahiptir.

*Non trombojeniktir. Yani tromboresistansdır. Biyokimyasal denge bozulduğunda endotel artık tromboresistant değildir.

*Subendotel için gerekli besin maddelerini sağlar.

*Makromoleküller için bir bariyer oluşturur ve endotelin altına geçmesini önler.

*Endotel hücreleri PGI₂, çeşitli interlökinleri, IL-1, çeşitli büyüme faktörlerini, çeşitli vazodilatörleri salgırlar.

Endotel hücreleri bir taraftan makrofaj, bir taraftan trombosit ve diğer taraftan düz kas hücreleri ve endotelin bizzat kendisinin salgıladığı çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerle karşı karşıyadır.

Endotel hücrelerinde immunglobulin birimleri taşıyan ve hücreler arası bağlantılarda rol oynayan çeşitli proteinler de bulunmuştur.

Endotel hücrelerinin luminal yüzeyinde serotonin, histamin, anjiotensin, epinefrin, norepinefrin, trombin için reseptörler tespit edilmiştir. Angiotensin I ve II salınımını gerçekleştirir.

Endotelin luminal yüzeyi bir proteoglikan olan glikokaliks ile kaplıdır. Bu kaplama materyali heparin sulfat ve diğer glikozaminoglikanları içerir. Bu glukozaminoglikanlar koagulasyonda önemli bir inhibitör olan antitrombin III' ü (AT III) aktif hale getirirler. Endotel hücreleri plazminojen aktivatörlerini sentez ederler ve salgırlar.

Endotel hücreleri trombaksan A2 (TXA2)' nin aksine güçlü bir antiagregan ve vazodilatör olan prostasiklini (PGI2)' yi sentez eder. Bazı ilaçlar endotelden PGI2 sentezini arttırlar. Endotelden PGI2' nin salınımının azalması ateroskleroz ve tromboembolizm gelişimini hızlandırır. Aterosklerozda PGI2 azalırken, TXA2 de artış göstermektedir. Endotelden sentezlenen trombomodulin protein C aktivasyonu için gereklidir.

Von Willebrand faktör (vWF) trombositlerin subendotelyuma yapışması için gereklidir, endotelden ve makrofajlardan salınır. Hücre kültürlerinde bazal membran kollageninin de endotelde sentezlendiği görülmüştür.

Ayrıca, endotel hücreleri damar tonusunun, koagulasyonun, fibrinolizisin, inflamasyonda lökosit adezyonunun ve damar düz kas hücresinin çoğalmasının kontrolünde önemli rol oynamaktadır.

2.5.1.2. Normal ve Aterosklerotik Endotel (4,66,67)

Endotel fonksiyonunun bozulması ateroskleroz gelişiminde ilk basamaklardan biridir. Çünkü endotel disfonksiyonunda geçirgenlik artar. LDL' nin bu geçirgenlikten yararlanarak endoteli geçmesine neden olan endotel disfonksiyonudur.

Endotel insan vücudundaki en önemli organ sistemidir ve tek tabaka özelleşmiş hücrelerden oluşur. Mekanik ve hormonal stimulusları algılama ve bazı fonksiyonları gören vazoaaktif maddeleri salıverme becerisi bulunmaktadır. Bu fonksiyonlar arasında vasküler tonusun idamesi, antitrombolitik ve antiinflatuar süreçler yer almaktadır.

Endotel hücre yüzeyinde belli bazı lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonu monositler ve T-hücrelerinin endotele adezyonunu düzenlemektedir. İki geniş lökosit adezyon kategorisi bulunmaktadır. İmmünglobulin üst ailesi üyeleri vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve hücrelerarası adezyon molekülü-1 (ICAM-1)'dir. Selektinler yaygın bir diğer lökosit adezyon kategorisini oluşturmaktadır. Selektinlerin prototipi olan E-selektinin erken dönem aterogenezle çok az ilgisi vardır. E-selektin tercihen polimorfonükleer lökositleri bir araya toplamaktadır. Nadiren erken dönem ateromlarda saptanmaktadır. VCAM-1, ICAM-1 ve selektinler dolaşan inflamatuvar hücreleri çeker ve yakalar, bunların subendotelyal aralığa göçünü kolaylaştırır. Normal endotelyal hücreler, bu molekülleri taşımazlar ama anormal arteriyal shear stresi, okside olmuş subendotelyal lipid ve diyabetik hastalarda arter duvarında ileri glikolizasyon ürünleri, bunların ortaya çıkmasını uyarabilir.

Aterosklerozun gelişmesinde selektinler ve adezyon moleküllerinin önemi yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. VCAM-1 ve ICAM-1 endotel disfonksiyonunu belirlemede kullanılan kan parametrelerinden biridir.

Damarlar normal şartlarda büyük ölçüde endotelyal nitrik oksit sentezi ve salıverilmesine bağlı olarak vazodilatasyon durumundadır. NO, endotelde L-arjinin' den NO sentaz ile üretilir. Endotel kaynaklı NO bilinen en potent vazodilatördür. LDL oksidasyonunda etkindir. NO vazorelaksasyona neden olur, konstriktif faktörlerin (ET-1 gibi) salınımını, düz kas hücre proliferasyonunu, inflamatuvar hücrelerin farklılaşmasını, lökosit adezyonunu, platelet agregasyonunu ve doku faktörü üretimini inhibe eder. Bu vazoaaktif, antibüyüme, antiinflatuar, antitrombotik etkiler sağlam endotel gerektirmektedir.

NO aktivitesindeki azalma media tabakasında kalınlaşmaya ve/veya myointimal hiperplaziye neden olur, vasküler lezyonların gelişimi hızlanır ve bu da ateroskleroz gelişimine katkıda bulunur.

Sağlıklı bireylerde endotel uyarısının baskın etkisi vazodilatasyondur. Ancak hipertansiyon, DM, dislipidemi, sigara gibi risk faktörleri varlığında endotel kökenli konstriktif ve gevşetici faktörler arasındaki denge bozulur ve endotel disfonksiyonu ile sonuçlanır. Endotel disfonksiyonunun karakteristik özelliği antiaterosklerotik molekül olan NO' nun biyoaktivitesindeki azalmadır. Endotelyal disfonksiyonda uygunsuz vazokonstriksiyon oluşur. Endotelyal hasar genellikle yüksek shear stres ve yüksek oksidatif stresten kaynaklanır ve oksidatif stres düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonuna yol açar. Bu ürünler anormal NO sentezine ve eş zamanlı olarak vazokonstriksiyon, inflamasyon ve koagulasyonu arttıran maddelerin salıverilmesine sebep olur. İnflamatuar hücreler okside LDL ile reaksiyon göstererek köpük hücreleri oluştururlar.

Endotel disfonksiyonunda rol alan bir diğer faktör ET-1' dir. ET-1, endotelin polipeptit ailesine ait olan ve vasküler endotel hücreleri tarafından sentez edilen potent bir vazokonstriktör polipeptittir.

Bütün bunlar endotelyal hücre ölümü ve/veya disfonksiyonu, hücre dışı matriks sindirimi vasküler düz kas proliferasyonuna sebep olur. Endotelyal disfonksiyon daha sonra sublinik ateroskleroza ve nihayetinde akut koroner ve vasküler sendromlara ilerleyebilir. Tablo 3' de normal ve fonksiyonu bozulmuş endotelin özellikleri görülmektedir.

Tablo 3: Normal ve Fonksiyonları Bozulmuş Damar Endotelinin Özellikleri (66)

	Normal endotelium	Disfonksiyonel endotelium
İnflamatuar özellikler	Lökosit adezyon moleküllerinin seviyeleri azdır veya yoktur.	Lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonu artmıştır.(örn: VCAM-1, ICAM-1)
Antikoagülant özellikler	İnflamatuar sitokinlerin seviyeleri düşük veya yoktur.	İnflamatuar sitokinlerin ekspresyonu (MCP-1) artmıştır.
Vazoregülatör özellikler	Minimal platelet adezyonu Prokoagülant moleküllerin ekspresyonu yoktur. (örn: doku faktörü ve PAI-1) Fibrolizis artmıştır.	Artmış platelet adezyonu Prokoagülant moleküllerin ekspresyonu artmıştır. Fibrinolizisin azaldığı düşünülür.
SMC regülatuar özellikleri	NO, PGI ₂ gibi vazodilatörler salınır.	Endotelin gibi vasokonstriktifler salınır, NO sekresyonu azalmıştır.
SMC regülatuar özellikleri	SMC proliferasyonu ve göçünün inhibitörleri (TGF- β)	SMC proliferasyonu ve göçünün aktivatörleri (PDGF)

2.5.2. Hemostatik Sistemde Trombositler (4,68,69)

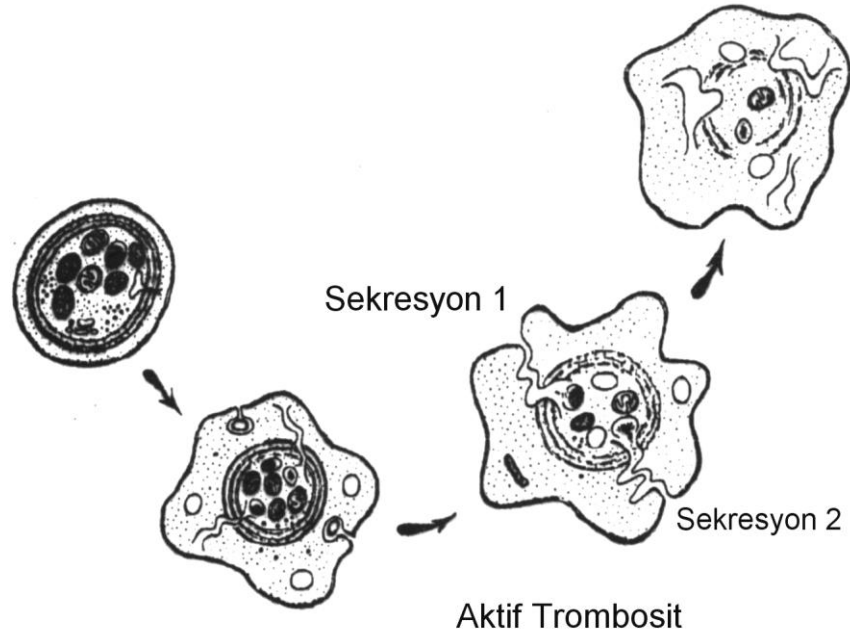
Trombositler, komplike aterosklerotik plaktaki en önemli hücreler olup, içerdikleri granüllerde çeşitli sitokin ve vazoaktif maddeler taşırlar. Hassas aterosklerotik plağın bütünlüğünün bozulmasıyla aktive olan trombositler, salgıladıkları sitokinler ile yırtılarak (rüptür) komplike olan aterosklerotik bölgede toplanarak trombus oluşumuna neden olurlar ve böylelikle akut koroner sendromlara yol açarlar.

Trombositler primer hemostaz yani pıhtılaşmanın ilk safhasını başlatan kan hücreleridir. Bu görevlerini adezyon (yapışma), sekresyon (salgılama) ve agregasyon (kümeleşme) fonksiyonları ile yaparlar. Amaçları pıhtı oluşturarak kanayan bölgeyi tıkamaktır.

Trombositler normal damar endoteline yapışmazlar. Endotel hasarı olduğunda, kanda dolanan trombositler ve pıhtılaşma faktörleri subendotelyal komponentleri ile karşı karşıya gelir. Trombositlerin adezyonunda, trombosit membranına yerleşmiş spesifik glikoproteinlerin hem fonksiyonel hem de düzenleyici rolleri vardır. vWF ve kanın akış hızı trombosit adezyonunda rol oynayan diğer etkenlerdir. Kollagen fibrillerinin özel yapısı trombositlerin adezyonunda rol oynar.

Trombositler endotel dışı bir yüzeye temas edip bir kere aktif hale geldikten sonra, hemen şekil değişimi başlar. Disk şeklinden oval şekle döner ve psödopodlarını çıkarır. Şekil 8' de görüldüğü gibi aktif şekle geçen trombositler kademeli olarak sekresyona uğrayarak agregasyon görevini yerine getirmiş olurlar. Adezyonda trombositler yabancı yüzeye, agregasyonda ise birbirine yapışır. Fibrinojen ve fibronektin trombositlerin birbirine yapışması ve agregat meydana getirmesi için gereklidir. Bazı maddeler (agonistler) trombositlerin membranında bulunan glikoproteinlere yani reseptörlere bağlanmak suretiyle agregasyonu ve trombositlerin daha ileri aktivasyonunu gerçekleştirirler. Bunlar:

- Kollagen
- ADP
- Adrenalin
- Serotonin
- Araşidonik asid
- Asid metabolitler
- Trombaksan A2



Şekil 8: Trombositlerin Aktivasyonun Şematik Görünümü (68).

Trombositlerde meydana gelen pekçok aktivitenin kalsiyuma bağlı olduğu görülmüştür. Örnek vermek gerekirse; miyozinin fosforilasyonu ve araşidonik asidin salınmasıdır. Dışardan etkili olan agonistler ile trombositlerde meydana gelen sekresyon için en az dört farklı yol olduğu bildirilmiştir. Bu sekresyonlar trombosit membranına yerleşmiş farklı reseptörler aracılığı ile gerçekleşmektedir.

Fosfolipaz A2' nin aktivasyonu araşidonik asidin açığa çıkması ile kendini gösterir. Buradan da siklooksijenazların etkisi ile prostaglandinler endoperoksidler ve güçlü bir agregasyon ajanı olan tromboksan A2 meydana gelir. PGD2 gibi stabil prostaglandinler de trombosit aktivasyonunu inhibe ederler. PGD2' nin aynı zamanda sistemde düzenleyici rol oynadığı da bildirilmiştir. TXA2 kalsiyumun hücre içinde çeşitli kompartmanlarda hareketini sağlayan bir iyonoforik bir aktivite de gösterdiği bildirilmiştir.

Sitoplazmik kalsiyum aktivitesini arttıran diğer bir mekanizma da ADP oluşumudur. Sitoplazmik kalsiyum düzeyini arttıran üçüncü sistem PAF (platelet activating factor) dır. PAF lökositlerden ve bazı türlerde trombositlerden salınan

lipit türü bir maddedir ve in vitro şartlarda güçlü bir trombosit agregasyon yapıcı ajandır.

Sitoplazmik kalsiyum düzeyini arttıran dördüncü sistem ise inositol trifosfattır. Burada fosfolipaz C ve protein kinaz C enzimlerinin rolü vardır.

Şekil 8' de görüldüğü gibi trombositler çeşitli granüller içermektedir. Bu granüllerin içerikleri aşağıdaki gibidir:

-Yoğun cisimler (dense body) serotonin, ATP, ADP, pirofosfat ve kalsiyum içerir.

- α granüller; fibrinojen, vWF, Faktör V, yüksek molekül ağırlıklı kininojen, fibronektin, a₁-antitripsin, B-tromboglobulin, trombosit faktör 4 ve trombosit türeyen büyüme faktörü (PDGF).

- Lizozomlar asid hidrolazları içerir.

Trombositler çeşitli uyarılar ile uyarıldığında, şekil 8' de görüldüğü gibi granüller merkeze toplanır ve kontraktıl (kasılabilir) kanal sistemi ile membrana bağlanarak granüllerin içeri boşalması için kanallar oluşur. Bunlar membrana bağlı hücre içi kanal sistemidir.

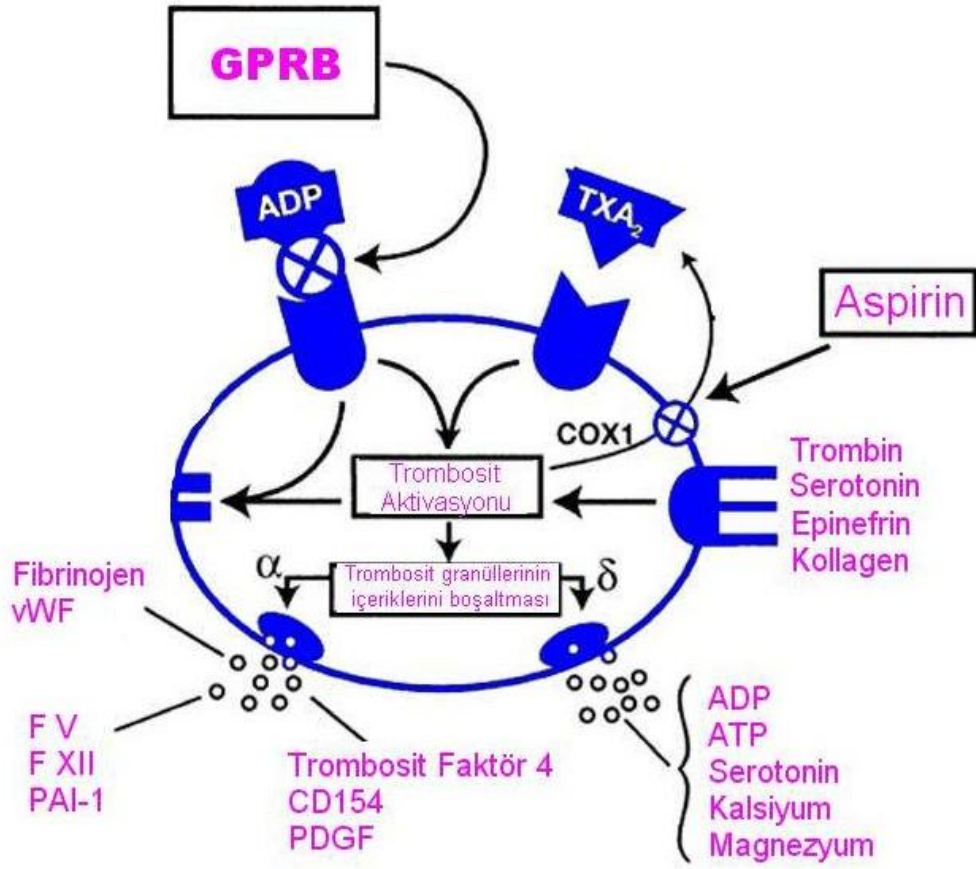
Trombosit membranı da diğer hücreler gibi çok özel bir yapıya sahiptir. Trombosit membranında çeşitli plazma proteinlerine ve de hemostatik sistemle ilgili diğer parametrelerle trombosit fonksiyonlarını yapmak üzere ilişkiye girecek çeşitli reseptörler vardır. Bu reseptörler glikoprotein yapısında olan ve membrana değişik yapıda serpilmiş membran proteinleridir.

Trombosit fonksiyonlarında membran proteinlerinin rolü önemlidir. Primer hemostazda trombositler damarın hasar gören bölgesine yapışır ve adezyon görevini yaparlar. Çeşitli agonistlerin de burada trombositleri uyarmasıyla sekresyon ve agregasyon fonksiyonları ile kanayan bölgede tıkaç oluştururlar.

Trombosit membranında bulunan çeşitli glikoproteinler için monoklonal antikolar üretilmiştir. Bu antikor çalışmaları membran proteinlerin tanınması ve fonksiyonları hakkında büyük ilerlemeler kaydetmiştir.

Trombosit organellerinin ya da membran proteinlerinin defektif olması yani adezyon, sekresyon agregasyon görevlerini yapamaması kanama ile seyrederek. Bunun aksi durumları yani pıhtılaşmaya meyil gösteren aterosklerozlu hastalardır. Bu hastaların trombositlerinin yapısı ve fonksiyonları geniş olarak incelenmiş ve normalden farklı bulgular elde edilmiştir. Bu da bu tür hastalarda pıhtıya yani trombüse meyli arttırarak kalp damar hastalıklarının oluşumuna neden olmaktadır.

Akut miyokard infarktüsünün tedavisinde glikoprotein reseptör antagonistleri kullanılmaktadır. Glikoprotein reseptör blokerleri (GPRB) adı ile bilinen bu tür ilaçların trombosit agregasyonunu inhibe ettiği gösterilmiş ve tedavi alanına girmiştir. Her türlü trombosit aktivasyonunda bu tür ajanların trombositler arasına girerek kümeleşmeyi önlediği anlaşılmıştır. Günümüzde infüzyon şeklinde uygulanan 3 tip GPRB lerinden söz edilmektedir. Aspirin ve standard heparin yanında GPRB türlerinin kullanılması önerilmektedir. Bu uygulamalarda görülen kanama riskinin GPRB'ye değil de birlikte verilen heparine bağlı olduğu bildirilmiştir. Aşağıda reseptör blokerlerinin trombosit sekresyon mekanizmasına etkisi şematik olarak görülmektedir (şekil 9).

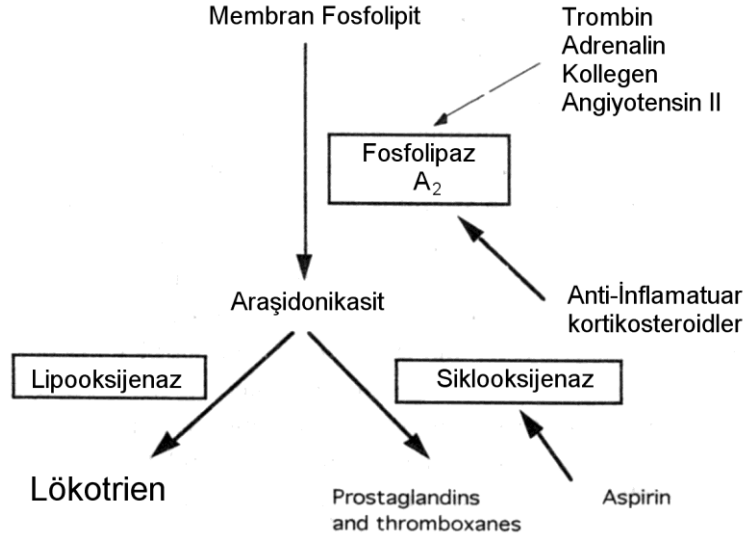


Şekil 9: Çeşitli Uyarıcılarla Trombosit Granül İçeriklerinin Aspirin ve GRPB İle İnhibisyonu (69)

GRPB (glukoprotein reseptör blokerları) COX1(siklooksijenaz inhibitörü)

Trombositlerde ve diğer hücrelerdeki siklooksijenazlar asetilsalisilik tarafından (aspirin) irreversibl olarak inhibe edilir (şekil 10). Bu taktirde ilgili fonksiyonlar yapılamaz Trombositlerde de trombaksan meydana gelemez. Trombaksan güçlü bir agregasyon yapıcıdır. Aspirin ile bu maddenin oluşumu inhibe edildiğinde trombositlerin agregasyonu yani kanamalara karşı koruma sistemi de inhibe edilmiş olur. Bunun başka bir ifade şekli, gerektiği zaman trombositler hemostatik sistemdeki kanamayı durducu görevini yapamazlar. Şekil 10’ da membran fosfolipidlerinden araşidonik asidin meydana gelmesini sağlayan uyarılar ve aspirinin etkisi görülmektedir. Aspirinin bu etkisinden dolayı, herhangi bir cerrahi müdahale ya da diş çekimi yapılacağı zaman hastalara aspirin alıp almadığı sorulur. Eğer aspirin almış ise bu etki, yani moleküllerin asetilasyonu, trombositlerin yaşam

ömrü olan 7-9 gün kadar sürebilir. Trombositler glikoprotein sentezi yaptığı halde protein sentezi yapmazlar. Megakaryositlerden kazanmış oldukları protein ve enzimlerle yaşam ömürlerini tamamlarlar. Bu nedenle asetilasyon gibi bir etki yaşam ömrü kadar devam eder.



Şekil 10: Uyarıdan sonra membran fosfolipidlerinden araşidonik asit ve prostoglandinlerin meydana gelişi ve aspirinin inhibisyonu(3)

Eikasanoitlerin trombosit agregasyonunda önemli etkileri vardır. Trombaksan A2 (TXA2) aktif bir trombosit agregasyon ajanıdır. Trombaksan B2 ise inaktif stabil bir üründür. Trombaksan diğer hücrelerde de bulunur. Tavşan aortundan elde edilen trombaksanın güçlü bir kontraksiyon yapıcı ajan olduğu anlaşılmıştır.

Eikasanoidlerin trombosit agregasyonundaki etkisi şöyle özetlenebilir:

Trombositler önce, trombin, kollagen gibi ajanlarla uyarılır ve membran fosfolipitlerinden araşidonik asidin meydana gelmesi sağlanır. Daha sonra, araşidonatın oksijenasyonu ve siklizasyonu ile PGH₂ oluşur. Bunu Trombaksan A2 oluşumu takip eder. Trombaksan A2 kalsiyumun intraselüler depolardan mobilizasyonunu sağlar. Açığa çıkan kalsiyum trombosit sitoplazmasında iki şekilde etkili olur. Bunlar;

1-Hücreiçi granüllerden ADP, serotonin ve diğer ajanların çıkmasını sağlar,

2-Trombosit adenilat siklazı inhibe eder ve trombosit içi cAMP düzeyinin düşmesini sağlar.

Trombositlerde lipooksijenaz yolu da vardır. Fakat trombosit fonksiyonları ile doğrudan ilgili olan siklooksijenaz yolu olduğu için araştırmalar siklooksijenaz yolu üzerine yoğunlaşmıştır.

Trombositler aterosklerozun patogeneğinde etkin rol oynarlar. Aterosklerozun patogeneğinde lipid metabolizmasının önde gittiği kimi araştırmacılar tarafından kabul edilir. Bu doğrudur. Fakat aterosklerozun patogeneğinde trombusun etkisini yok saymak da mümkün değildir. Aterosklerozu önlemek için, bir taraftan lipid metabolizması diğer taraftan hemostatik sistem metabolizmasının net anlaşılması gerekir.

Aterosklerotiklerde total membran fosfolipidleri ve prostaglandin metabolik yolunda artış görölmüştür. TXA2 ve PGI2 yönünden incelendiğinde aterosklerozlu olgularda TXA2' nin normale göre ciddi bir artış gösterdiği bilinir. cAMP düzeyleri de trombosit metabolizması yönünden önemlidir ve aterosklerozda normale göre düşüktür.

Trombosit Agregasyonu

Trombosit agregasyonu, çeşitli aganositler tarafından indüklenen ve hücrede çeşitlibiyokimyasal ve morfolojik değişiklikler yaratan bir durumdur ve kısaca trombositlerinbirbirlerine yapışması olarak tanımlanabilir. Zedelenmiş damar duvarı üzerine trombositlerin adezyonuyla oluşan geçici hemostatik tıkaç üzerinde trombositler birbirlerine yapışarak kümeleşirler. Trombosit agregasyonu, damarda oluşabilecek bir yaralanmadan sonra trombositlerin o bölgedeki adezyonundan sonra başlar. Adezyon ve agregasyon olaylarının gerçekleşebilmesi için kollagen gereklidir. Kollagenle temas edildikten sonra trombositlerde şekil değişikliği ile beraber içlerinde bulunan granüller merkezde toplanır. Membran ile granüller arasında kanaliküler sistem meydana gelir. Dışarıya sekresyon olur. Bu sekresyon da agregasyonu sağlar yani trombositler biraya gelir. Kollagen gibi, ADP, trombin ve adrenalin de trombosit membranındaki spesifik membran proteinlerine bağlanarak agregasyonu oluşturmak için bir seri reaksiyonu başlatır. Burada meydana gelen

çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar trombositlerde şekil değişikliğine, salgılamaya ve agregasyona neden olur.

Trombositlerin zedelenmiş damar duvarına ve başka trombositlere yapışmasını sağlayan membran glikoproteinleridir. Membran proteinleri sodyum dodesil sülfat polikrilamid jel elektroforezi ile incelenmiş olup I, II, III... diye adlandırılmıştır. Bunlardan agregasyonda en önemli olanı GP (gliko protein) IIB/IIIA kompleksidir. GP Ib'nin ise trombositlerin subendotelyal yüzeye yapışmasında önemli olduğu belirtilmiştir. Trombositlerin aktive olmaları, bir yüzey reseptörü olan GP IIB/IIIA ile fibrinojen, fibronektin ve vWF'ün temas etmelerine neden olmaktadır. Bu adeziv makromoleküller, trombositler arasındaki bağlantıyı sağlarlar ve agregasyon sürecinin temelini oluştururlar.

Agregasyon, ajanların özgül reseptörlere bağlanmasıyla başlar. Trombositlerin çeşitli ajanlarla uyarılmasından sonra GP IIB-IIIA kompleksi hücreye Ca ++ girişi için bir kanal açar. Bu durum reseptörlerde fibrinojen molekülüyle bağlanmasını kolaylaştırarak, bir biçimsel değişikliğe yol açmaktadır. GP IIB-IIIA kompleksinin trombosit fibrinojen reseptörü olduğu ileri sürülmektedir. Trombosit fibrinojen reseptörleri trombosit agregasyonunun asıl fizyolojik belirleyicisidirler. Trombositlerin inaktif durumunda GP IIB-IIIA kompleksi fibrinojen yapışmasına engel pozisyonda iken, aktivasyonu takiben fibrinojenin yapışmasını sağlayan pozisyona geçmektedir. Sonuçta aktif iki trombosit, GPIIB-IIIA kompleksleri arasında fibrinojen köprüleriyle birbirlerine yapışırlar.

Trombosit membranına bir ajanın bağlanmasıyla birlikte trombositte degranülasyon da başlar. Degranülosyonda, trombositler granül muhtevalarını dışarıya boşaltırlar. Bu trombositlerden salınan sekresyon ürünleri, komşu trombositlerin de 3 ayrı metabolik yolla aktive olmalarını sağlarlar.

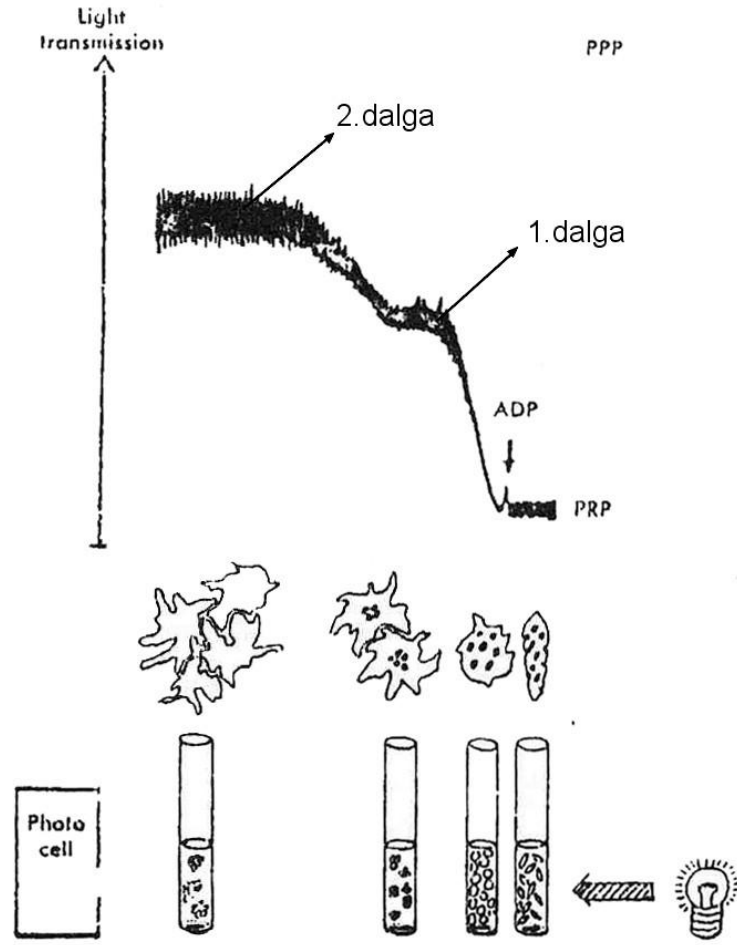
Trombosit dens granüllerinden salınan ADP ve serotonine bağlı olarak fibrinojen ve vWF'ün kendi reseptörüne bağlanması uyarılır. Kollajen ve trombin salınımı ile trombosit aktive edici faktörün uyarılması ve bu yolla fibrinojen-reseptör etkileşimi sağlanır. Bu yol, aterosklerotik plak rüptürü sonrası, trombosit agregasyonunda önemli rol oynamaktadır.

Tromboksan sentetaz yoluyla oluşan TXA₂, hücre içi Ca⁺⁺ mobilizasyonunun artırarak GP I₂/III₂ reseptöründe yapısal değişikliklere neden olur. Güçlü bir trombosit agonisti olan TXA₂, aynı zamanda güçlü bir vazokonstriktördür. Deneysel çalışmalar in vitro trombosit agregasyonunun damar zedelenmesini takiben 15 saniye içinde gerçekleştiğini göstermektedir.

Trombosit agregasyonunun mekanizmasıyla ilgili farklı yollar vardır. ADP fosfatidil inozitolu de içine alan bir dizi reaksiyon zincirinin içinde yer alır. Burada membranda fibrinojenin bağlanacağı bölgeyi açığa çıkarmak önemlidir. Fibrinojen trombosit agregasyonu için gereklidir. Trombosit membran glikoproteinlerinden GP I₂ ve III₂ agregasyon için kalsiyum ve fibrinojen ile kompleks yapar. Trombastenide agregasyon olmaz çünkü fibrinojen ve kalsiyum ile kompleks yapacak membran glikoproteinleri yoktur.

Fibrinojen trombositler arasında bir köprü oluşturur. Küçük dozda da olsa kollagen trombosit membranından araşidonik asid salınmasına ve TXA₂'nin meydana gelmesine neden olur. Bu da ADP salınımını ve kalsiyum akışını sağlar. Yüksek dozda kollagen doğrudan doğruya ADP'yi trombositlerden salgıatabilir. Düşük dozda trombin ADP ve araşidonik asid salgısı sağlayarak agregasyona neden olur. Trombin konsantrasyonu fazla olduğunda ise TXA₂ ve ADP'den bağımsız yolla agregasyon meydana gelir. Bu yol da PAF yoludur.

Trombosit agregasyonunun ölçülmesi için birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerde prensip trombositlerin in vivo şartlarda birbirine yapışmasıdır. Born ve O'Brien tarafından tarif edilen turbidometrik yöntemde, sitratla alınan kandan elde edilen trombosit zengin plazma (PRP) 37 derecede sabit hızla döner. Bu sistem agregometre denilen alet ile sağlanır. Aşağıdaki şekilde görüldüğü gibi trombosit zengin plazmaya ADP, adrenalin, kollagen gibi agonistlerin ilavesi ile agregasyon başlayınca, kümeleşmeler sebebiyle aletten ışık geçirgenliği başlangıca göre bir hayli artar ve kümeleşme miktarı ile orantılı olarak eğriler çizilmeye başlar. Bu eğriler diğer tarafta kaydedilir.



Şekil 11: Trombosit Agregasyonu Oluşumunda Gerçekleşen Olaylar ve Işık Geçirgenliği Doğrultusunda Agregasyonun Kademeli Şekilde Oluşumu (4)

Çeşitli uyarımlarla elde edilen agregasyon eğrileri de çeşitli olur. Eğer yukarıdaki şekildeki gibi uyarıcı olarak ADP kullanılmışsa oluşan eğri bifaziktir. Birinci faz ADP' nin trombositlere doğrudan etkisini gösterir. İkinci faz ise trombosit granüllerindeki endojen ADP' nin salınımı ile meydana gelen fazdır. Bu fazlar 1. ve 2. dalga diye de isimlendirilir. ADP konsantrasyonu daha yüksek konsantrasyonlarda ise elde edilen agregasyon eğrisi değişir. Eğer uyarıcı olarak kollajen kullanılmış olsaydı monofazik bir eğri elde edilirdi. Yani sekresyon gösteren birinci dalga görülmezdi.

2.5.3. Hemostatik Sistemde Pıhtılaşma Proteinleri (4)

Pıhtılaşma sistemi; multikomponent enzim sistemi, kofaktörler ve inhibitörleri içeren kompleks bir sistemdir. Kaskad veya şelale adı verilen bir akış şeması vardır.

Normal hemostazda damar hasarını takiben fibrinojenin fibrine dönüşmesinden sonra bir fibrin ağı oluşur. Bu fibrin ağı, trombositler tarafından oluşturulan primer hemostatik tıkaç etrafında olur. Burada amaç kanın damardan dışarı akmasını önlemektir.

Koagulasyon sekonder hemostaz olarak da isimlendirilir. Birincisi trombositler tarafından gerçekleştirilen pıhtıdır. Buna beyaz pıhtı da denir.

Sekonder hemostazla meydana getirilen fibrin oluşamaz ise kanamalar görülür. Sekonder hemostazda görev alan pıhtılaşma faktörleri romen rakamı ile gösterilir. Pıhtılaşma faktörlerinin numaralanması bulunuş sırasına göre olmuştur. Fibrinojen Faktör I (FI)' dir. Çünkü ilk bulunan pıhtılaşma faktörüdür. Pıhtılaşma mekanizmasının akış şeması şekil 12' de görülmektedir. Fibrinojenin keşfini (FII) adıyla protrombin takib etmiştir.

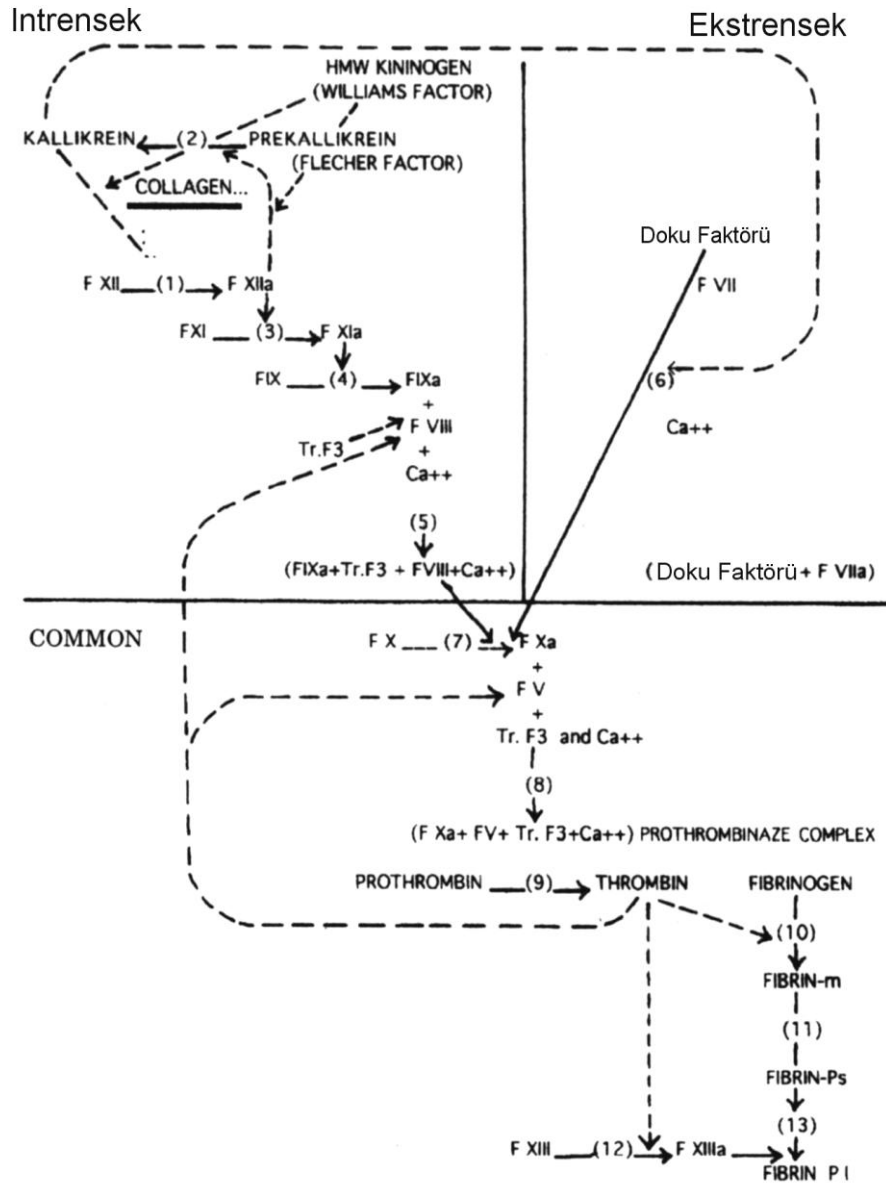
Pıhtılaşma şemasında görüldüğü gibi, pıhtılaşma faktörlerinin aktivasyonu iki şekilde olur. Intrensek ve Ekstrensek aktivasyon. Intrensek sistemde yer alan pıhtılaşma faktörleri; Fletcher Faktör adı ile de bilinen Faktör XII (F XII), Williams Faktör, FXI, FIX, FVIII' dir. Trombositlerde bulunan Faktör 3 (Tr F3) de intrensek sistemle pıhtılaşmanın olması için gereklidir. Trombosit içindeki faktörler romen rakamı ile değil normal rakamlarla gösterilir.

Intrensek sistemi başlatan etken, kanda dolaşan F XII' nin endotel dışında yabancı bir yüzeyle karşılaşmasıdır. Bir damar hasarında bu yabancı yüzey, subendotel veya daha derin tabakalarda bulunan kollajendir. Kollagen hem F XII hem de trombositler için güçlü bir uyarıcıdır. Bu şekilde uyarılan F XII pıhtılaşma sisteminin başlaması için tetiği çekmiş olur. F XII, endotelde bulunan yüksek molekül ağırlıklı kininojen ile reaksiyona girer. Daha sonra prekallikrein ve F XI ile reaksiyona giren F XII, bu reaksiyonlar sonunda F XI' i aktifleştirmiş olur. Daha sonra F IX ve F VIII' in de katıldığı bir reaksiyonla Intrensek sistem kompleksi

oluşur. Bundan sonraki yol, ekstrinsek sistemin de takip edebileceği ortak yoldur. Bu şekilde pıhtılaşma proteinlerinde (faktörlerinde) meydana gelen aktivasyonlar ile fibrin oluşumuna kadar gidilmiş olur. Aktivasyon sırasında molekülden küçük bir peptid ayrılmış olur. Bu nedenle bu reaksiyonda rol alan bir önceki pıhtılaşma proteinleri kalsiyuma bağlı bir enzim görevini yapar. Kalsiyum pıhtılaşma sisteminin her kademesinde olması gereken bir iyonudur. Kalsiyum olmadığı zaman kan hiçbir şekilde pıhtılaşmaz. Bu nedenle laboratuarda çalışılmak için alınan kanların pıhtılaşması istenmiyor ise, sodyum sitrat, etilen diamin tetra asetik asid (EDTA) gibi, kanda kalsiyumu bağlayan ajanlar kullanılır. Bu nedenle belirli konsantrasyonda sodyum sitrat ve EDTA' lı çözeltiler laboratuarda antikoagulant olarak kullanılır. Çünkü laboratuvar analizi için alınacak kanlar ya düz kan yani antikoagülansız alınan kanlar ya da plazma denilen ve antikoagülanla alınan kanlardır.

Ekstresek pıhtılaşma sistemde doku faktörü için içine karışır. Doku faktörü (TF) eskiden tromboplastin adı ile anılırdı. Bütün hücrelerin membranlarında bulunan bir transmembran proteindir. Kana da dokulardan sızabilir fakat normalde sızmaması gerekir. Doku faktörü endotel hasarının olduğu bölgedeki dokudan sızarak pıhtılaşma sistemindeki Ekstresek yolu başlatır. Bu yol Intrensek yoldaki gibi karışık değildir. Burada etkin olan sadece Faktör VII (F VII)' dir. Doku faktörü F VII ile etkileşerek ekstrinsek sistem kompleksini oluşturur. Bu kompleksin oluşması için yine kalsiyum iyonu gereklidir.

Hem Intrensek yol kompleksi, hem de Ekstresek yol kompleksi Faktör X (F X) için substrattır. Bundan sonraki reaksiyonlarda; Faktör V (F V), trombosit faktör 3 (Tr F3), protrombin (F I) ve fibrinojen (F II) genel yolda fibrin oluşumuna kadar olan safhada görev yaparlar. Kalsiyum iyonu yine her safhadaki reaksiyon için gereklidir.



Şekil 12: İntrensek ve Ekstrensek Pıhtılaşma Mekanizması (4)

Tablo 4: Pıhtılaşma Faktörlerinin Bazı Özellikleri (4)

Faktörler	Mol Ağ.	Yarılanma Ömrü	Miktar (mg/dl)	Ba SO ₄ 'a Absorpsiyon	Sentez Yeri	Pıhtı Esnasında Harcanması	Spesifik Özellikleri
Fibrinojen	340.000	77-108	150-400	Yok	K.C.	Var	TS.
Faktör V	330.000	12-36	0.5-1.0	Yok	K.C.	Var	TS.
Faktör VIII:C	200.000	12	<0.01	Yok	K.C.	Var	TS.
vWF	800.000	24	0.51	Yok	Endotel	Var	-
Faktör XIII	320.000	108-168	2.5	Yok	K.C.?	Yok	TS.
Protrombin	68.000	60-68	10-15	Var	K.C.	Var	TS.
Faktör VII	48.000	4-6	0.1	Var	K.C.	Var	Vit. K
Faktör IX	57.000	12	0.01	Var	K.C.	Yok	Vit. K
Faktör X	58.000	24-48	0.75	Var	K.C.	Yok	Vit. K
Protein C	62.000	6	0.5	Var	K.C.	Yok	Vit. K
Protein S	69.000		0.01	Var	K.C.	Yok	Vit. K
Faktör XII	80.000	52-60	0.4	Yok		Yok	Temas
Faktör XI	160.000	48-84	12	Yok	K.C.?	Yok	Temas
Prekalligrein	85.000	48-52	0.3	Yok	?	Yok	Temas
HMWK	200.000	156	2.5	Yok	?	Yok	-

2.5.4. Fibrinolitik Sistem (4)

Hemostatik sistemde meydana gelen pıhtının belirli bir zaman sonra erimesi ve o bölgedeki kan dolaşımının normale dönmesi gerekir. Fibrin ve yaralanan damar duvarının iyileşmesinde matriks görevi yapar. Fibrinin görevi bitince fibrinolitik sistem ile pıhtı çözünen parçalara ayrılarak uzaklaştırılır. Plazminojen fibrinolitik sistemde görev alan tek proenzimdir. Plazminojen çeşitli aktivatör (tPA, uPA) ve inaktivatörlerin etkisi ile plazmine döner. Plazmin fibrinojeni, ya da fibrini

parçalayarak parçalanma ürünlerine (fdp, D-dimer) dönüştürür. En güçlü pıhtı çözücü proteolitik enzim olan plazminin plazminojenden dönüşümünde endotel hücrelerinin önemli etkisi vardır.

2.6. HİPERLİPİDEMI

Hiperlipidemi; plazma trigliserid veya kolesterol düzeylerinin veya her ikisinde birden yükselmesidir. Lipidler suda çözünmedikleri için plazmada lipoproteinler ile taşınırlar. Bu nedenle hiperlipidemi; plazma lipoprotein düzeylerindeki artışa da bağlıdır. Artmış yapım veya dolaşıma salınım ya da azalmış klirens veya dolaşımdan uzaklaştırılma nedeniyle bir veya daha fazla lipoprotein sınıfı kanda birikebilir; bazı durumlarda her iki durum birlikte bulunabilir (70).

2.6.1. Primer Hiperlipidemi

Primer hiperlipidemi; beslenmeye ve sıklıkla lipoprotein metabolizması ile ilgili proteinlerdeki (apolipoproteinler, reseptörler, enzimler veya kofaktörler) değişikliklere bağlıdır. Genetik defektlere bağlı olarak ortaya çıkan bu tarz değişiklikler lipid metabolizmasının primer bozuklukları; ailesel hiperkolesterolemi, ailesel defektif apolipoprotein B-100, ailesel kombine hiperlipidemi, ailesel disbetalipoproteinemi, lipoprotein lipaz eksikliği, apolipoprotein C-II eksikliği, ailesel hipertrigliseridemi ve ailesel hipoalfalipoproteinemi olarak sınıflandırılır (71,72).

2.6.2. Sekonder Hiperlipidemi

Diabetes mellitus veya hipotiroidizm gibi lipoprotein metabolizmasını değiştiren diğer faktörler de plazma lipoprotein düzeylerini arttırmırlar; bu faktörler lipid metabolizmasının sekonder bozuklukları olarak sınıflandırılır. Sekonder hiperlipidemiler nispeten daha az görülür (73).

2.6.3. Deneysel Hiperlipidemi

Hayvanlar üzerinde yapılan deneyler, diyetteki yağ ve kolesterol ile ateroskleroz ve plazma kolesterol düzeyleri arasındaki ilişki ile ilgili daha geniş fikir sahibi olmamızı sağlamıştır. Aterosklerozu incelemek için mümkün olan her hayvan

kullanılmış, bu hayvanların hemen hemen hepsi, doymuş yağ ve kolesterol açısından zengin diyetlerle beslendiklerinde hiperkolesterolemi gelişmiş ve lipid birikimi ile karakterize olan arter lezyonları oluşmuştur. Bununla birlikte aterosklerotik lezyonlar meydana geldikten sonra, plazmadaki kolesterol düzeyi düşürüldüğü takdirde, bu hayvan modellerinde lezyonlar gerilemiştir. Kandaki kolesterol düzeyleri ya doymuş yağ ve kolesterolün diyetten çıkarılması ya da hayvana aterojenik diyet uygulamakla birlikte kolesterol düşürücü bir ilaç verilmek suretiyle de düşürülmüştür. Yang ve ark (74) %1.5 g kolesterol, % 0.25 g kolik asit, % 7.5 g domuz yağı ve % 75 g esansiyel diyet ihtiva eden pellet yem ile 7 günde hiperlipidemi oluşturmuşlardır. Wojcicki ve ark (75) sıçanlarda kokonut oil (10g/kg/gün), kolesterol (4g/kg/gün) ve kolik asit (0.2 g/kg/gün) ihtiva eden diyet uygulamasında 14 gün sonunda hiperlipidemi oluşturmuştur. Horvath ve arkadaşları (76) sıçanlarda günlük %2 gram kolesterol, % 0.5 g kolik asit ve % 20 g ayçiçek yağı ihtiva eden diyet ile 9 günde hiperlipidemi oluşturmuşlardır. Dinçer ve arkadaşları (77) % 0,49 (0.5) g kolik asit, % 1,63g kolesterol, % 16,3 g ayçiçek yağı ihtiva eden diyetle 10 günde hiperlipidemi oluşturmuşlardır.

2.7. APOLİPOPROTEİNLER (70-74)

Karaciğerde sentezlenen veya barsaklardan diyetle alınan lipitler sulu ortamda çözünemediklerinden plazmada lipoprotein adı verilen makromoleküler kompleksler halinde taşınırlar. Lipoproteinler merkezde polar olmayan lipitleri (trigliserit ve kolesterol esterleri) ve yüzeye yakın kısımlarına yerleşmiş daha polar lipitleri (fosfolipit ve serbest kolesterol) içeren küresel partiküllerdir. Yüzeylerinde bir ya da daha fazla apolipoprotein olarak adlandırılan özgün proteinler içerirler.

İnsan plazmasındaki lipoproteinlerin yapılarında en az on farklı apolipoprotein vardır. Bu apolipoproteinlerin molekül ağırlıklarını, lipoprotein sınıfını ve işlevlerini gösteren Tablo 5' de verilmiştir. Apolipoproteinler büyüklüklerine, özgül antikorlar ile tepkimelerine ve lipoprotein sınıflarındaki karakteristik dağılımlarına göre ayrılırlar. Bu proteinlerin bileşenleri sinyal olarak davranarak lipoproteinleri özgül dokulara yönlendirmede veya lipoprotein yüzeyinde görev yapan enzimleri aktifleştirmede etkilidirler.

Tablo 5: İnsan Plazması Lipoproteinlerinin Apolipoproteinleri (70)

Apolipoprotein	Molekül Ağırlığı	Lipoprotein Sınıfı	İşlevi
Apoprotein A-I	28,331	HDL	LCAT'ı aktiveştir; ABC taşıyıcısı ile ilişki kurar
Apoprotein A-II	17,380	HDL	Bilinmiyor
Apoprotein A-IV	44,000	Şilomikronlar, HDL	Bilinmiyor
Apoprotein B-48	240,000	Şilomikronlar	Bilinmiyor
Apoprotein B-100	513,000	VLDL, HDL	LDL reseptörüne bağlanır
Apoprotein C-I	7,000	VLDL, HDL	Bilinmiyor
Apoprotein C-II	8,837	Şilomikronlar, VLDL, HDL	Lipoprotein lipazı aktiveştir
Apoprotein C-III	8,751	Şilomikronlar, VLDL, HDL	Lipoprotein lipazı inhibe eder
Apoprotein D	32,500	HDL	Bilinmiyor
Apoprotein E	34,145	Şilomikronlar, VLDL, HDL	VLDL' nin ve şilomikron kalıntılarının klirensini tetikler

HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein; LDL: LDüşük dansiteli lipoprotein; VLDL: Çok düşük dansiteli lipoprotein; LCAT: lesitin kolesterol açıl transferaz.

Her bir lipoproteininin yapısında bir veya daha fazla apolipoprotein vardır. Bu apolipoproteinler ABC nomenklatürüne göre isimlendirilirler. Her bir lipoproteininin apolipoproteinini kendine özgü olarak fazlaca bulunur. HDL' nin major apolipoproteinini A' dır. LDL ve VLDL' nin ki ise B' dir. Şilomikronlardaki apoprotein Apo B-48 olarak bilinir. Apo B-100 olarak bilinen LDL ve VLDL de bulunanın %48' i kadar küçüktür. Bu nedenle bu isim verilmiştir. Apo B-48 barsaklarda, Apo B-100 ise karaciğerde sentez edilir. Apo B, apolipoproteinler içinde en uzun polipeptid zincirine sahip olanıdır. 4536 aminoasit içerir. Apo B-48 ile aynı mRNA' dan sentezlenir. Apo B' nin karbonhidrat kısmı molekülün %5' ni oluşturur. Bu yapı içinde mannoz, galaktoz, fruktoz, glukoz, glukozamine ve sialik asid vardır. Apo-C çeşitli altgruplar içerir. Molekül yapısı olarak Apo B' ye göre daha küçüktür. Lipoproteinler arasında serbestçe dolanabilir. Apolipoproteinlerin görevleri şöyle sıralanabilir:

- Enzimlerin kofaktörleridir.
- Lipoproteinlerin yapısının bir parçasıdır. Yani yapısal görev yapar.
- Dokulardaki lipoprotein reseptörlerine ligand görevi yapar. Yani doku reseptörleri lipoproteinleri ilgili apolipoproteinden tanır ve böylece lipoprotein içeriği dokuya girmiş olur. Apo B-100 ve Apo E, LDL reseptörü için ligandır. Apo A-1 ise HDL reseptörü için ligandır.

Apoproteinlerin bilinen bazı özellikleri aşağıdaki gibidir:

Apo A-1: Molekül ağırlığı 29.000 civarındadır. Şilomikron ve HDL yapısında bulunur. Lesitin kolesterol açıltransferazın (LCAT) aktivatörüdür.

Apo A-II: Molekül ağırlığı 17.000 civarındadır. Şilomikron ve HDL' nin yapısında bulunur. HDL yapısı için önemlidir. Heparik lipazın etkisini hızlandırır.

Apo A-IV: Molekül ağırlığı 46.000 civarındadır. Trigliseridlerden zengin lipoproteinlerin içinde bulunur. Diğer görevleri bilinmemektedir.

Apo B-48: Molekül ağırlığı Apo A' lara göre büyüktür. Molekül ağırlığı 241.000 civarındadır. Şilomikronların yapısında bulunur. İntestinal epitelinde Apo B-100 geni ile üretilir. Apo B-100' den kopmuş bir parça gibidir.

Apo B-100: Apo B-100' ün molekül ağırlığı 513.000 civarındadır. LDL' nin major proteinidir. Görevi LDL resptörüne bağlanmaktadır. Yani ligand görevi yapar.LDL' nin dışında VLDL ve IDL' de bulunur.

Apo C-1: Molekül ağırlığı 7.600 civarındadır. LCAT' ı aktive ettiği sanılmaktadır. Şilomikron, VLDL, IDL ve HDL de bulunur.

Apo C-II: Molekül ağırlığı 8.916' dır. Lipoprotein lipazı aktifleştirir. LDL hariç diğer lipoproteinlerde bulunur.

Apo C-III: Molekül ağırlığı 8.750 civarındadır. Lipoprotein lipazı Apo CII' nin aksine inhibe eder. LDL hariç diğer lipoproteinlerde bulunur.

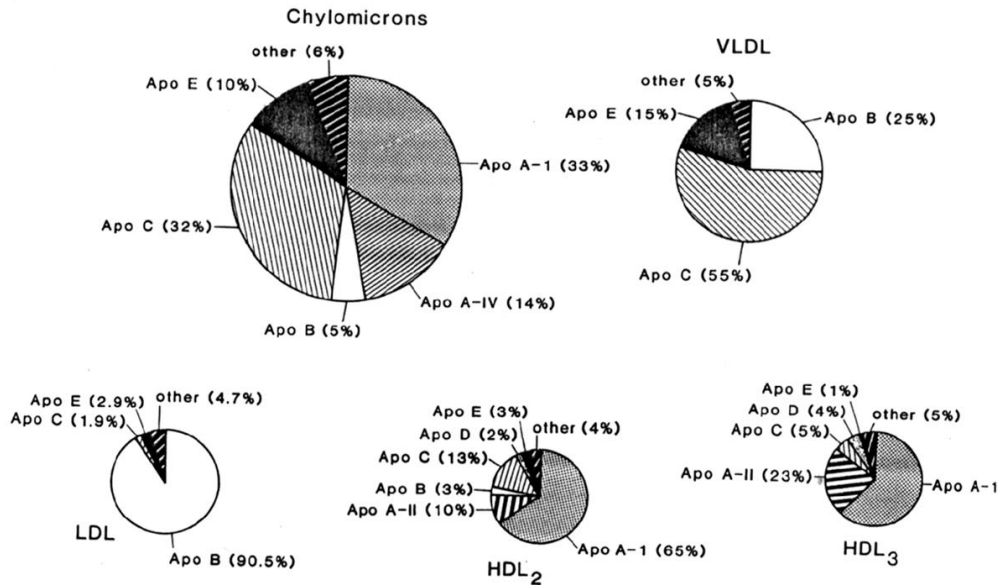
Apo D: Molekül ağırlığı 33.000'dir. HDL'de bulunur. LCAT ile ilgili olduğu sanılmaktadır.

Apo E: Molekül ağırlığı 34.000 civarındadır. En azından 3 alleli olduğu ve her birinin çeşitli izoformları olduğu bildirilmektedir. Alzheimer hastalığı ile ilgili olduğu bildirilmiştir. Şilomikron kalıntılarında, VLDL de, IDL ve HDL' de bulunur.

Apo H: Molekül ağırlığı 50.000 civarındadır. Şilomikronların yapısında bulunur. Trigliserid metabolizmasında görevli olduğu sanılmaktadır. Glikoprotein I olarak da bilinir.

Apo (a): En azından 19 farklı alleli olduğu bilinmektedir. Protein boyutu büyüktür. Molekül ağırlığı 300.000 ile 800.000 arasında değişir. LDL yapısında bulunur. Apo (a), Apo B-100' e disülfid bağları ile bağlanarak bir kompleks oluşturur. Bu kompleks Apo (a) olarak isimlendirilir. Moleküler yapısı plazminojenen benzer. Kolesterolü damar hasarının olduğu yere bıraktığı için koroner kalp hastlıkları için önemli bir risk olarak kabul edilmektedir.

CETP: Kolesterol ester transfer protein olarak bilinen bu molekül HDL ile yakın ilişki içindedir ve kolesterol esterlerini transfer etmek için gereklidir. Ancak apolipoprotein olarak isimlendirilmemiştir. Aşağıdaki şekilde apolipoproteinlerin lipoproteinler içindeki oranları görülmektedir.



Şekil 13: Apoproteinlerin Değişik Lipoproteinlerdeki Dağılımı (70)

2.8. KARACİĞER VE YAĞ DOKUSU (78,79)

Karaciğer, yetişkin bir insanda vücut ağırlığının yaklaşık %2'sini oluşturur. Majör hücre tipi olan hepatosit epitelyum kaynaklıdır. İntestinal kanal ve genel dolaşım arasında yerleşik olan karaciğer, metabolik dengenin sağlanmasında önemli bir role sahip olan pankreasla da ilişkilidir. Hepatositlere giren lipidlerin yağ asidi içerikleri aşağıda özetlenen yolları izler.

1) Yağ asitleri karaciğer lipidlerine dönüştürülür.

2) Birçok koşulda yağ asitleri karaciğerde majör oksidatif yakıt olarak iş görür. Yağ asitleri Asetil-CoA ve nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) sağlamak için okside edilebilir. Asetil-CoA oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP elde etmek için sitrik asit siklusu aracılığıyla okside edilir.

3) Yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu aşırı miktarda asetil-CoA açığa çıkar ve gerekli olmayanlar karaciğer tarafından keton cisimlerine dönüştürülür. Bu keton cisimleri bazı periferel dokularda örneğin kalp, beyin veya uzun süreli açlıkta enerji kaynağı olarak iş görebilir.

4) Yağ asitleri ve glukozdan türetilen bazı asetil-CoA' lar membran biyosentezi için gerekli olan kolesterol biyosentezinde kullanılır. Kolestereol aynı zamanda steroid hormonların ve lipidlerin sindirim emiliminde esansiyel olan safra tuzlarının da prekürsörüdür.

5) Yağ asitleri plazma lipoprotein bünyesindeki fosfolipidler ve trigliseridlere dönüştürülür. Kolesterol ve kolesterol esterleri de aynı zamanda lipoproteinler şeklinde taşınırlar.

6) Bazı serbest yağ asitleri kanda albumine bağlanarak taşınır ve bu sayede kalp ve iskelet kası için majör yakıt olarak iş görürler. Bu yüzden karaciğer vücudun dağıtım merkezi olarak hizmet eder. Bununla birlikte karaciğer yabancı organik bileşikler örneğin; ilaçlar, yiyecek katkı maddeleri ve koruyucularının da enzimatik detoksifikasyonunda aktiftir.

Yağ dokusu deri altında, kan damarlarının etrafında ve abdominal kavitede geniş ölçüde bütün vücutta dağılmıştır. Yağ dokusu yetişkin bir insanın vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur. Bu ağırlığın yaklaşık %65'ini de trigliseridler oluşturmaktadır. Yağ dokusu metabolik olarak çok aktiftir. Vücuttaki diğer hücre tiplerine benzer şekilde yağ hücreleri piruvat ve yağ asitlerini okside etmek için sitrik asit siklusunu kullanan ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu yapan aktif glikolitik metabolizmaya sahiptir. Fazla miktarda karbonhidrat alımı esnasında, yağ dokusu glukozu piruvat ve asetil-CoA aracılığıyla yağ asitlerine dönüştürülebilir. Bununla birlikte insanlarda çoğu yağ asidi sentezi karaciğer hücrelerinde meydana gelir, yağ hücrelerinde meydana gelmez. Özellikle yağdan zengin bir diyetten sonra, yağ hücreleri karaciğer ve intestinal kanaldan gelen trigliseridleri depolar. Yakıt ihtiyacı gerektiğinde, yağ dokusunda depolanan trigliseridler yağ hücreleri içindeki lipazlar tarafından serbest yağ asitlerinin oluşturmak üzere parçalanırlar. Daha sonra bu serbest yağ asitleri kan akımı aracılığıyla iskelet kası ve kalbe gönderilebilir.

2.9. LİPİD PEROKSİDASYONU VE ATEROSKLEROZ (26,70,80)

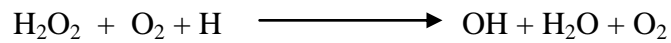
LDL'in modifikasyona uğramasında lipid peroksidasyonu önem taşır. Pek çok hastalığın gelişmesinde rol oynayan lipid peroksidasyonu çok doymamış yağ asitleri içeren yağların, serbest oksijen radikalleri tarafından oksidatif olarak bozulmasıdır. Hücre membranlarında bulunan çeşitli çok doymamış yağ asitleri böyle bir bozulma reaksiyonu ile; peroksidlere, aldehidlere, alkollere, hidroksi yağ asitlerine dönüşürler. Yani serbest oksijen radikallerinin bulunduğu ortamlarda hücredeki moleküller ve hücrenin çeşitli organelleri zarar görür. Bu hasarlar: membran hasarı, DNA hasarı, hücre içi organların membranlarının hasarı, mitokondri organellerinin hasarı, enzimler ve enzim olmayan çeşitli proteinlerin hasarı olarak sıralanabilir.

Lipid peroksidasyonuna yol açan serbest oksijen radikalleri içinde kararsız yapı gösteren eşleşmemiş elektronlar vardır. Oksijenli solunum yapan bütün canlılarda lipid peroksidasyonundan kaçmak mümkün değildir. Çünkü çeşitli metabolik yollarda meydana gelen oksido redüksiyon reaksiyonları esnasında serbest oksijen radikalleri az miktarda oluşur. Bu zararlı oluşumlar derhal hücrenin içinde

bulunması gereken antioksidan sistemlerle zararsız hale getirilir. Ancak bazı durumlarda (inflamasyon, iskemi, radyasyonla karşı karşıya kalmak, antibiyotik veya benzer tedavilerin uygulanması sırasında ve bilmediğimiz diğer bazı reaksiyonlarda) serbest oksijen radikalleri daha fazla üretilir. Hücrede mevcut olan savunma sistemleri fazla serbest oksijen radikalleri ile baş edemez hale gelirler ise, çeşitli dokularda lipid peroksidasyonuna bağlı hasarlar oluşur.

Lipid peroksidasyonuna yol açan serbest oksijen radikalleri içinde kararsız yapı gösteren normalden farklı elektronlar vardır. Atom numarası 8 olan oksijen atomunda 8 elektron bulunmaktadır. (Bir oksijen molekülünde $2 \times 8 = 16$ oksijen bulunur). Oksijen molekülünde aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir. Bu orbitallerdeki elektron değişimleri veya farklı yönlere dönmeler singlet oksijen adı verilen farklı şekilde görüleceği gibi normalden farklı olması ile oksijen radikalleri oluşur. Oksijenin 2P orbitalinde eşleşmemiş elektronlar veya ters dönüşlü elektronlar oksidan molekülleri oluşturur.

Yukarıda söylendiği gibi oksijenli solunum yapan canlılarda oksijene bağlı olarak meydana gelen reaksiyonlar sebebiyle oksidan moleküllerinden kaçmak mümkün değildir. En reaktif ve toksik etkili oksijen radikali hidroksil radikalidir. Doğal olarak organizmada meydana gelen hidrojen peroksid ile reaktif oksijen arasında meydana gelir.



Bunun gibi organizmada pek çok reaktif oksijen molekülleri olur. Bu tür moleküller metabolizma sırasında endojen olarak meydana gelebildikleri gibi, eksojen kaynaklı da olabilirler.

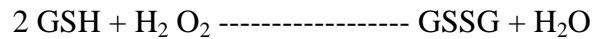
2.10. ANTIÖKSİDAN SİSTEMLER (26,80)

Hücre hasarının önlenmesinde antioksidanların önemli görevi vardır. Antioksidanlar superoksidler, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin oluşturdukları hasara karşı koruyucudurlar. Antioksidanlar reaktif oksijen türlerini temizlemek veya okside bileşikleri indirgemek yoluyla işlev yaparlar. Antioksidan moleküller serbest radikaller ile etkileşime girerek zincir reaksiyonunu sonra erdirirler, kendi elektronlarını vermek suretiyle serbest radikalleri nötralize ederler ve hayati molekülleri hasardan korurlar. Doğal antioksidanlar; enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar olmak üzere gruplandırılırlar. Superoksid dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon s transferaz mitokondiral sitokrom oksidaz enzim özelliği gösteren önemli antioksidanlardır. E vitamini, karotenoidler ve retinol, ubikinon, C vitamini, melatonin enzim olmayan antioksidanlardır. Katabolik son ürün olan bilirubin albumine bağlı yağ asitlerini lipid peroksidasyona karşı koruyan önemli antioksidan moleküllerden biridir. Ayrıca; ürik asid, seruloplazmin, transferin, ferritin, albumin, heptoglobulin-hemopeksin plazmada bulunan antioksidanlar arasında yer alır.

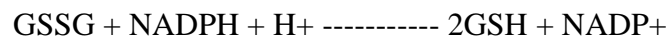
Glutatyon (GSH)

Glutatyon; glutamik asid, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir.

Glutatyonun serbest tiol grubu hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasını sağlar.



Yukarıdaki reaksiyonda glutatyon peroksidaz reaktif oksijen türlerini indirgemek ve hidrojen peroksidi suya dönüştürmek suretiyle hücreyi oksidatif hasara karşı korur.



Yukarıdaki reaksiyonda da glutatyon redüktaz NADPH'ın indirgeme kapasitesini kullanılarak indirgenmiş glutatyon oluşumunu sağlar.

2.11.4 SIALİK ASİD VE DOKU FAKTÖRÜ (81,82)

Son yıllarda yapılan çalışmalar serumdaki total sialik asid ölçümlerinin koroner arter hastalıkları için önemli risk faktörü olduğunu bildirmektedir. Sialik asid nöraminik asidin asetilenmiş türevidir. Sialik asid glikoprotein ve glikolipidlerin indirgenmeyen uçlarında terminal komponent olarak bulunur. LDL kolesterolün desializasyonunun ateroskleroz gelişiminde önemli olduğu ileri sürülmüştür. Kimi araştırmacılara göre sialik asid endotel hücreleri için koruyucu bir role sahiptir. Sialik asid birçok fizyolojik olaylarda etkindir. Hücrelerin birbiri ile interaksyonu, hücre proliferasyonunda sialik asidin önemli fonksiyonu vardır. Bu özelliklerine dayanılarak sialik asid akut faz reaktanı olarak da kabul edilmektedir. Özetle, çeşitli araştırmacılar sialik asidin kardiovasküler mortalite ile ciddi bir ilişkisi olduğunu, aterosklerozda belirleyici olduğunu bildirmişlerdir.

3. METOD VE MATERYAL

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Çalışmamızda kullandığımız kimyasal maddeler analitik saflıktadır. Kolesterol tiyobarbitürik asit, n-bütanol, o-fosforik asit, asetik asit, sülfürik asit Merck; 5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoikasit (DTNB), kolik asit Sigma; Oleik asit, Etilendiamin tetra asetik asidin sodyum tuzu Fluka; kullandığımız kitler ise temin edilmiştir.

3.2. KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

Elisa Cihazı	MedispecESR 200 Elisa Palete Reader
Santrifüj	Heraeus- Chtist-GmbH, 00902
Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
Hassas Terazı	Sartorius
Etüv	Nüve FN 500
Sterilizatör	Nüve EN 400
Distile su cihazı	Schott Gerate
Su banyosu (37C)	Boehringer Mannheim Precither-PFV
Su banyosu (100C)	Heizbad, Kermanlar, 34680
Derin dondurucu	AEG, -24C
pH Metre	710 A pH/ISE Meter
Otomatik pipetler	Gilson
Vorteks	Janke & Kunkel VF2
Magnetik Karıştırıcı	Ikamag, RH, Janke & Kunkel
Mekanik Karıştırıcı	Ika-Werk RW-14H
Elektronik kaba terazi	Scaltec SPB62

3.3. KULLANILAN DENEY HAYVANLARI VE OLUŞTURULAN GRUPLAR

Çalışmamızda Tübitak'dan temin edilen C57BL/6 tip 24 adet 2 aylık dişi fare kullanıldı.

Deney hayvanları 3 gruba ayrıldı.

- ApoB Konjugatı verilen grup
- Hiperlipidemik grup
- Kontrol grup

3.4. DENEY HAYVANLARININ BESLENMELERİ

Deney hayvanları gece ve gündüz sirkülasyonu korunarak beslenme ve su (musluk suyu) ihtiyaçlarının günlük olarak sağlandığı kontrollü laboratuvar şartlarında muhafaza edildi.

Yemlerin hazırlanması : Normal pellet yem ile beslenen Kontrol grupları hariç diğer grupların yemlerinin hazırlanması için toz halindeki normal yem Tablo 6’ da belirtilen oranlarda gerekli ilaveler yapıldı. Distile su eklenerek hamur haline getirildi ve silindir şekli verilerek etüvde kurutuldu.

Tablo 6: Laboratuvar şartlarında hazırlanan yemlerin içeriği

		Gruplar		
		Kontrol	Hiperlipidemik	ApoB Konj.
Yemlerin içeriği (%g)	Kolesterol		%1.63	%1.63
	Kolik Asit		%0.41	%0.41
	Ayçiçek Yağı		%16.3	%16.3
	Normal Yem	%100		

3.5. HİPERLİPİDEMİ OLUŞTURULMASI VE APO-B KONJUGATI VERİLMESİ

Hiperlipidemik grupta yer alan deney hayvanlarında, Tablo 6’ da gösterilen %1.63 g kolesterol, %0.41g kolik asit ve %16.3 g ayçiçek yağı içeren hiperlipidemik yem ile hiperlipidemi oluşturuldu. Gruptan oluşan deney hayvanları 3 ay boyunca Tablo 6’ da içerikleri belirtilen yemlerle beslendi. Deney gruplarından Apo B grubuna deneyin başında ve 1.haftada Apo-B konjugatı verildi.

3.6. KAN VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE İNCELENEN PARAMETRELER

Deney sonunda hayvanlardan kalp kanı alındı. Alınan kanlar 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi. Elde edilen serum örnekleri total lipid, kolesterol, LDL-kolesterol, Lipid Peroksidasyonu ve TF tayinlerinde kullanıldı.

Deney sonunda tayinlerde kullanılmak üzere alınan dokular; kalp, karaciğer, böbrek ve beyin çıkartılarak serum fizyolojikte yıkandı. Zar ve yağ kısımları temizlenerek, buz içerisinde küçük parçalara ayrıldı. Bu küçük parçalar daha sonra cerrahi makasla kesilmek suretiyle kıyma haline getirildi ve tartıldı. Kalp, karaciğer, böbrek ve beyin gibi organlar için ağırlıkları kadar serum fizyolojik (mL) ilavesi ile homojenize edilerek %10 'luk doku homojenatları hazırlandı. Hazırlanan doku homojenatları tüplere konarak derin dondurucuda -20C' de kullanılacağı tarihe kadar saklandı.

Alınan kanların rutin lipid profili total lipid, total kolesterol ve LDL kolesterol tayini yapılarak incelendi. Kan ve dokuda TF yapıldı. Dokuda GSH, LPO, Sialik asid ve doku faktörü aktivitesi ölçüldü.

3.7. SERUMDA TOTAL LİPİD TAYİNİ

3.7.1. Deneyin prensibi

Serum lipidleri yüksek sıcaklıkta, derişik sülfürik asitle muamele edildiğinde sülfürik asit yağların karbon- karbon bağlarına etki ederek, karbonyum iyonları oluşmasını sağlar. Oluşan karbonyum iyonları fosfovanilinin karboksil gruplarıyla reaksiyona girerek pembe renkli bir kromojen oluşturur. Oluşan kromojen 530 nm' de maksimum absorbans verir (83).

3.7.2. Kullanılan çözeltiler

Derişik Sülfürik asit: Ticari ambalajdan direkt olarak kullanılır.

Fosfovanilin çözeltisi: 1 g vanilin 100 mL distile su ile su banyosunda ısıtılarak çözülür, soğutulur. Hacim, % 85 fosforik asit ile akar musluk suyu altında karıştırılarak 500 mL' ye tamamlanır.

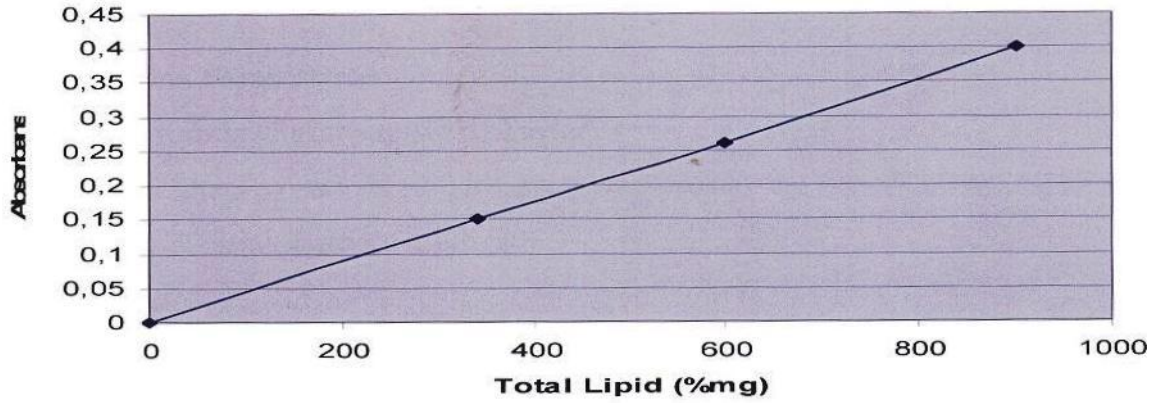
3.7.3. Deneyin yapılışı

Hidrolizat Hazırlanması: 50µl serum üzerine 2 mL derişik sülfürik asit ilave edilir, karıştırılır. Kaynar su banyosunda 10 dakika kaynatılır, soğutulur. Bu aşamadan sonra kör ve numune tüpleri aşağıdaki gibi hazırlanır.

Deney Tüpleri

	Kör	Numune
Derişik Sülfürik asit	0.2 mL	–
Hidrolizat	–	0.2 mL
Fosfovanilin Çözeltilisi	5 mL	5 mL

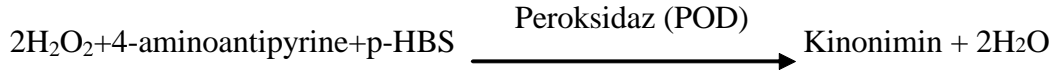
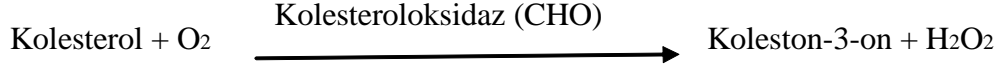
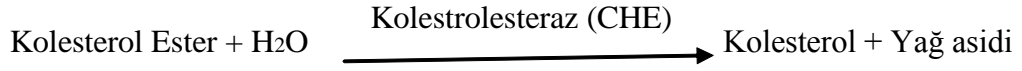
Tüpler karıştırılır. 30 dakika karanlıkta beklettikten sonra 530 nm' de numune absorbansları köre karşı okunarak kaydedilir. Numune absorbansı standart grafiğinde yerine konarak Total lipid miktarı (% mg) hesaplandı.



3.8. SERUMDA TOTAL KOLESTEROL TAYİNİ (HUMAN KATNO:C507-480)

3.8.1. Deneyin prensibi

Kolesterolün enzimatik hidrolizi ve oksidasyonundan sonra, H₂O₂ oluşur. H₂O₂ p-HBS (phydroxy benzene sulfonic acid) ve peroksidaz varlığında, 4-aminoantipyrine ile kinonimin kırmızı renkli kromoforunu oluşturur. Oluşan bileşin renk şiddeti kolesterol ile doğru orantılıdır.



3.8.2. KullanılanÇözeltiler

1- Kolesterol Reagent

4-Aminoantipyrine	0.6nM
Sodium Cholate	8.0 mM
p-Hydroxy benzene Sulfonic acid	20MM
Peroksidaz	≥1,200U/mL
Kolesterol esteraz	≥150U/mL
Kolesterol oksidaz	≥150 U/mL
Tampon (pH 6.8)	125mM

2- Standart

Kolesterol: 200 mg/dl (5.17 mmol/L)

3.8.3. DeneyinYapılışı

Deney Tüpleri

	Kör	Standart	Numune
Kolesterol Reagent	1 ml	1 ml	1 ml
37 ⁰ C'de 2 dakika inkübe edilir.			
Serum	-	-	10µl
Kolesterol Stand.	-	10µl	-
37 ⁰ C'de karıştırılır ve 10 dakika inkübe edilir. 520 nm'de köre karşı absorbanlar kaydedildi.			

Kolesterol konsantrasyonunun hesaplanması:

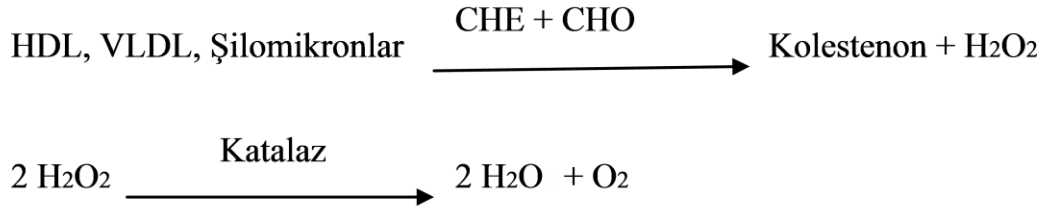
Kolesterol konsantrasyonu (mg/dL): $200 \times \text{Serumun absorbanısı/Standardın absorbanısı}$
Kolesterol konsantrasyonu (mmol/L): $5.17 \times \text{Serumun absorbanısı/Standardın absorbanısı}$

3.9. SERUMDA LDL KOLESTEROL TAYİNİ (HUMAN KATNO:L 530-100)

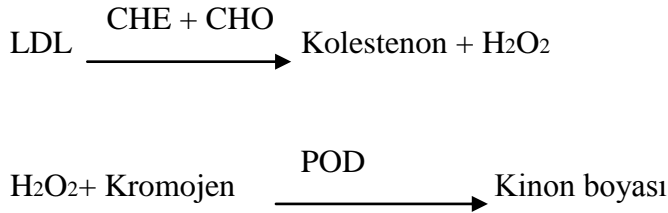
3.9.1. Deneyin prensibi

LDL tayini iki aşamalı olarak yapılır. Birinci aşamada HDL, VLDL ve şilomikronlar spesifik enzimlerle ortamdan uzaklaştırılır. Ortamda kalan LDL' ler spesifik enzimlerle kolestenon ve H₂O₂' ye dönüştürülür. Oluşan H₂O₂ kromojenle reaksiyona girerek peroksidaz varlığında kinonları oluşturular. Kinonun renk şiddeti LDL konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

1.basamak:



2. basamak:



3.9.2. Kullanılan çözeltiler

1- Direct LDL Kolesterol Reagent-1

Buffer (pH 7.0)	100 mmol/L
Kolesterol esteraz	800 U/L
Kolesterol oksidaz	500 U/L
Peroksidaz	800 U/L
4-aminoantipyrine	1.0 mmol/L

2- Direct LDL Kolesterol Reagent-2

3.9.3. Deneyin Yapılışı

Deney Tüpleri

	Numune
Serum	3µl
Direct LDL Kolesterol Reagent-1	300µl
37 ⁰ C'de 5 dk inkübe edilir	
Direct LDL Kolesterol Reagent-2	100µl
37 ⁰ C'de 5 dk inkübe edilir.	
660nm ve 546 nm arasında absorbanları ölçülür.	

LDL – Kolesterol Konsantrasyonunun Hesaplanması:

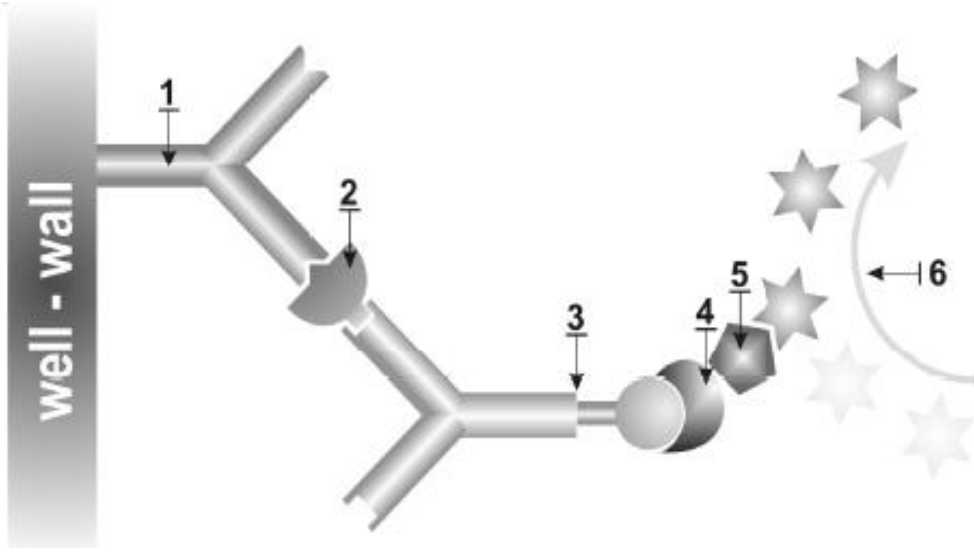
LDL – Kolesterol konsantrasyonu (mg/dL) =Standart kons. (% 136 mg) x
Numune absorbanı/Standart absorbanı

3.10. ELİSA YÖNTEMİ İLE DOKU FAKTÖRÜ TAYİNİ (USCN KAT NO: E95024 MA)

3.10.1. Deneyin prensibi

Elisa yönteminde genel prensip; doku faktörüne spesifik antikor ile önceden kaplanmış kuyucuklara uygun miktarda Standard ve numuneler ilave edilir. Daha sonra doku faktörüne spesifik biotinle konjuge olmuş poliklonal antikor ilavesi yapılır. Daha sonra avidinle konjuge edilmiş Horseradihs Peroxidase (HRP) ilavesi ve gerekli inkübasyonlardan sonra substrat solusyonu (tetrametil benzidin,TMB) ilave edilir. Enzim – substrat reaksiyonu uygun bir asid çözeltisi ile durdurulur ve oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede okunur. Çizilen standart eğriden yararlanılarak kullanılan örneklerin miktarı hesaplanır.

Bu yöntemde takip edilen yol şematik olarak aşağıdaki gibidir:



- 1)Eliza tabakasındaki kuyucuklara önceden yerleştirilmiş anticorlar
- 2)Standart ve numuneler
- 3)Konjugat (anti oxLDL Horseradish peroksidaz, HRP)
- 4)Substrat (Tetrametil benzidin, TMB)
- 5)Stok solusyonu (sülfürik asid)
- 6)Oluşan rengin okunması

3.10.2. Kullanılan Çözeltiler

- 1-Yıkama çözeltisi
- 2- Deney çözeltisi
- 3- Numune sulandırıcısı
- 4-Deteksiyon antikor
- 5- Galektin-3 standardı
- 6-Antitavşan HRP (horseradish peroxidase)
- 7-TMB (tetrametilbenzidin)substrat çözeltisi
- 8-Reaksiyon durdurma çözeltisi

3.10.3. Testin Yapılışı

-Yıkama tamponu ile bütün mikroeliza kuyucukları 2 kere yıkandı. İkinci yıkamadan sonra Kurutma kağıdı üzerine ters çevrilerek yıkama tamponu uzaklaştırıldı. Bu arada kuyucukların kurumamasına dikkat edildi.

-Tüm standart kuyucuklarına 100 ml numune sulandırıcısından ilave edildi.

-Birinci kuyucuğa 100 ml galektin standardı ilave edildi. Diğer standard kuyucuklarına 100 ml aktarılarak 10 ile 0.16 ng/ml konsantrasyonları arasında değişen Standard dilüsyonları yapıldı.

-Tüm kuyucuklara 50 ml numune sulandırıcı, kör kuyucuğuna 100 ml numune sulandırıcısı ilave edildi.

-Tüm kuyucuklara 50 ml deteksiyon antikoru ilave edildi.

-Mikrokuyucukların üzeri özel kapatıcısı ile kapatıldı ve Eliza karıştırıcısında 2 saat oda ısısında karıştırılarak bekletildi. Karıştırıcının hızı 200 rpm' e ayarlandı.

-İnkübasyon süresinin sonunda mikro kuyucuklar boşaltıldı. Mikro kuyucuklar yıkama tamponu ile 3 kere yıkandı.

-Tüm kuyucuklara 100 ml tavşan anti HRP ilave edildi.

-Mikro kuyucukların üzeri tekrar kapatılarak bu defa 1 saat oda ısısında Eliza karıştırıcısı üzerinde inkübe edildi.

-İnkübasyon süresinin sonunda mikro kuyucuklar boşaltıldı. Tekrar 3 kere yıkama tamponu ile yıkandı.

-Kör dahil tüm kuyucuklara 100 ml TMB substrat çözeltisi ilave edildi. TMB substrat çözeltisi kullanımdan hemen önce hazırlandı.

-Mikro Eliza kuyucukları bu defa 20 dakika karıştırıcı üzerinde inkübe edildi.

-20 dakika sonunda tüm kuyucuklara 100 ml reaksiyon durdurma çözeltisi ilave edildi ve oluşan renklerin absorbansı 450 nm' de okundu.

3.11. KARACİĞER HOMOJENATINDA DOKU FAKTÖRÜ AKTİVİTESİ TAYİNİ (84)

3.11.1. Deneyin prensibi

Dokuların tromboplastik aktiviteleri sağlıklı kişilerden alınan plazmalar kullanılarak Quick metoduna göre tespit edilir. Tromboplastin kaynağı olarak doku homojenatı kullanılır. CaCl₂ ilavesinden sonra fibrin oluşumu için geçen süre tayin edilir. Aktivite süre ile ters orantılı olarak değişir.

3.11.2. Kullanılan çözeltiler

Sodyum Sitrat Çözeltisi (% 3,8 gr.) : 100 ml. çözelti için, 3,8 gr. sodyum sitrat biraz dH₂O ile çözülür ve toplam hacim dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanır.

Plazma : Sağlıklı kişiden sitratlı kan (9 ml kan + 1 ml % 3,8' lik sitrat) alınarak plazması ayrılır.

Stok Kalsiyum Klorür Çözeltisi (0,2 M) : 100 ml çözelti için, 2,22 g CaCl₂ biraz dH₂O ile çözülür ve toplam hacim dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanır.

Seyreltik Kalsiyum Klorür Çözeltisi (0,02 M) : 1 ml. stok kalsiyum klorür çözeltisi üzerine 9 ml dH₂O konur ve karıştırılır. 37 °C de tutulur. (Taze hazırlanır)

3.11.3. Deneyin yapılışı

37 °C lik su banyosunda aşağıdaki gibi çalışılır.

	Deney Tüpü İçine
Doku Homojenatı	0,1 ml.
2 dakika inkübe edilir.	
Plazma	0,1 ml.
Karıştırılır ve 30 saniye inkübe edilir.	
0,02 M CaCl ₂ Çözeltisi	0,1 ml.
Karıştırılır, pıhtı oluşumu için geçen süre kronometre ile tayin edilir.	

3.12. KARACİĞER HOMOJENATINDA GLUTATYON(GSH) TAYİNİ (85)

3.12.1. Deneyin prensibi

Elmann ayıracı, 5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoik asid (DTNB) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

3.12.2. Kullanılan çözeltiler

Sodyum sitrat çözeltisi (% 1 g) : 1 g sodyum sitrat tartılır, biraz dH₂O ile çözülerek hacmi dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanır.

Elmann ayıracı (% 40 mg DTNB) : 40 mg DTNB (5-5' ditiyobis 1-2 nitrobenzoik asit) tartılır, biraz sodyum sitrat çözeltisinde (% 1 g) çözülür. Hacmi %1g lık sodyum sitrat çözeltisi ile 100 ml' ye tamamlanır.

Proteinsizleştirme çözeltisi : 1.67 g metafosforik asit, 0.2 g etilen diamin tetra asetik asit sodyum tuzu (EDTA-Na), 30 g sodyum klorür ayrı ayrı biraz dH₂O ile çözülür. Hepsi birleştirilir ve hacmi 100 ml' ye dH₂O ile tamamlanır.

Disodyum fosfat çözeltisi (0.3 M) : 4.26 gram Na₂HPO₄ veya (5.34 gram Na₂HPO₄. 2H₂O) biraz dH₂O ile çözülür ve hacim dH₂O ile 100 ml' ye tamamlanır.

3.12.3. Deneyin yapılışı

% 10 gramlık karaciğer homojenti 10 dak. 3000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınarak çalışılır.

Bir deney tüpüne 0.2 ml doku homojenatı konur. Vorteks ile karıştırılır. Üzerine 0.3 ml proteinsizleştirme çözeltisinden ilave edilir. Vorteksle karıştırılır. 5 dk. oda sıcaklığında bekletilir. 4000 rpm' de 10 dk santrifüj edilir. Çökelti atılır. Süpernatant alınır. İki tane deney tübü alınır. Numune ve kör olarak işaretlenerek aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune	Kör
dH ₂ O	-	0.2 ml
Süpernatant	0.2 ml	-
Na ₂ HPO ₄	0.8 ml	0.8 ml
Elmann Ayıracı	0.1 ml	0.1 ml

Tüpler vortekste karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 5 dakika bekletilir. Köre karşı 412 nm’ de absorbanlar kaydedilir. Sonuçlar seyreltme faktörü ve oluşan sarı renkli ürünün 412 nm’ de ekstinksiyon katsayısı (13600/m-1cm-1) kullanılarak (mg GSH/ mg protein) cinsinden sonuçlar hesaplanır.

3.13.KARACİĞER HOMOJENATINDA LİPİD PEROKSİDASYON (LPO) TAYİNİ (86)

3.13.1. Deneyin prensibi

% 10 gramlık karaciğer homojenti 10 dak. 3000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınarak çalışılır.

LPO ürünü olan malondialdehit (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan pembemsi rengin absorbanı spektrofotometrik olarak değerlendirilir.

3.13.2. Kullanılan çözeltiler

TBA çözeltisi (0.047 M) : 500 mg TBA ile 6 ml 1 M lık NaOH ile karıştırılır. Üzerine 69 ml dH₂O ilave edilir.

NaOH (1 M) : 4 gram NaOH tartılır, biraz dH₂O ile çözülür, hacmi 100 ml ye dH₂O ile tamamlanır.

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi (1.22 M, 0.6 M HCl deki): 20 ml TCA (%100 g TCA) ile 5 ml HCl (% 37 g lık, d=1.19 g/dl lik HCl) karıştırılır ve hacmi dH₂O ile 100 ml ye tamamlanır.

n-butanol : Orijinal şişesinden kullanılır.

3.13.3. Deneyin yapılışı

2 tane deney tübü alınarak numune ve kör olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune	Kör
Doku Homojenatı	0.25 ml	-
dH ₂ O	-	0.25 ml
TCA	1.25 ml	1.25 ml
Vortekste karıştırılır ve 15 dk bekletilir.		
TBA	0.75 ml	0.75 ml
Vorteks ile karıştırılır ve 30 dk kaynar su banyosunda inkübe edilir.		
n-Butanol	2 ml	2 ml

İlave edilir. Vortekslenir ve 10 dk. 3000 rpm’de santrifüj edilir. Butanol fazı alınarak 532 nm’ de köre karşı absorbanlar kaydedilir. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı (1.56.10⁵ M⁻¹cm⁻¹) kullanılarak (nmol MDA/ mg protein) cinsinden sonuçlar hesaplanır.

3.14. KARACİĞER HOMOJENATINDA SİYALİK ASİD TAYİNİ (87)

3.14.1. Deneyin prensibi

Siyalik asid, periyodik asid oksidayonuna uğrayarak, b-formilpürivik asid oluşur. Bu bileşik 2 mol tiyobarbütirik asid ile reaksiyonlaşarak, 549 nm’ de maksimum absorban veren renkli bir bileşik oluşturur. Bu ürün stabil değildir, bu nedenle siklohegzanon fazına çekilir. Oluşan rengin şiddeti 549 nm’ de maksimum absorbansa sahiptir.

3.14.2. Kullanılan çözeltiler

1N H₂SO₄ : 1 L’ lik bir ölçü distile su ilave ettikten sonra üzerine 5.42 ml derişik kabına bir miktar sülfürik asid konur ve hacim distile su ile 1000 ml’ ye tamamlanır.

0.2 M Sodyum meta periyodat (9 M Fosforik asid içerisinde): 250 ml' lik balona belli bir miktar distile su ilave edilir. Suyun üzerine ml 151.7 fosforik asid ilave edilip karıştırılır. Bu karışımın üzerine 10.695 gram sodyum- metaperiyodat ilave edilir, karıştırılarak çözünmesi sağlanır. Hacim distile su ile 250 ml' ye tamamlanır.

0.5M sodyum sülfat (0.1 N H₂SO₄ içerisinde) :500 ml' lik bir balon jøjeye 35.51g sodyum sülfat bir miktar 0,1N sülfürik asid içinde çözüldükten sonra hacim 500 ml' ye 0.1N sülfürik asid ile tamamlanır.

%10 g Sodyum arsenit : (0.1N sülfürik asidde hazırlanan 0.5 M sodyum sülfat içerisinde): 10g sodyum arsenit tartılır bir miktar 0.5 M sodyum sülfat içerisinde çözüür, hacim 0.5 M sodyum sülfat ile 100 ml' ye tamamlanır.

% 0.6 g TBA : (0.1N sülfürik asidde hazırlanan 0.5 M sodyum sülfat içerisinde): 0,6g TBA tartılır bir miktar 0,5 M sodyum sülfat içerisinde çözüür, hacim 0.5 M sodyum sülfat ile 100 ml'ye tamamlanır.(Kullanılacağı zaman taze hazırlanır)

Sikloheksanon: Direk olarak orijinal şişesinden kullanılır.

3.14.3. Deneyin yapılışı

% 10 gramlık karaciğer homojentı 10 dak. 3000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant ayrılır.

180 ml 0.1 N H₂SO₄ ile 20 ml süpernatant karıştırılır, tüplerin ağzı kapatılarak 1 saat 80°C' de etüvde hidroliz edilir. Elde edilen hidrolizat numune olarak işaretlenmiş bir deney tübüne koyularak aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune
Hidrolizat	0.2 ml
0.2M sodyum metaperiyodat	0.1 ml
20 dakika oda sıcaklığında beklenir.	
% 10 sodyum arsenit	1 ml
Meydana gelen sarı renk kayboluncaya kadar çalkalanır.	
% 0.6 g TBA	3 ml
100 C° 'lık su banyosunda 15 dakika bekletilir. Bu süre sonunda tüpler su banyosundan alınarak buzlu su içinde oda ısına soğutulur.	
Sikloheksanon	4.3 ml
Kör olarak sigloheksanon kullanılır. Organik fazın renk şiddeti 549 nm de okunur.	

Sonuçlar ekstinksiyon katsayısı (57000/m-1cm-1) kullanılarak mg siyalik asit/ g protein cinsinden hesaplanır.

İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmanın biyoistatistiksel çözümlemesinde Graphpad Prism programı kullanılmıştır. Değişkenler ortalama, standart sapma ile tanımlanmıştır. Normal dağılıma uygun ölçümsel değişken ortalamalarının karşılaştırılması için, iki grup kıyaslamasında t testi, yine aynı tip verilerin bağımlı örneklerinin kıyaslamasında eşli t testi (paired t) kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen ortalamaların karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Yorumlamalarda anlamlılık sınırı $p < 0.05$ alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. ÇEŞİTLİ GRUPLARIN LİPİD GÖSTERGELERİNİN SONUÇLARI

Kontrol ve Hiperlipidemi grubunda (A), Hiperlipidemili gruba Apo-B Konjugatı verilmesi halinde (B) serumdaki Total lipid, Kolesterol ve LDL kolesterol sonuçları toplu halde Tablo 7’ de görülmektedir.

Tablo 7: Serumda Lipid Göstergelerinin Sonuçları

Parametreler	Kontrol (n=8) Ort±SD	Hiperlipidemik (n=8) Ort±SD	
Total Lipid (mg/dl)	193,85±15,23	551,85±52,2	A
Kolesterol (mg/dl)	65,18±6,52	138,99±10,1	
LDL Kolesterol (mg/dl)	13,67±0,95	18,5±1,81	
Total Lipid (mg/dl)	551,85±52,2	671,63±84,49	B
Kolesterol (mg/dl)	138,99±10,1	207,74±44,27	
LDL Kolesterol (mg/dl)	18,5±1,81	13,86±2,05	

*Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

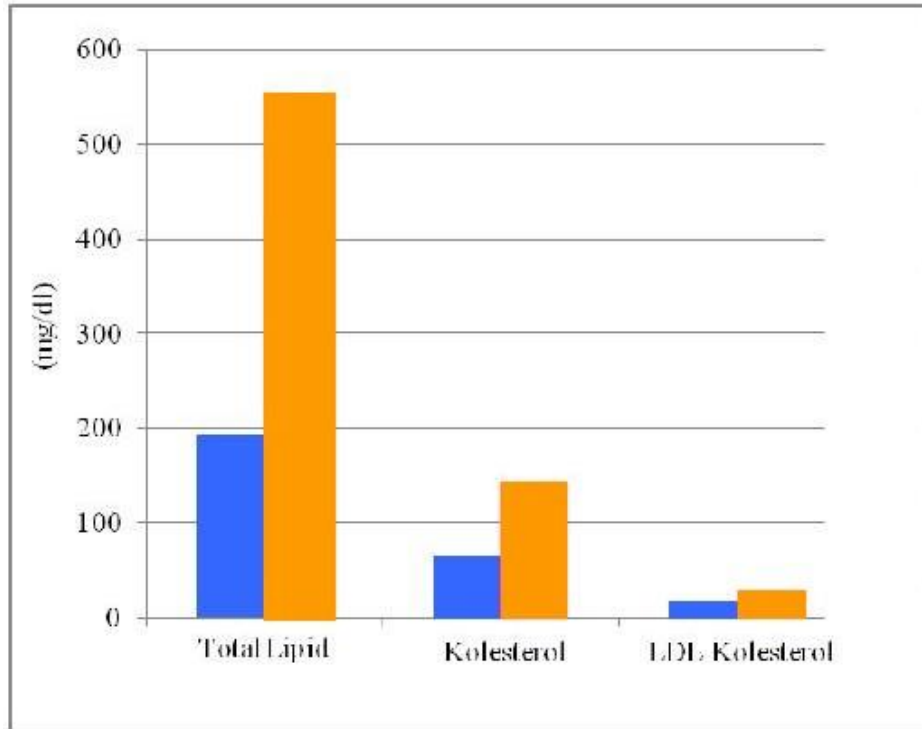
4.1.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması

Kontrol ve Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlardaki rutin serum lipid parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 8’ de görülmektedir. Burada görüldüğü gibi Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlarda total lipid, total kolesterol, LDL kolesterol anlamlı derecede artmıştır. Şekil 14’ de bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 8: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Lipid Parametre Değerleri

	Kontrol	Hiperlipidemik	P
Total Lipid	193,85±15,23	551,85±52,2	0,001
Total Kolesterol	65,18±6,52	138,99±10,1	0,001
LDL Kolesterol	13,67±0,95	18,5±1,81	0,001

*Değerler ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. P<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 14:Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Lipid Parametre Değerlerinin Karşılaştırılması (mavi: kontrol, turuncu: hiperlipidemik gruplar)

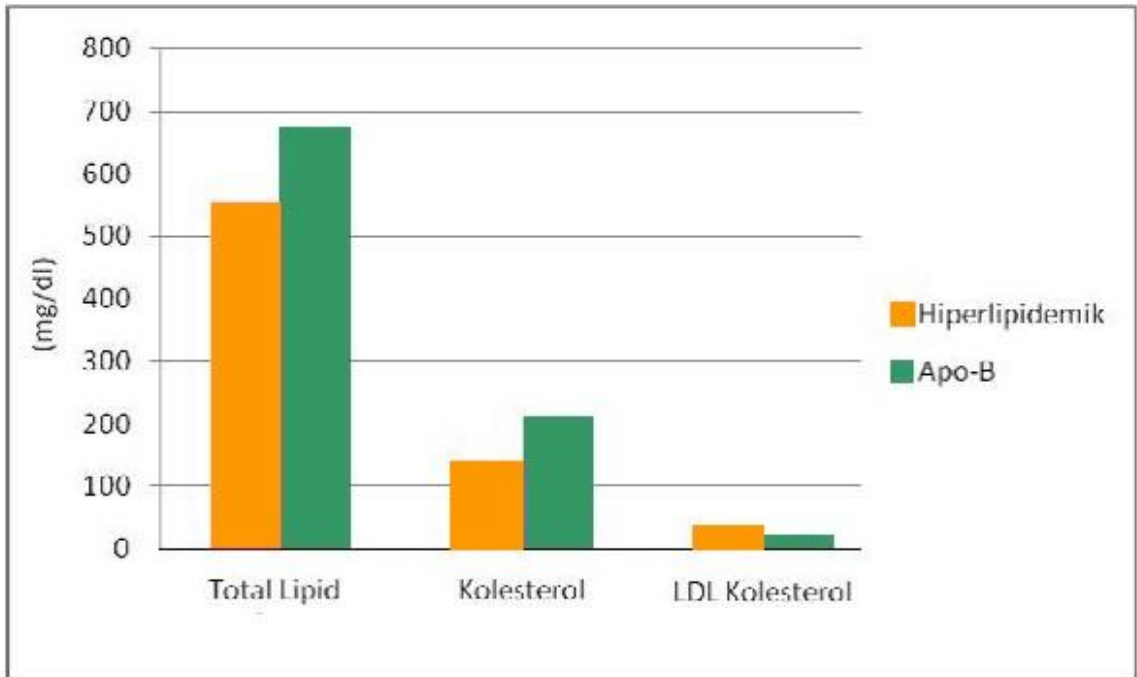
4.1.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması

Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlarda Apo-B konjugatı verildiğinde elde edilen rutin lipid parametrelerindeki değişimler istatistiksel olarak Tablo 9’ da görülmektedir. Bu grupta total lipid, total kolesterol değerleri normal hiperlipidemik gruba göre daha da artış gösterirken LDL kolesterol değerinin düştüğü dikkati çekmiştir ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 15’ de bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 9: Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Lipid Parametre Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	Apo-B (n:8)	P
Total Lipid	551,85±52,2	671,63±84,4	0,005
Total Kolesterol	138,99±10,1	207,74±44,27	0,001
LDL Kolesterol	18,5±1,81	13,86±2,05	0,002

*Değerler ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. $P<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 15: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Lipid Parametre Değerlerinin Karşılaştırılması

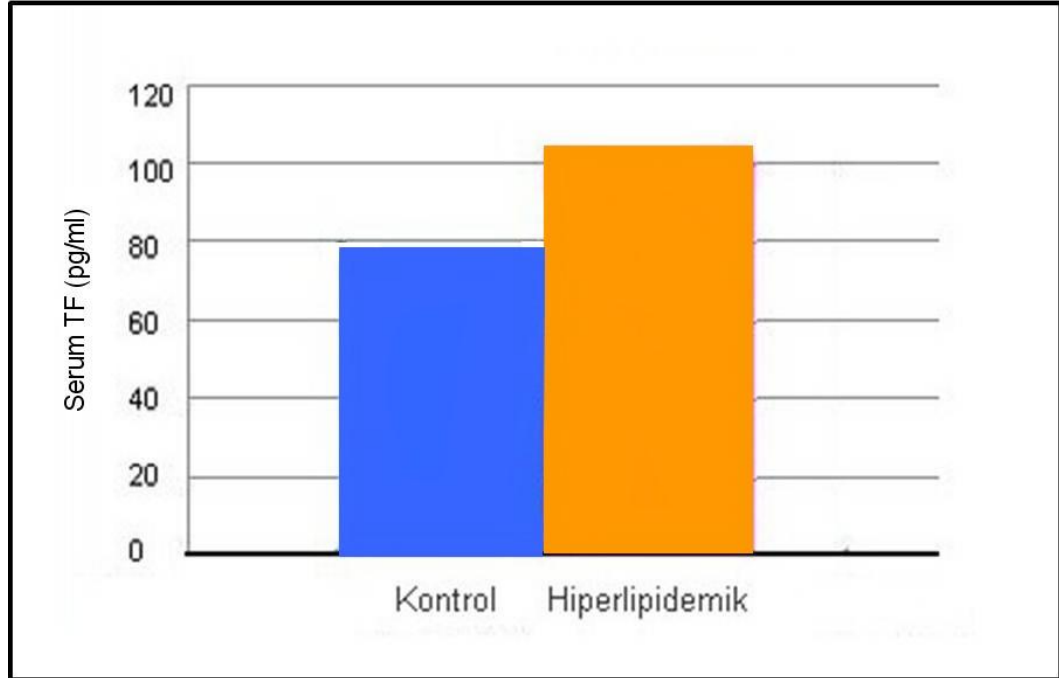
4.2. ELİSA YÖNTEMİ İLE KANDA TF SONUÇLARI

4.2.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Serum TF Değerlerinin Karşılaştırılması

Kanda kontrol ve hiperlipidemik grupların kan serumunda ölçülen TF değerlerinin absorbansı istatistiksel olarak Tablo 10' da görülmektedir. Serumda ölçülen TF değerleri kontrol grubunda ortalama 78.5pg/ml, hiperlipidemik grupta 102.5pg/ml olarak bulunmuştur. Serum TF değeri hiperlipidemik grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p < 0,001$ anlamlı). Şekil 16' da tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 10: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Serum TF Değerleri

Serum TF değeri Ort \pm St pg/ml	Kontrol (n:8)	Hiperlipidemik(n:8)	P
	78,5 \pm 4,0	102,5 \pm 15,0	0<0,001



Şekil 16: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Serum TF değerlerinin Karşılaştırılması

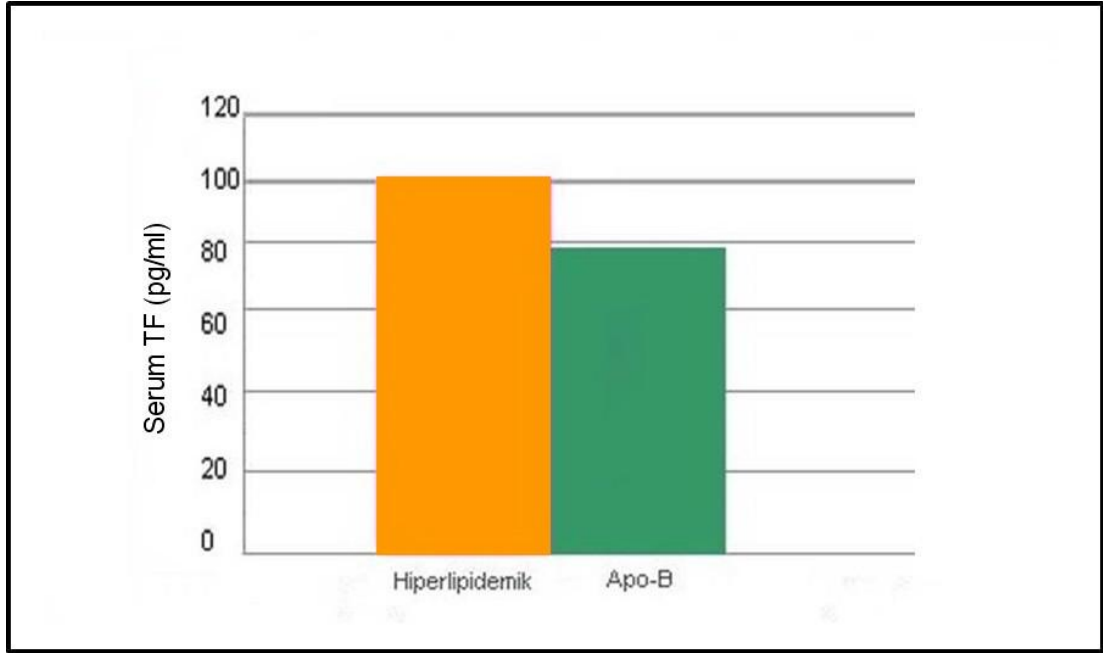
4.2.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması

Serumda hiperlipidemik ve Apo-B grupların TF değerleri istatistiksel olarak Tablo 11’ de görülmektedir. Doku faktörü değeri hiperlipidemik grupla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark görülmemektedir. ($p < 0,05$ anlamlı). Şekil 17’ de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 11: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Serum TF Değerleri

Serum TF pg/ml ort ±SD	Hiperlipidemik (n:8)	Apo-B (n:8)	P
	102,50±15,00	90,37±14,00	NS

NS : anlamsız



Şekil 17: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Serum TF Değerlerinin Karşılaştırılması

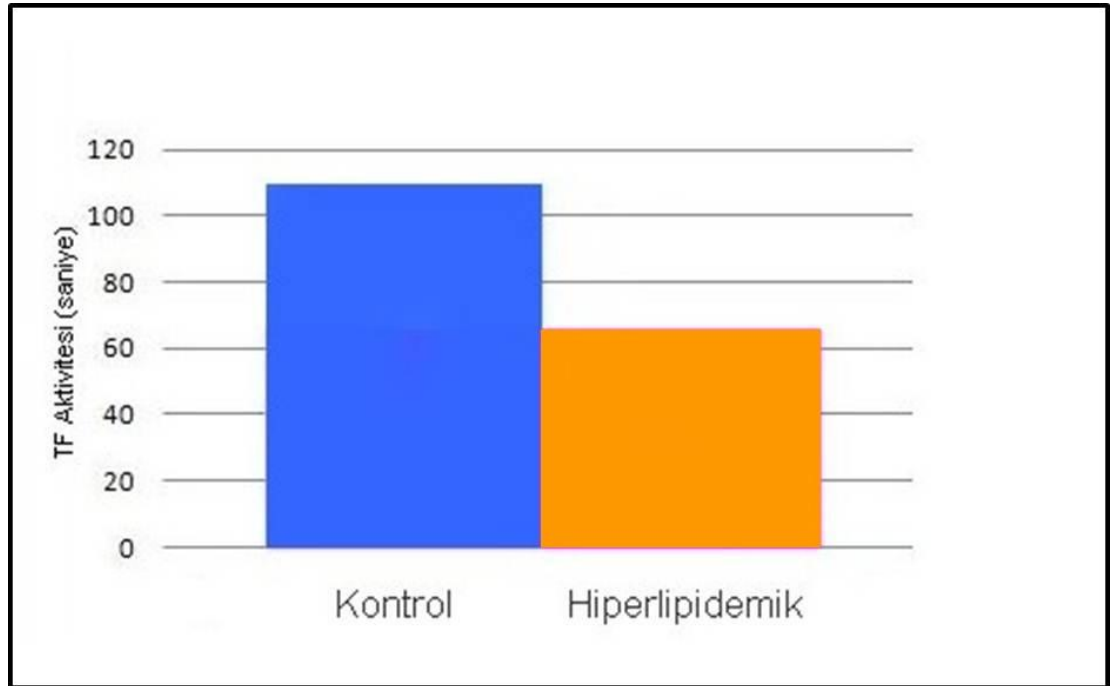
4.3. KARACİĞER DOKUSUNDA DOKU FAKTÖRÜ AKTİVİTESİ SONUÇLARI

4.3.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında kontrol ve hiperlipidemik grupların TF aktivitesi değerleri istatistiksel olarak Tablo 12’ de görülmektedir. Doku faktörü aktivitesi değeri hiperlipidemik grupta kontrol grubuna göre artma göstermiştir ($p < 0,05$ anlamlı). Şekil 18’ de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 12: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karaciğer Homojenatında TF Aktivitesi Değerleri

TF Aktivitesi (saniye)	Kontrol	Hiperlipidemik	P
	109,75±26,22	65,37±5,9	0,002



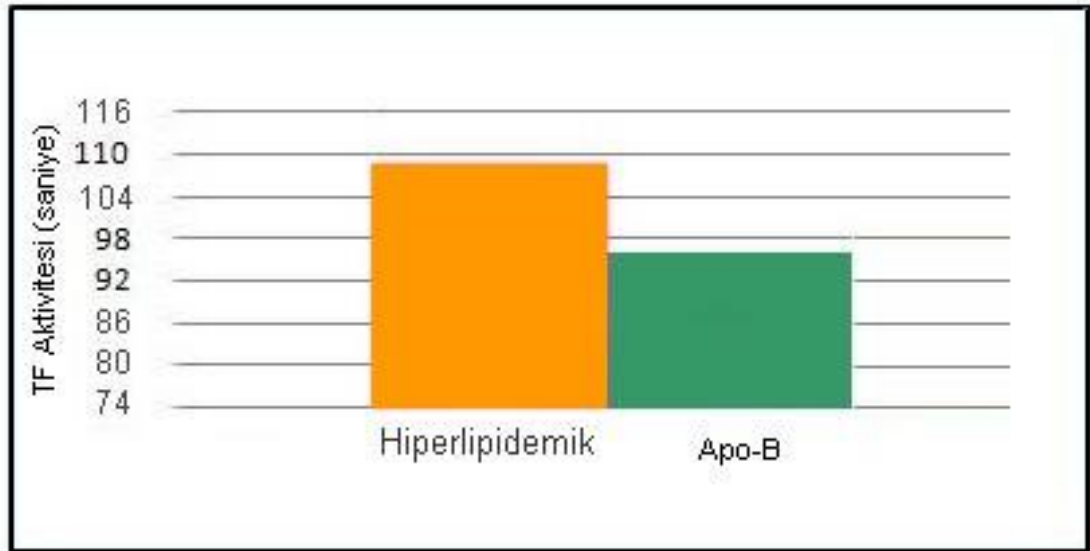
Şekil 18: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karaciğer Homojenatındaki TF Aktivitesi Değerlerinin Karşılaştırılması

4.3.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması

Karaciğer hiperlipidemik ve Apo-B grupların değerleri istatistiksel olarak Tablo 13’ de görülmektedir. Doku faktörü değeri hiperlipidemik grupla kontrol grubuna göre değişiklik göstermemiştir ($p < 0,05$ anlamlı). Şekil 19’ da tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 13: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karaciğer Homojenatında TF Aktivitesi Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	Apo-B (n:8)	P
TF Aktivitesi(saniye)	109,75+26,22	97,50+15,37	NS



Şekil 19: Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karaciğer Homojenatındaki TF Aktivitesi Değerlerinin Karşılaştırılması

4.4. KARACİĞER HOMOJENATINDA GLUTATYON VE LİPİD PEROKSİDASYON SONUÇLARI

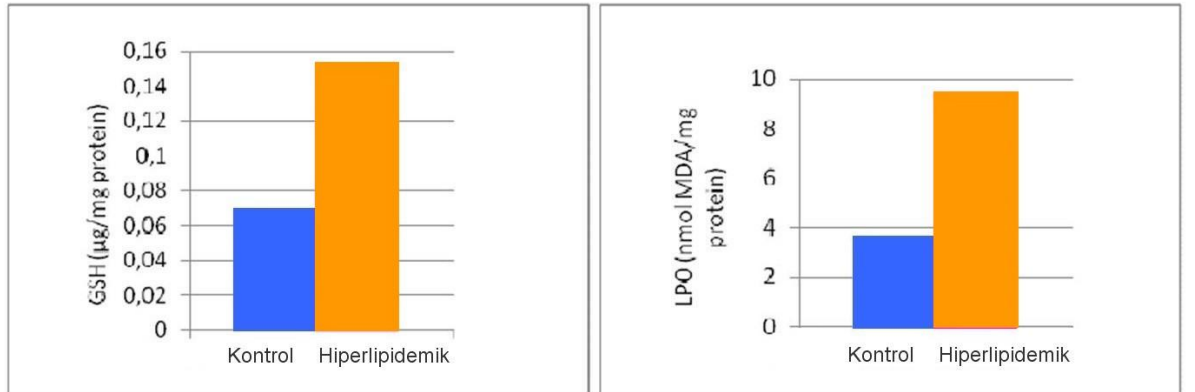
4.4.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında kontrol ve hiperlipidemik grupların glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyon (LPO) değerleri istatistiksel olarak Tablo 14’ de görülmektedir. Hiperlipidemik grupta hem glutatyon hemde lipid peroksidasyon değerleri anlamlı bir şekilde artmıştır ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 20’ de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 14: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların GSH ve LPO Değerleri

	Kontrol (n:8)	Hiperlipidemik (n:8)	P
GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	0,07 \pm 0,01	0,15 \pm 0,04	0,001
LPO (nmol MDA/mg protein)	3,53 \pm 1,17	9,25 \pm 1,85	0,001

*Değerler ortalama \pm Standart sapma olarak verilmiştir. GSH: Glutatyon, LPO: Lipid Peroksidasyon . $P< 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 20: Kontrol ve Hiperlipidemik Gruplarının GSH ve LPO Değerlerinin Karşılaştırılması

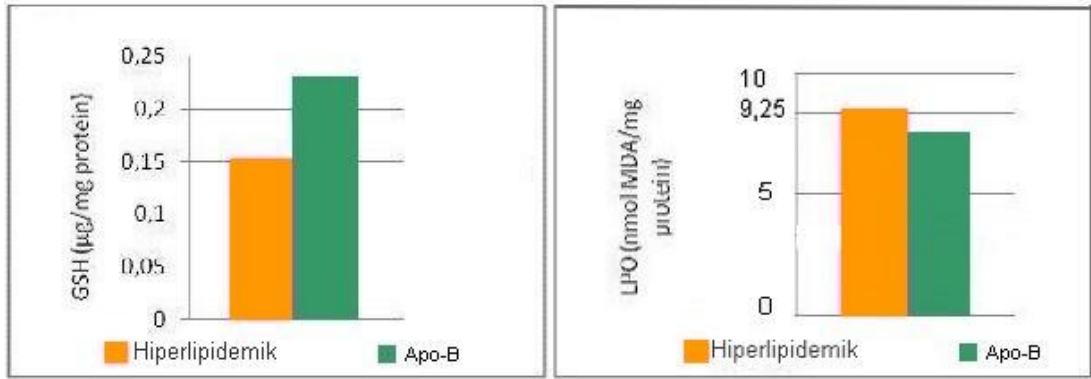
4.4.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında hiperlipidemik grubun glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyon (LPO) değerine Apo-B konjugatının etkisi istatistiksel olarak Tablo 15’ de görülmektedir. Apo-B konjugatının hiperlipidemi durumunda glutatyona (GSH) etkisi anlamlı olarak artmış, lipid peroksidasyona (LPO) etkisi anlamsız olarak azalmıştır ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 21’ de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 15: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların GSH ve LPO Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	Apo-B (n:8)	P
GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	0,15 \pm 0,04	0,23 \pm 0,04	0,001
LPO (nmol MDA/mg protein)	9,25 \pm 1,85	9,09 \pm 1,76	0,6

*Değerler ortalama \pm Standart sapma olarak verilmiştir. GSH: Glutatyon, LPO: Lipid Peroksidasyon. $P<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 21: Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının GSH ve LPO Değerlerinin Karşılaştırılması

4.5. KARACİĞER HOMOJENATINDA SİYALİK ASİD SONUÇLARI

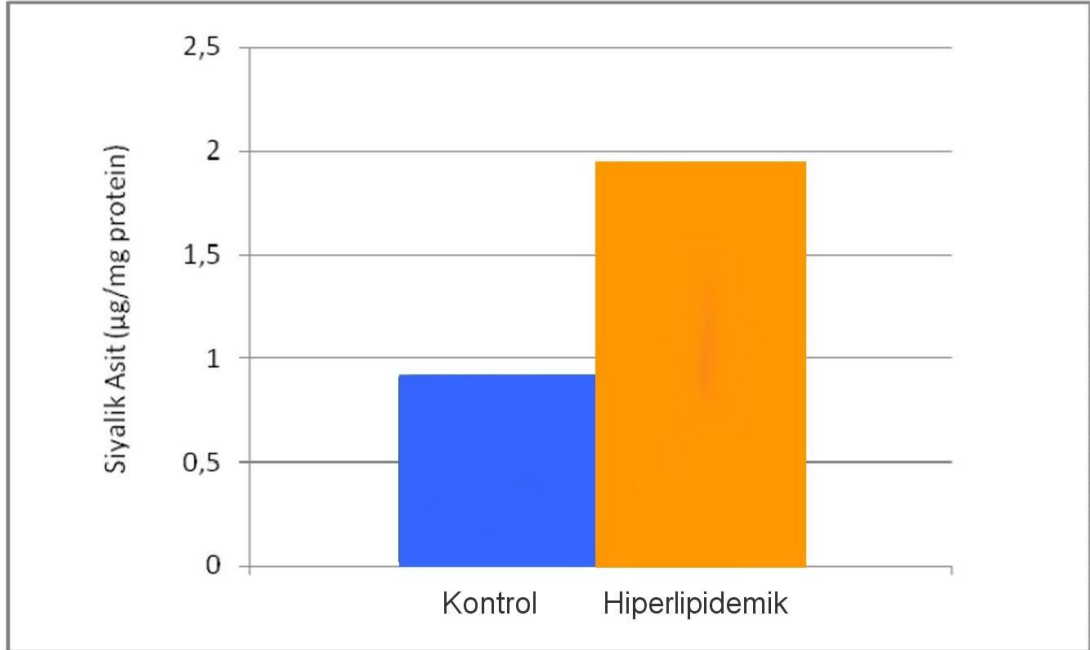
4.5.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında kontrol ve hiperlipidemik grupların sialik asid sonuçları istatistiksel olarak Tablo 16’ da görülmektedir. Hiperlipidemik grupta sialik asid değerleri anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 22’ de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 16: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Sialik Asid Değerleri

	Kontrol (n:8)	Hiperlipidemik (n:8)	P
Siyalik Asit ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	0,88 \pm 0,36	1,92 \pm 0,32	0,001

*Değerler ortalama \pm Standart sapma olarak verilmiştir. $P<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 22: Kontrol ve Hiperlipidemik Gruplarının Sialik Asid Değerlerinin Karşılaştırılması

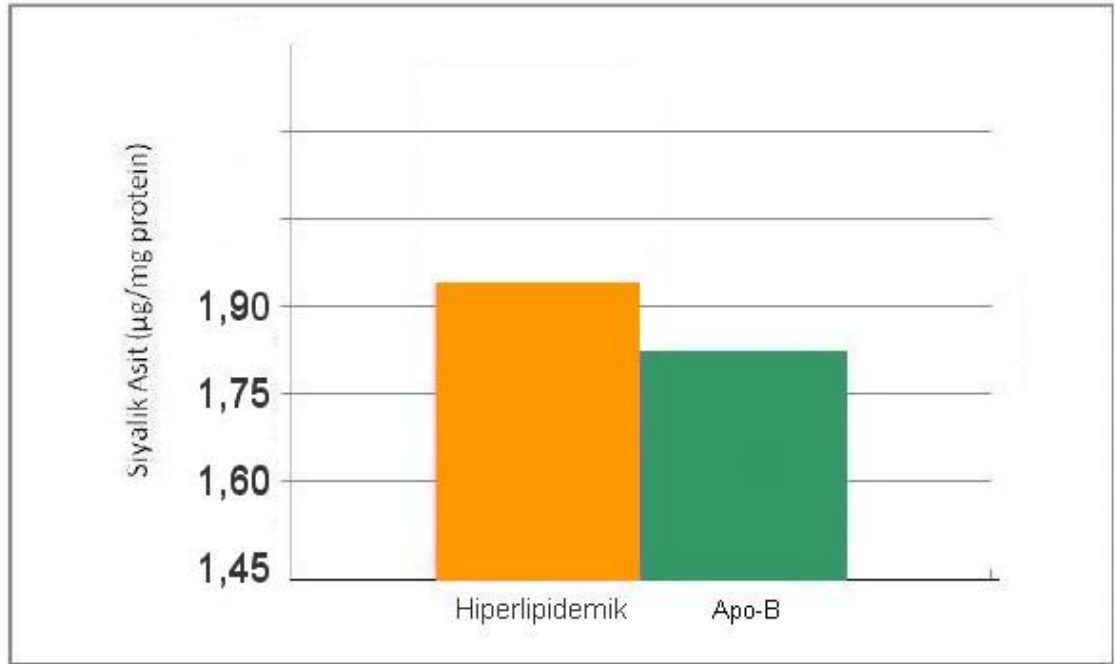
4.5.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatındaki hiperlipidemik gruba Apo-B ilave edildiğinde sialik asid değerlerinin nasıl değiştiği istatistiksel olarak Tablo 17’ de görülmektedir. Apo-B ilavesi ile hiperlipidemik grubun sialik asid düzeyi azalmıştır, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$ anlamlı). Şekil 23’ de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 17: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Sialik Asid Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	Apo-B (n:8)	P
Siyalik Asit ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	1,92 \pm 0,32	1,77 \pm 0,19	0,3

*Değerler ortalama=Standart sapma olarak verilmiştir. $P < 0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 23: Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Sialik Asid Değerlerinin Karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hiperlipidemi arterlerde ateroskleroz gelişmesini hızlandırır ve özellikle koroner arter hastalıkları için ciddi bir risk faktörüdür. Ancak hiperkoagulasyon, inflamasyon, lipid peroksidasyonunun da ateroskleroz patogenezinde önemli olduğu düşünülmektedir (6,9,12,28,29,50,88,89). Bu noktadan hareketle bu çalışmada, 60 gün boyunca hiperlipidemik yem ile beslenen C57BL/6 tipi farelerin kanda ve dokularındaki TF, lipid peroksidasyonu ve sialik asid değerleri ve bu değerlere Apo B-100 (Apo-B) konjugatının etkisi incelendi.

Geçmiş 1850' li yıllara dayandığı halde (2,3,18), günümüz teknolojisi ile yapısı aydınlatılan fakat koagulasyon dışındaki fonksiyonları hakkında çeşitli yorumlar yapılan (13,19,20,21,58,90,91,92,93) bir membran protein olan TF' nin hiperlipidemi modelinde kanda ve dokuda nasıl bir değişim gösterdiği ateroskleroz patogenezinde önemli bir bulgudur. Ding ve ark (13) koroner arterlerdeki endotel hücrelerindeki TF' nin ekspresyonunun bir nükleotid reseptör aracılığı ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Trombosit agregasyonunda rol oynayan nükleotid reseptörlerinin tanınması plavix gibi yeni antitrombotik ajanların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu bilgilerden yola çıkan araştırmacılar P2Y reseptörlerinin de TF upregülasyonunda etkin olduğunu bu yolun baskılanması ile TF' nin trombus yapıcı etkisininin azalacağını ileri sürmüşlerdir.

TF' nin sinyal iletiminde etkin olduğunun anlaşılması ile beraber, sinyal iletiminde etkin olan diğer bir molekül grubu nükleotidlerle ilişkisi kurulmaya başlanmıştır. Özellikle kardiovasküler sistemdeki etkiler üzerinde yoğun çalışmalar başlamıştır.

Normalde endotel hücreleri TF ekspresyonu yapmazlar. Ancak endotel disfonksiyonu halinde hücre yüzeyinde TF belirir. TF kanda dolanmakta olan FVII için güçlü bir kofaktör aynı zamanda reseptördür. Bu nedenle endotel disfonksiyonu yapan ajanlar TF' nin hücre yüzeyinde görünmesi ve kanla temas etmesi için yeterli bir nedendir. Hiperlipidemi özellikle LDL-C artan endotel disfonksiyon yapan ajanlar arasındadır. TF bir kere kanla temas ettikten sonra ekstrinsek ve intrinsek sistemin uyarılması kaçınılmaz olur. TF aktivasyonu ile oluşan trombin bir taraftan

da trombositleri uyararak aktifleştirir ve trombosit adezyon, sekresyon ve agregasyonu hızlanır. Bu durumda athero tromboz ve hiperkoagülasyon birbirinin hem tetikleyicisi hem de sonucudur.

Bütün bunlar düşünüldüğünde bizim yaptığımız kısa süreli hiperlipidemi modelinde kandaki TF değerinin artmış olması karaciğerdeki TF aktivitesinin de bu artışa paralellik göstermesi trombus lehine bir bulgudur. İnflamatuar cevaplar gibi lipit birikimi de TF için risk faktörüdür. İnflamatuar cevaplarda çeşitli interlökinler, VEGF, endoteldeki TF ekspresyonunu başlatır. P2Y reseptor ailesinin TF uyarısında etkin ve regüle edici olabileceği düşünülmektedir (13).

Fregula ve ark (20) özellikle karotid arteri gibi akış hızı yüksek olan damarlardaki hasarda TF ile karşılaşıldığında trombus oluşumunun hızlandığını bildirmişlerdir. Bu nedenle TF ekspresyonunun ve dolaşımdaki varlığının kontrolü çok iyi yapılmakta olduğu kabul edilmekte fakat bu kontrol mekanizmalarının nasıl olduğu iyi bilinmemektedir.

Kimi araştırmacılar TF ile Faktör VII aktivasyonunun ayrı olduğunu ve Faktör VII aktivasyonunda plazmadaki lipoproteinlerin etkin olduğunu bildiren çalışmalar vardır (21). TF aktif Faktör VII için hem kofaktör, hem de reseptördür. Normal şartlarda fonksiyonel TF sadece hücrelerde sentez edilir. Monosit ve makrofajlar bu hücreler arasındadır. Damar hasarı ile subendotelde bulunan TF plazma proteinleri ile karşılaşınca hemostaz ve trombusu başlatır. Bazı çalışmalar Faktör VII aktivitesindeki artışın ölümle sonuçlanan koroner arter hastalıkları ile orantılı olduğunu bildirmişlerdir (21).

Roselear ve ark (23) siklosporin A verdikleri C57BL/6 tipi farelerde T lenfositlerin aktivasyonunu önleyerek ateroskleroz ile immun sistem arasındaki ilişkiyi anlamaya çalışmışlardır. Biz çalışmamızda Apo B-100 Antijeni vererek immun sistemi harekete geçirdiğimizde lipit profili değişecek mi diye düşündük.

Hücrel immunitede önemli görevi olan T lenfositlerin aterosklerozun her safhasında yer almaktadır. Yüksek kolesterolü diyetle beslenen tavşanlarda gelişen aterosklerozun erken safhalarından itibaren T lenfositlere rastlanmıştır. İnsandaki

aterosklerotik lezyonlarda hem helper (CD⁺), hem de baskılayıcı T hücreleri (CD8⁺) vardır. Tavşalarda gelişen lezyonda CD4⁺'nin daha baskın olduğu görülmüştür. T lenfositleri fazlaca sitokin üretirler. Sitokinler hücre göçünde, proliferasyonunda etkili olduğu gibi kolesterol bakiiminde de etkili olabilmektedir. Siklosporin A (CyA); IL-2'nin transkripsiyonunu önleyerek T hepler lenfositlerin aktivasyonunu önler. CyA aynı zamanda IFN- γ , IL-3, IL-4, TNF- α sentezini inhibe eder. CyA'nın kandaki konsantrasyonu sadece hücreselel immuniteni baskılayacak dozda ayarlanmasına dikkat etmek gerekir. Çünkü yüksek dozda CyA nefrotoksiktir, hipertansiyon yapar ve lipoprotein konsantrasyonunu değiştirir diyen araştırıcılar, CyA'dan sonra kanda total kolesterolun değişmediğini görmüşlerdir.

Renal fonksiyonun bozulmadığı da kandaki kreatinin konsantrasyonu ile kanıtlayan araştırıcılar; aterosklerotik lezyon yönünden aort, torasik ve abdominal arterlerdeki lezyonları incelemişler CyA ile immün surpese edilmiş tavşanlarda kontrol grubuna göre anlamlı artışlar görmüşlerdir. . Bu artış torasik arterde daha fazladır. Esterleşmiş ve esterleşmemiş kolesterol miktarı aortik arterdeki lezyonda kontrol grubuna göre CyA'lı tavşanlarda daha fazla miktarlarda bulunmuştur. Buradan çıkan sonuç şudur; CyA'nın etkisi lenfositler üzerine olduğuna göre, lenfositlerin baskılanması dolayısıyla hücreselel immunitenin basılanması hızlanmıştır. Araştırıcılar CyA'nın ayrıca kolesterol ile beslenen C57BL/6 farelerde ateroskleroz gelişimini de hızlandırdığını da bildirmişlerdir.

Drake ve ark (31) TF için hemostatik zarf adını kullandılar. Çünkü subendotelde yerleşen bir membran protein olan TF ancak endotel hasarında yani zarf açılırsa aktif duruma geçerek koagülasyonu başlatır. Diğer taraftan da TF geninin inaktivasyonunda embriyonik ölümler olduğu bildirilmiştir (91).

Son yıllarda TF ile ilgili önemli diğer bir bulgu da kanda ölçülebilecek miktarların gelişen teknoloji ile birlikte bulunuyor olmasıdır. Eski bilgilere hiç uymayacak olan bu bilgi 1999'lu yıllarda farklı araştırıcılar tarafından "blood borne TF" ya da "circulating TF" adı ile bildirilmiştir (11).

Bu bulgular damar duvarındaki TF'den çok farklı görüşlerin ortaya atılmasına neden olmuş, trombus olaylarına bakışı değiştirmiştir.

Butanos ve ark (33) sağlıklı insanların kanında dolanan TF miktarının koagülasyonu etkileyemeyecek kadar düşük miktarda olduğunu söylemişlerdir. Kimi araştırmacılara göre dolanan TF oluşan pıhtının kenarına tutunmaktadır (18). Ancak ne amaçla tutunduğu hakkında bilgi çok iyi anlaşılmamıştır. Dolanan TF'nin hemostaz, tromboz ve lipid metabolizmasındaki etkilerini anlamak için çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Bir kısım araştırmacılar trombositlerin mikroveziküller halinde TF içerdiğini söylerken (92,100), bir kısım araştırmacılar trombositlerdeki TF aktivitesinin nasıl olduğu hakkında net bilgi sahibi olmadıklarını söylemişlerdir (33).

Günümüzde henüz insan plazmasından elde edilemeyen fakat plazmada varlığı bildirilen ve "alternatively spliced TF= altTF" olarak isimlendirilen bir TF' den söz edilmektedir. Bazı araştırmacılar ise, alt TF'nin hemostazda olduğu gibi, tümör büyümesinde ve anjiogenezde etkili olduğunu savunmaktadır (35,36).

Pan ve ark. (59) TFPI' nin overekspresyonu ile plasma kolesterolünün aşırı yükselmesinin önlendiğini bildirmişlerdir. Bu etki ile geniş zaman diliminde aterosklerotik plak oluşumunda azalma olacağını düşündürür.

Silveira ve ark (89) hiperlipemide Faktör VII ve Faktör IX aktivasyonunda artış olduğu halde, Faktör XII aktivasyonunda benzer artışın olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, Faktör XI ve Faktör IX eksik hastaların postprandial Faktör VII aktivasyonunda artış olmadığını fakat Faktör XII eksik hastalarda postprandial Faktör VII aktivasyonunda artış olduğunu göstermişlerdir. Bu in vivo çalışmalar hemostatik sistem proteinlerinin lipitlerle ilişkisini düşündürmüştür.

Manzi ve ark (88) sistemik lupus erithematosuslu (SLE) kadınlarda koroner kalp hastalıkları ve miyokard infarktüs riskinin normal kadınlara göre 50 kat daha fazla olduğunu, burada karotid arterlerindeki aterom plağının ciddi bir risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir.

Luo ve ark (90) TF eksikliğinde fibrinojen eksikliğine benzer bulgular görüldüğü halde, faktör XI eksikliğinde bu etkilerin hiçbirine rastlanmadığını bildirmişlerdir.

Septik infeksiyonlar koagulasyonu hızlandırarak hemostatik yolu kötüleştirir. Antikoagulanların bu patolojiyi düzeltmedikleri görülmüştür. Bakteri ile karşılaşan konak savunma amacı ile fibrin deposu oluşturur. Gram negatif bir bakteri olan *Yersinia enterocolitica* intraperitoneal olarak farelere enjekte edildiğinde; eğer fibrinojen eksikliği söz konusu ise, peritona sitokin ve kemokin salınımı olmamıştır. Ayrıca, nötrofillerin inflamasyon alanına gücü de fibrinojen eksikliğinde baskılanmıştır. Fibrinojen eksik olan bu olgulara oral antikoagulan (caumadin) tedavisi uygulandığında karaciğerde görülen bakterial hepatiti takiben ölüm görülmüştür. Bu sonuçlar TF' ye bağlı ekstresek yolun konağın bakteri savunmasına karşı etkin bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Bu bulgular ateroskleroz patogenezinde etkin olduğu bildirilen inflamasyonda TF' nin etkili olduğunu da düşündürmektedir (90).

TF' nin hemostaz ve trombusdaki etkileri ve de sinyal iletimindeki etkilerinin regülasyonunda etkin olan TFPI'ün fonksiyonu TF kadar önem taşır. Aktif Protein C'nin kofaktörü olan Protein S'nin aynı zamana TFPI için de gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Protein S'nin kofaktörlüğünde, TFPI'nin, Faktör Xa'yı 10 kat daha fazla baskıladığı gösterilmiştir (94).

Mayer ve ark (95) plasma lipoproteinlerinden özellikle VLDL' nin in vivo olarak TF ve Faktör VII aktivitesini başlattığını, protrombinaz kompleksinin fonksiyonlarını da hızlandığını bildirmişlerdir.

Plazmadaki Faktör VII' nin koagulant aktivitesinde, triaçilgliserollerden zengin şilomikron ve VLDL arasında pozitif korelasyon olduğu (96), benzer şekilde vitamin K' ya bağımlı koagulasyon proteinleri ile, plazmadaki VLDL arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (97).

Periferdeki mononükleer hücrelerin prokoagulant aktivitelerinin olduğunu ve VLDL' nin bu hücrelerin prokoagulant aktivitesini ortaya çıkardığını, TF' nin de bunlardan biri olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar vardır (98,99).

Kjalke ve ark (21) Faktör VII ve monosit ilişkisinde lipoproteinlerin prokoagulant aktivitede etkili olup olmadığını incelemişler. Koagülasyon inflamasyon ilişkisi nedeniyle endotoksin içermeyen lipoproteinleri kullanmışlar ve VLDL' nin Faktör VII aracılığı ile Faktör Xa aktivitesinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar bu inceleme sırasında monositlerde TF aktivitesi görmedikleri için, plasma lipoproteinlerinin TF'den bağımsız olarak Faktör VII aktivasyonu yaparak hiperkoagülasyon yaptığını bildirmişlerdir.

Bu çalışmalara göre; TF aktivitesi artmasa da, hiperlipidemi nedeniyle Faktör VII'ye bağlı hiperkoagülasyon gelişebilir. Bu durum da koroner arter hastalıkları için önemli bir risk teşkil eder.

Biz bu bilgilerin ışığı altında yaptığımız çalışmada, kısa süreli hiperlipidemide kandaki TF değerini kontrol grubuna göre arttığını gördük. Apo B ile immunize ettiğimiz grupta hiperlipidemik grubun alındığında bir farklılık görülmemiştir. Yani antijen olarak verdiğimiz Apo B bir değişim sağlamamıştır. Aktivite olarak ölçtüğümüz karaciğerdeki TF aktivitesi de kandakine paralellik göstermiş ve karaciğer dokusunun TF aktivitesi artmış yani saniye olarak kısalmıştır . Apo B ile immunize ettiğimiz hayvanlarda sonuç değişmemiştir.

Sonuçlarımız değerlendirildiğinde kısa sürede hayvanlarda anlamlı olarak hiperlipidemi ve hiperkoagülasyon geliştiği düşünülür. Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlara Apo-B konjugatı verilmesi ile LDL kolesterol miktarında azalma diğer lipid fraksiyonlarında artma görülmüştür. Burada Apo B konjugatı vermemizin nedeni, LDL fraksiyonunda büyük oranda bulunan bu proteini vererek immun sistemi harekete geçirdiğimizde sonuçların nasıl etkileneceğini görmek içindir.

Yapılan çalışmalar aterosklerozde immun sistemin önemli olduğunu bildirmektedir. Bu nedenle immunolojik reaksiyonları başlatacak güçlü antijenlere

dikkat çekilmiştir. Isı şok proteini (HSP-65) ile immunize edilmiş C57BL/6J farelerde yağlı çizgi oluşumu hızlanmıştır (100).

Bizim çalışmamızda başlangıçta ve 7. günde hayvanlara enjekte ettiğimiz Apo B -100' ün farklı parametrelerde farklı göstergeler vermesi bu mekanizma içinde çeşitli nedenleri olabilir. Çünkü ateroskleroz multifaktörial bir prosesdir. En belirgin özelliği lipitlerin arter duvarına birikmesidir. Bu birikime mononükleer hücre infiltrasyonu ve düz kas hücrelerinin proliferasyonu da iştirak eder. Aterosklerotik lezyonun çeşitli safhalarında T hücrelerinin ve immunglobulinlerin bulunması bu oluşumda immun sistemin de etkili olduğu kabul edilmektedir. Fakat bizim verdiğimiz antijenin sonuçlara etkisinin değerlendirilmesi için çok daha detaylı bir çalışma yapılması gerekmektedir.

Kolesterol yüksekliğinin olumsuz sonuçlarından biri peroksidasyondur. Lipoproteinlerin oksidasyonu ve oksidatif prosesler aterosklerotik lezyonun meydana gelmesinde ve sürecin hızlı ilerlemesinde önem taşıdığı insan ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda görülmüştür. Çünkü aterosklerotik lezyonda ox-LDL vardır. Ayrıca aterosklerotik lezyonlarda lipid peroksidasyon ürünleri; modifiye olmuş apoproteinler görülür. Burada vasküler hücrelerin sitotoksik hasarı da söz konusudur. Bu hasarın bilinen nedenleri şöyle özetlenebilir; Nitrik oksid salınması ile oluşan vazodilatasyona karşı çeşitli inhibe edici etkiler ile damar yapısı bozulur, geçirgenliği artar, monositlerin arter duvarını geçerek makrofajlardara dönüşür ve çöpcü reseptörler ile oksidlenerek modifiye olmuş LDL' yi toplamaya başlar. Bu esnada pek çok adezyon molekülleri ve sitokinler prosese katılarak bir taraftan da inflamatuvar yanıt prosesi devreye girer. LDL' nin oksidasyonu ile beraber lipid peroksidasyon işlemleri başlar ve reaktif aldehydler ortama çıkar. Lipid peroksidasyonu sırasında gelişen reaktif aldehydler LDL' de önemli bir protein olan Apo B' nin lizin ve histidin kalıntıları ile kovalant bağlar oluşturur. Böylece LDL üzerinde yüksek immunojeniteye sahip modifiye lizin kalıntıları belirir. Bu şekilde modifiye olmuş LDL' de MDA - lizinler ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) lizinler oluşur.

Stabil bir molekülde elektronlar dış orbitalde çift olarak bulunmaktadır. Böylece her bir elektronun zıt spine sahip bir eşinin olması sağlanarak kararlı bir yapı

oluşmaktadır. Eğer son yörüngedeki orbital elektron alırsa veya kaybederse, yani atom veya molekül bir veya daha çok sayıda çiftlenmemiş elektron taşıyıcı hale gelirse yapı artık bir serbest radikal halini alır. Bu şekilde elektron düzenleri bozulduğu için kararlılıklarını kaybetmiş ve bu yüzden reaktif hal almış atom veya molekül grupları olan serbest radikaller oksidasyona neden olduğu için aterosklerozda üzerinde önemle durulan konulardan biridir.

Oksijen özel atomik yapısı nedeniyle radikal oluşumlarında önemli rol üstlenir. Aslında oksijen aerobik hücrelerde oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretiminde gerekli bir maddedir. Oksijenin % 99' u oksidatif fosforilasyon sırasında suya dönüşmekte ve ATP sentezine sebep olmakla birlikte yaklaşık % 1' i toksik maddelere dönüşebilmektedir. Oksijenin tek elektron transferi ile redüksiyonu serbest radikal anyonu oluşturur. Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin elektron alarak indirgenmesi sonucu superoksit radikal anyonu meydana gelir. İki superoksit molekülü reaksiyona girerek hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana gelir. Hidrojen peroksit serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Hidrojen peroksit hücre membranlarından kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Demir ve bakır gibi geçiş metal iyonlarının katalizörlüğü hidroksil radikal üretimini kolaylaştırır (4,26).

Lipit peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre membranında bulunan poliansature yağ asitlerin oksidasyonuna yol açan kimyasal bir olaydır. Poliansature yağ asitleri içerdikleri çift bağlar nedeniyle oksidasyona oldukça duyarlıdır. Bu nedenle hücre membranları lipid peroksidasyonundan en çok zarar gören bölgelerdir. Hücre zarındaki poliansature yağ asidlerinin alfa metil gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile lipid peroksidasyonu başlar.

Zincir yapısından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile yağ asidi bir lipid radikali haline gelir. Burada etken serbest radikalın süperoksit veya hidroksil radikallerinin olduğu düşünülmektedir (4).

Meydana gelen lipid peroksitleri yıkılarak aktif yapılar olan aldehid ve karbonil bileşiklerine dönüşürler. 3 veya daha fazla çift bağ içeren yağ asidlerinin peroksidasyonu ile malondialdehid meydana gelir. Hedef dokularda meydana gelen değişikliklerin sebebinin MDA olduğu düşünülmektedir. Peroksidasyonla oluşan

MDA, membran yapılarını etkileyerek çapraz bağlanma ve polimerizasyona sebep olabilmektedir. İyon taşıma bozuklukları, enzimlerde fonksiyon bozukluklarının sebebi de MDA' dır. Bu nedenle bu molekülün; ateroskleroz, hipertansiyon, diabetes mellitus, yaşlanma gibi çeşitli olayları yaptığı ve karsinojenik, genotoksik ve mutajenik özellikler taşıdığı düşünülmektedir. İyonize radyasyonun serbest radikal üretimine neden olduğu bildirilmiştir.

Aterosklerozda reaktif oksijen türlerinin hücrel kaynakları, endotel hücreleri, intimaldaki düz kas hücreleri ve monosit kökenli makrofajlardır. Serum lipoproteinleri özellikle LDL kolesterol konsantrasyonu artışı ateroskleroz için önemli bir risk faktörüdür. LDL' nin klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda aterosklerozdan sorumlu olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir. Superoksit anyonunun fagosit ve düz kas hücreleri yoluyla LDL oksidasyonunu uyaran bir ajandır. Tioller metal iyonları varlığında LDL oksidasyonunu uyaran superoksit radikali oluştururlar. İn vitro şartlarda LDL' nin demir ve bakır gibi geçiş metallere varlığında oksidatif modifikasyona uğradığı bildirilmiştir. LDL'nin oksidasyonunda LDL yoğunluğu önem taşır. Küçük yoğun LDL koroner arter hastalığı gelişiminde daha etkindir. Çeşitli çalışmalar küçük yoğun LDL'nin oksidasyona daha yatkın olduğunu göstermiştir. LDL oksidasyonu çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonu ile sonuçlanan bir olaydır. Bunun sebebi de serbest radikallerdir.

Oksidasyon başlangıçta LDL içindeki antioksidanların varlığı ile baskılanır. Baskılamanın mümkün olmadığı ve oksidasyonun ilerlemesi durumunda LDL oksidasyonu hızlanır. Sonuçta MDA ve diğer çeşitli aldehit ürünleri LDL içindeki Apo B' ye zarar verir. Bunun sonunda dokulardaki LDL reseptörleri tarafından LDL dokulara geçemez fakat çöpcü reseptörler tarafından makrofajlara girişi artar. Burada LDL' nin MDA içeriği çok artmıştır.

İmmunolojik yapıda olduğu kabul edilen MDA tarafından modifiye edilmiş LDL, immün kompleks oluşumunu uyarır bu agregatlar kolesterol birikimini arttırırlar. Aterosklerozdaki lezyonlarda okside LDL' ye karşı antikorların varlığı hastalığın ilerlemesi ile pozitif korelasyonlu olduğu gösterilmiştir.

Antioksidan mekanizmalar serbest radikallerin en önemli dengeleyicileridir. Antioksidan moleküller serbest radikaller ile etkileşime girerek zincir reaksiyonunu sonra erdirirler, kendi elektronlarını vermek suretiyle serbest radikalleri nötralize ederler ve hayati molekülleri hasardan korurlar.

Bu çalışmada karaciğer homojenatında kontrol ve hiperlipidemik lipid peroksidasyon değerlerini malondialdehid düzeylerini ölçerek inceledik.

Hiperlipidemik grupta GSH ve LPO değerlerinin arttığını gördük. GSH'ın artma nedeninin kompenzasyon olduğunu düşündük. Apo-B bile immunize edilen hiperlipidemik grupta GSH değerleri yüksek kalmaya devam ederken LPO değerlerinde azalma görülmüştür. Bu bulgular vermiş olduğumuz immunojenin lipid peroksidasyonu azatlığını göstermiş olması yönünden olumlu görülmektedir. Ancak daha fazla deney hayvanı grubu ile bu çalışmanın immunolojik ölçütleri de kullanarak yapılmasında fayda olduğunu düşünmekteyiz.

Bu çalışmada birçok fizyolojik olayda etkin olan siyalik asidin deneysel olarak yapmış olduğumuz kısa süreli hiperlipidemide nasıl bir değişim göstereceğini inceledik ve hiperlipidemik grupta siyalik asid değerlerinin kontrol grubuna göre artmış olduğunu gördük.

Apo-B konjugatı ilavesi ile hiperlipidemik grupta siyalik asid düzeyleri azalırken LDL konjugatı ilave edildiğinde hiperlipidemik grubun siyalik asid düzeyi anlamlı olarak artmıştır . Kimi araştırmacılara göre sialik asid endotel hücreleri için koruyucu bir role sahiptir (81). Hücrelerin birbiri ile interaksyonu ve hücre proliferasyonunda sialik asidin önemli fonksiyonu olduğu bilinir (82). Bizim değerlerimizde görülen siyalik asid artışının nedeni oksidasyona bağlı gelişen hücre hasarını korumak olduğu düşünülebilir.

Sonuç olarak; ateroskleroz gelişiminin ilk basamağı olan endotel disfonksiyonuna neden olan sebepler sadece alternatif yol ile intimada oksidlenmiş LDL birikimi değildir. Pek çok olaylar zinciri endotel bozukluğuna neden olur. Örneğin periferik dolaşımda ve koroner dolaşımda endotele bağımlı vazodilatasyon nedeni ile asetilkolin ve nitrik oksid salınmasında değişimler, buna bağlı olarak düz

kas hücrelerinin mediadan intimaya göç etmesi, intimada proliferasyona uğramaları, damar çeperine monositlerin infiltrasyonu, monosit ve makrofajlarda TF bulunması, bu alanda T hücrelerinin ve proinflamatuvar stokinlerin görünmesi gibi olaylar endotel bozulmasının nedenleri arasındadır.

Hiperlipidemide kullanılan hipolipidemik ilaçlar ateroskleroza yol açan risk faktörlerinden biri olan kolesterolu tedavi etmektedir. Ancak aterosklerozun sebep olduğu kalp damar hastalıklarının nedeni, yukarıdaki paragrafta kısaca değinildiği gibi, sadece yüksek kolesterol değildir. Ateroskleroz ve ona bağlı komplikasyonların önlenmesi için, bu çalışmada tartıştığımız noktalara bir bütün halinde bakmak ve bizim yaptığımız bu kısa süreli hiperlipidemiden elde ettiğimiz sonuçları da tedavi stratejisi olarak dikkate almak ve bu konudaki çalışmalarını arttırmak gereklidir diye düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Ulutin ON. The relationship of haemostatic system to the vessel wall, thromboembolism, atherosclerosis from pathogenesis and laboratory standpoints Turk J Haematol 19 : 7-29, 2002.
2. Bochli E. Historical review, History of tissue factor. Br J Haematol, 110:248-255,2000.
3. Emekli N. Hemostatik sistemin dünü ve bugünü. İçinde: Temel ve Uygulamalı Biyokimya sayfa.445-458, 4. Baskı, Akademi Matbaası, İstanbul, Marmara Yayınları, 2006.
4. Emekli N. Biochemical Aspects of Haemostasis. In:Basic and Applied Biochemistry. Sayfa:341-417, Marmara Üniversitesi Yayınları No.556, Dışhekimliği Fakültesi Yayın No.3. İstanbul, 1994.
5. Lairon D, Defoort C. Effects of nutrients on postprandial lipemia. Current Vascular Pharmacology. 9(3):309–312, 2011.
6. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. Circulation 111: 3481-3488, 2005.
7. Taubman MB : Atherosclerosis, thrombosis and coroner artery disease. Ed: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U: Williams Hematology, s.1743-1752, 6. Baskı. Mc Graw-Hilb, 2001.
8. Koba S, Tanaka H, Maruyama C, Tada N, Birou S, Teramoto T, Sasaki J. Physical activity in the Japan population: association with blood lipid levels and effects in reducing cardiovascular and all-cause mortality. J Atheroscler Thromb 18(10):833-45,2011.
9. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high risk plaque: part 1: evolving concepts. J.Am.Coll.Cardiol. 46 : 937-954, 2005.
10. Andrea DD, Ravera M, Golino P, Rosica A, Felice M, Raagni M, CirilloP, Vigorito F, Corcione N, Tommasini P, Gargiulo A, Piro O, Calabro, Chiariello M. Induction of

- tissue factor in the arterial wall during recurrent thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23: 1689-1694, 2003.
11. Day SM, Reeve JI, Pederson B, Farris DM, Myers DD, Im M, Wakelfield TW, Mackman N, Fay WP . Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from primarily from the blood vessel wall. *Blood* 105:192-198, 2005.
 12. Emekli N. Koagulasyon ve İnflamasyon. Tromboz Hemostaz ve Anjioloji Kongre Kitabı Editör Orhan N. Ulutin, sayfa 69-77, İkitte Matbacılık Hizmetleri, İstanbul, 2004.
 13. Ding L, Ma Wanahu, Littmann T, Camp R, Shen J. The Pfy2 nucleotide receptor mediates tissue factor expression in human coronary artery endothelial cells. *JBC* 235176:1-20, 2011.
 14. Yarat A. Tromboplastik Aktivite. IV. Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongre Kitabı. Editör Orhan N. Ulutin , sayfa 97-105, May Matbacılık Lt.Şti. İstanbul, 2003.
 15. Tunalı T. Çeşitli dokulardan elde edilen tromboplastin ile oluşturulan yaygın damar içi pıhtılaşmasında koagulasyon testlerinin incelenmesi ve bazı ilaçların bu klinik tabloya etkisinin değerlendirilmesi. M.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Danışman: Prof. Dr. Ayşen Yarat, İstanbul, 2002.
 16. Emekli-Alturfan E, Başar I, Malalı E, Elemek E, Oktay S, Ayan F, Emekli N, Noyan U. Plasma tissue factor levels and salivary tissue fakcor activities of periodontitis patient with and without cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb* 37(2-4):77-81,2009.
 17. Emekli NB, Ulutin ON. Some properties of autoprothrombin II-A anticoagulant, *Recent Progress in Blood Coagulation and Thrombosis Research. Biblioth Haem.*44:15 20,1978.
 18. Mackman N, Taubman M. Tissue factor: past, present and future. *Arterioscler Thromb. Vasc Biol.* 29:1986-1988, 2009.
 19. Berckmans RJ, Stur A, Marianne CL, Nieuwland R. Cell derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood.* Doi.10.1182/blood 2010-06-290460 republished online january 19, 2011.

- 20.Fregula CF, Marchese P, Gruber A, Ruggeri ZM, Ruf W. P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin Invest.*121,7:2932-2944,2000.
- 21.Kjalke M, Silveira A, Hamsten A, Hedner U, Ezban M. Plasma lipoproteins enhance tissue factor-independent factor VII activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1835- 1841, 2000.
- 22.Bakarewa MI, Morrissey JH, Tarkowski A. Tissue factor as a proinflammatory agent. *Arthritis Res.* 4:190-195,2002.
- 23.Roselar SE, Schonfeld G, Daugherty A, Enhanced development of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits by suppression of cell mediated immunity. *J Clin Invest.* 96:1389-94, 1995.
- 24.Sebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacology and experimental Therapeutics* 300:729-735, 2002.
- 25.Shi Q, Vandenberg JF, Jett C, Rice K, Leland M, Talley L, Kushwaha RS, Rainwater L, Vandenberg JL, Wang L. Arterial endothelial dysfunction in baboons fed a high cholesterol, high fat diet. *Am J Clinical Nutrition* 82(4):751-759, 2005.
- 26.Alturfan EI. Tükürüğün antioksidan kapasitesi. İçinde: Tükürük: histolojisi, mikrobiyolojisi, biyokimyası. Editörler: Prof. Dr. Nesrin Emekli ve Prof. Dr. Ayşen Yarat, Nobel kitapevi, İstanbul, 2008.
- 27.Şahin Ali. Hiperlipidemi yapılmış farelerin kanlarında oksidlenmiş düşük dansiteli lipoprotein ve lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Danışman: Prof. Dr. Nesrin Emekli, İstanbul, 2010.
- 28.Handsson GK : Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Eng J Med* 352: 1685-1695, 2005.
- 29.Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J. Thrombosis and Thrombolysis.* 17: 35-44,2004.

- 30.Christopher K. G, Joseph L. W.: Atherosclerosis: The Road Ahead. Cell, 104:503–516, 2001.
- 31.Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Amer. J. Pathology 134 (5): 1087-1097, 1989.
- 32.Wintrobe's Clinical Hematology. 9. Baskı vol. 1, sayfa 578, Lea& Febiger,1993.
- 33.Butenas S, Orfeo T, Mann K. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When?. Arterioscler Thromb Vasc Biol 29:1989-1996, 2009.
- 34.Rapaport SI, Rao LV.Tissue factor pathway: How it has become a "prima ballerina". Thromb Hamost. 74:7-17,1995.
- 35.Ruf W, Dorlieulner A, Riewald M. Specificity of coagulation factor signaling J Thromb Haemost 1:1495-1503, 2003.
- 36.Rickles FR, Patierno S, Fernandez PM. Tissue factor, thrombin and cancer. Chest 124:58S-68S, 2003.
- 37.Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. Blood, 71(1):1-8, 1988.
- 38.Rauch U, Nemerson Y. Tissue factor, the blood and the arterial wall. Trends Cardiovasc.Med.10:139-143, 2000.
- 39.Malalı E, Basar I, Emekli-Alturfan E, Elemek E, Oktay S, Ayan F, Emekli N, Noyan U: Levels of C-Reactive Protein and Protein C in Periodontitis Patients With and Without Cardiovascular Disease. Pathophysiol Haemost Thromb. 37(1):49 - 54, 2010.
- 40.Conde ID, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA: Tissue factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. Blood 106: 1604-1611,2005.
41. Creasey A.A., Chang A.C., Feigen L.: Tissue factor pathway inhibitor reduces mortality from escherichia coli septic shock. J Clin Invest. 91:2850-2855, 1993.
- 42.Demir M., Vural Ö.: TF yolu inhibitörü: Normal hemostaz mekanimada ve patolojik durumlardaki rolü. Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongre Kitabı s.20-22 Editör:Prof. Dr. Orhan N. Ulutin. İkite Yayıncılık, İstanbul, 2001.

- 43.Griffin JH. Control of coagulation reactions. In: Williams Hematology. Eds: Beutle E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, McGraw Hill, New York, p. 1435-1449,2001.
- 44.Price GC,Thompson SA, Kam PCA. Tissue factor and tissue factor pathway inhibitor. *Anaesthesia*. 59:483-492,2004.
- 45.Maroney SA, Mast AE. Tissue factor pathway inhibitor and bacterial infection. *J Thromb Haemost* 9:119-121,2011.
- 46.Grignani G, Maiolo A. Cytokines and hemostasis. *Haematologica*. 85:967-972, 2000.
- 47.Salat C, Boekstegers P, Holler E.Hemostatic parameters in sepsis patients treated with anti-TNF alpha monoclonal antibodies. *Shock*. 6:233-237, 1996.
- 48.Yarat A. Sepsis ve doku faktörü.7.Tromboz, Hemostaz ve Anjioloji Kongre Kitabı. Editör. Orhan N. Ulutin, Sayfa 375-393, İkite Matbaacılık, İstanbul, 2007.
- 49.Celi A, Pellegrini G, Lorenzet R, De Blasi A, Ready N, Furie BC, Furie B. P selectin induces the expression of tissue factor on monocytes. *Proc Natl Acad Sci* 91:8767-8771, 1994.
- 50.Kimi J, Min JK, Park JA, Doh HJ, Choi YS, Rho J, Kim YM, Kwon YG. Receptor activator of nuclear factor kB ligand is a novel inducer of tissue factor in macrophage. *Circulation Res*. 107:871-876, 2010.
- 51.Jiand X, Bailly MA, Panetti S, Cappello M, Konigsbergi H, Bromberg E. Formation of tissue factor-factor VIIa-faktör Xa complex promotes cellular signaling and migration of human breast cancer. *J Thrombosis and Haemostasis* 2:93-101,2003.
- 52.Ahamed J, Ruf W. PAR-2 dependent phosphorylation of the tissue factor cytoplasmic domain. *J Biol Chem*. 22:23038-23044, 2004.
- 53.Milsom C, Magnus N, Meehan B, Nedawi KA, Garnier D, Rak J. Tissue factor and cancer stem cells: Is there a linkage? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29: 2005-2014, 2009.
- 54.Schaffer F, Ruf W. Tissue factor and PAR2 signaling in the tumor microenvironment. *Arterioscler Thromb Asc Biol* 29:1999-2004.

55. Mackman N, Morrissey JH, Fowler B, Edgington TS : Complete sequence of the human tissue factor gene, a highly regulated cellular receptor that initiates the coagulation protease cascade. *Biochemistry* 4: 1755-1762, 1998.
56. G.J. Broze, Tissue factor pathway inhibitor gene disruption. *Blood. Coag. Fibrinol.* 9:89, 1992
57. Bres Low JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 272: 685-90, 1996.
58. Zhou J, May L, Liao P, Gross PL, Weitz JI. Inferior vena cava ligation rapidly induces tissue factor expression and venous thrombosis in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:863-869, 2009.
59. Pan Shuchong, White TA, Witt TA, Chiriac A, Mueske CS, Simari RD. Vascular directed tissue factor pathway inhibitor overexpression regulates plasma cholesterol and reduces atherosclerotic plaque development. *Circulation Research* 105:713-720, 2009.
60. Kiersenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi* s.296, Çeviri Demir, R. Palme Yayıncılık, 2006.
61. Wolf K, Rith M, Niendorf A, Biesegel U, Dietel M. Thrombosis: Cellular elements of the vasculature. *Circulation* 80: 522-526, 1989.
62. Lerman A, Zeiher AM: Endothelial Function: Cardiac Events. *Circulation* 111(3): 363-68, 2005.
63. Marcus AJ, Hajjar DP. Vascular transcellular signalling. *J Lipid Res* 34: 2017-21, 1993.
64. Cines DB, Pollak ES, Buck CA. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-3532, 1998.
65. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO : *Dolaşım sistemi*, Çeviri Ed. AYTEKİN Y, SOLAKOĞLU S, AHİŞHALI B. *Temel Histoloji Sayfa 203-213*, Barış Kitapevi, 1998.
66. Hajjar KA, Esmon NM, Marcus AJ, Muller WA: *Vascular function in hemostasis*. Ed: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U : *Williams Hematology*. 6 baskı, s. 1451-1469, McGraw-Hill, America, 2001.

67. Hein TW, Liao JC, Kuo L. Ox-LDL specifically impairs endothelium dependent, NO mediated dilation of coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278:H175-H183,2000.
68. Ulutin ON. *Platelets: Fundamentals and Clinical Applications.* Kağıt ve Basım İşleri AŞ. İstanbul, 1977.
69. Mehta SR, Yusuf S.. Short- and long- term oral antiplatelet therapy in acute coronary syndromes and percutaneous coronary intervention. *J. Am. Coll Cardiol* ;41:79S-88S, 2003.
70. Emekli N. Lipids. In: *Basic and Applied Biochemistry.* Sayfa:341-417, Cem Ofset AŞ. 2004.
71. Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL. A low-fat diet decreases high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels by decreasing HDL apolipoprotein transport rates *Journal of Clinical Investigation* 85: 144-51, 1990.
72. Chait A, Heinecke JW. Lipoproteins, modified lipoproteins and atherosclerotic vascular disease. In: *Lipoproteins in Health and Disease* Eds: Betteridge DJ, Illingworth DR, Shepherd J. s. 597-10, Arnold 1999.
73. E. Bravo E., M. Napolitano M, Botham KM. Postprandial lipid metabolism: the missing link between life-style habits and the increasing incidence of metabolic diseases in western countries? *Open Translational Medicine Journal*, vol. 2, pp. 1–13, 2010.
74. Yang SY, Bao JH, Zhang JP. Experimental studies of hyperlipidemia in rats and mice given a hyperlipidemic diet. *Chung kuo Chung Yao Tsa Chi.* 14(1):48-51, 1989.
75. Wojcicki J, Samochowiec L. Experimental model of hyperlipidemia in rats. *Pol J Pharmacol Pharm* 35(6):437-443, 1983.
76. Horvath EM, Blazovics A, Kemeny T, Vasahelyi B, Weinbrenner Z, Feter J. Antioxidant effect of vitamin E in experimental hyperlipidemia. *Orv.Hetil.* 134(32):1757-1760, 1993.
77. Dinçer S, Doğan F, Koç L, Yarat A. Deneysel hiperlipidemi ve sirkenin etkisi. Sorumlu öğretim üyesi Prof. Dr. Ayşen Yarat, Arş. Gör. Leyla Koç. Öğrenciler M.Ü.

Dişhekimliği Fakóltesi 1. sınıf İ.Ü. Dişhekimliği Fakóltesi Öđrenci Araştırma Kulübü.
VI. Bilimsel Toplantısı Özet Kitabı s. 26-27,1998.

78.Nelson DL, Cox MM. Lipid Biosynthesis, Bioenergetics and Metabolism. Ed. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principle of Biochemistry s. 804-810, Worth Publishers, New York, 2000.

79.Akın G, Pekgöz E, Gökhan İH. Karaciğer. S. 22-24, Tertip Matbaa, İstanbul, 1992.

80.Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. Biochem Cell Biol 68: 989-93, 1990.Goldberg I, Eckel RH, Mc Pherson R. Triglyceride and heart disease: Still a hypothesis? Arterioscl. Thromb. Vasc Biol 31(8):1716-1725, 2011.

81.Reganon E, Vila V, Martinez-Sales V, Vaya A, Mira Y, Fernando F, Aznar J. Sialic acid is an inflammation marker associated with a history of deep vein thrombosis. Thrombosis Research; 119: 73-78,2007.

82.Crook MA. Sialic acid and cardiovascular disease. Med Biochem 1: 123-30, 1999.

83.Ogan A. Meme ucu akıntısının lipid kompozisyonunun incelenmesi ve anne sütünün lipid kompozisyonu ile karşılaştırılması. Doktora tezi. Danışman: Prof. Dr. Nesrin Emekli M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul,1992.Badimón L, Vilahur G, Padró T, Lipoproteins, platelets and atherothrombosis, Revista Espanola de Cardiologia, 62: 1161–1178, 2009.

84.Ingram GIC, Hills M. Reference Method for the one stage prothrombin time test on human blood. Thromb. Haemostas. 36:237-38, 1976

85.Beutler E. Glutathione : Red cell metabolism a manual biochemical methods. 2 nd edition. S.112-114, Grune and Stratton, New York, 1975.

86. Yagi K: assay for blood or serum methods in enzymology. Methods Enzymol. 105: 328-337, 1984.

87. Warren I. The tiobarbiturik acid assay of sialic acids. J. Biol Chem. 234: 1971-1975,1959.

88. Manzi S, Selzer F, Sutton Tyrrell K, Fitzgerald SG, Rairie JE, Tracy RP, Kuller LH. Prevalence and risk factors of carotid plaques in women with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*. 42:51-60,1999.
89. Silveira A, Karpe F, Johnson H, Bauer KA, Hamsten A. In vivo demonstration in humans that large postprandial triglyceride rich lipoproteins activate coagulation factor VII through the intrinsic coagulation pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1333-1339, 1996.
90. Luo D, Szaba FM, Kummer LW, Plow EF, Mackman N, Gailani D, Smiley ST. Protective roles for fibrin, tissue factor, plasminogen activator inhibitor-1 and thrombin activatable fibrinolysis inhibitor, but not factor XI, during defense against the gram negative bacterium yersinia enterocolitica. *J of Immunology* July 2011. *Immunol:doi* 10.4040/jimmunol.1101094,2011.
91. Tooney JR, Kratzer KE, Lasky NM, Stanton JJ, Broze GJ Jr. Targeted disruption of the murine tissue factor gene results in embryonic lethality. *Blood* 88:1583-1587,1996.
92. Zilman A, Luther T, Muller I, Kotzsch M, Spannag M, Kauke T, Oelschagel U, Zahler S, Engelmann B. Platelet associated tissue factor contributes to the collagen triggered activation of blood coagulation *Biochem Biophys Res Com* 281:603-609, 2001.
93. Schwertz , Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich As. Signal dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp. Med.* 203:2433-2440, 2006.
94. Hackeng TM, Rosing J. Protein S as a cofactor for TFPI. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:2015-2020, 2009.
95. Mayer MP, Tracy RP, Tracy PB, van't Veer C, Sparks CE, Mann KG. Plasma lipoproteins support prothrombinase and other procoagulant enzymatic complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:458-465, 1998.
96. Mitropoulos KA, Miller GJ, Reeves BEA, Wilkes HC, Cruickshank JK. Factor VII coagulant activity is strongly associated with the plasma concentration of large lipoprotein particles in middle aged men. *Atherosclerosis*. 76:203-208,1989.

97. Xu N, Dahlback B, Ohlin AK, Nilsson A. Association of vitamin K dependent coagulation proteins and C4b binding protein with triglyceride rich lipoproteins of human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:33-39, 1998.
98. Schwartz BS, Levy GA, Curtiss LK, Fair DS, Edgington TS. Plasma lipoprotein induction and suppression of the generation of cellular procoagulant activity in vitro. *J Clin Invest.* 67:1650-1658, 1981.
99. Wada H, Kaneko T, Wakita Y, Minamikawa K, Nagaya S, Tamaki S, Deguchi K, Shirakawa S. Effect of lipoproteins on tissue factor activity and PAI-II antigen in human monocytes and macrophages. *Int J Cardiol* 47:521-525, 1994.
100. George J, Shoenfeld Y, Afek A, Gilburd B, Keren P, Shanish A, Kopolovic J, Wick G, Harats D. Enhanced fatty streak formation in C57BL/6J Mice by immunization with heat shock protein-65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:505-510, 1999

7. ETİK KURUL ONAYI



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURULU
PROJE ONAY FORMU

PROJENİN ADI : Deneysel hiperlipidemide kan doku faktörü, lipid peroksidasyon ürünleri ve sialik asid ilişkisinin değerlendirilmesi.

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ : Prof.Dr. Nesrin EMEKLİ

PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR : Nazlı Benun Kılıç

PROJENİN YÜRÜTÜLECEĞİ LABORATUVAR : M.Ü.Dişhekimliği Fakültesi
Biyokimya Laboratuvarı

ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI : 13.05.2010-39.2010.mar

Sayın : Prof.Dr. Nesrin EMEKLİ

“Deneysel hiperlipidemide kan doku faktörü, lipid peroksidasyon ürünleri ve sialik asid ilişkisinin değerlendirilmesi.” isimli projeniz Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Çalışmalarınızda başarılar dileriz.

Prof.Dr. Zafer GÖREN

Prof.Dr. Ayşen YAKARAT

Öğr. Gör. Dr. Gürkan SERT

Av. Serkan DURAN

Prof.Dr. Berrak YEĞEN
Hayvan Deneyleri Etik Kurul
Başkan

Prof.Dr. Göksel ŞENER

Doç.Dr. Hanıl TUĞTEPE

Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ

Av. Onur GİR

Not: Deneylerin yapılması sırasında ortaya çıkan zorluklar, deney protokolünde yapılması gereken değişiklikler, “Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu’na” bildirilmelidir. Bütün yazışmalarda, proje onay tarihi ve onay sayısı belirtilmelidir. Araştırmacıların proje ile yapılan bütün yazışmalarda proje onay tarih ve numarası belirtmesi zorunludur.

8. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	N. Benun	Soyadı	KILIÇ
Doğum Yeri	İSTANBUL	Doğum Tarihi	01.02.1984
Uyruğu	T.C.	Tel	541 830 93 01
E-mail	benunn@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ	2008
Lise	ÇAPA ANADOLU ÖĞRETMEN LİSESİ	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	BİYOLOJİ ÖĞRETMENİ	KOÇ EĞİTİM	2009-
2.			
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	ORTA	ORTA	ORTA

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı		81	
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft office	İYİ

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin