



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK KOLESTEROL DİYETİ İLE OLUŞTURULAN ATEROSKLEROZ  
MODELİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES VE NÜKLEER  
FAKTÖR-ERİTROİD 2 İLİŞKİLİ FAKTÖR 2 YOLAĞININ ROLÜ**

PERİNUR BOZAYKUT

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER

İSTANBUL-2015





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YÜKSEK KOLESTEROL DİYETİ İLE OLUŞTURULAN ATROSKLEROZ  
MODELİNDE ENDOPLAZMİK RETİKULUM STRES VE NÜKLEER  
FAKTÖR-ERİTROİD 2 İLİŞKİLİ FAKTÖR 2 YOLAĞININ ROLÜ**

PERİNUR BOZAYKUT

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Nestrin KARTAL ÖZER

İSTANBUL-2015

T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ



## TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Doktora  
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyokimya  
Tez Sahibi : Perinur BOZAYKUT  
Tez Başlığı : Yüksek kolesterol diyeti ile oluşturulan ateroskleroz modelinde endoplazmik retikulum stres ve nükleer faktör-eritroid 2 ilişkili faktör 2 yolağının rolü  
Sınav Yeri : Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Sınav Tarihi : 30.09.2015

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

**Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)**  
Prof.Dr. Nesrin KARTAL ÖZER

**Kurumu**  
M.Ü. Tıp Fak.

**İmza**



**Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)**

Prof.Dr. Nesrin KARTAL ÖZER  
Prof.Dr. A.Süha YALÇIN  
Prof.Dr. A.Semra KOÇTÜRK  
Prof.Dr. Nazlı ARDA  
Doç.Dr. Betül KARADEMİR

M.Ü. Tıp Fak.  
M.Ü. Tıp Fak.  
Dokuz Eylül Üniv.  
İstanbul Üniv.  
M.Ü. Tıp Fak.



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 09./10./2015 tarih ve 77. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



-Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.

-Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

## BEYAN

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

31/08/15

PERİNUR BOZAYKUT



## TEŞEKKÜRLER

Yüksek eğitimim boyunca yaptığı çok değerli yönlendirmeleri ve desteğinin yanında, araştırmalardaki disiplini ve özverisi ile yol gösteren, akademik kariyerim için sağladığı tüm katkılarından ötürü sevgili danışmanım **Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer**' e,

Sağladığı olanaklardan dolayı Genetik ve Metabolik Hastalıklar Araştırma ve Uygulama Merkezi (GEMHAM) kurucusu merhum **Prof. Dr. Yavuz Tağa**' ya,

Eğitim ve öğretimi her zaman severek sağlayan, araştırmalarımız için değerli katkı ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen **Doç. Dr. Betül Karademir**' e,

Doktora eğitimim boyunca destekleri için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri, **Prof. Dr. Süha Yalçın**, **Yrd. Doç. Dr. Saime Batirel**, **Prof. Dr. Goncağül Haklar** ve **Prof. Dr. Önder Şirikçi**' ye

Sevgili grup arkadaşlarım **Erdi Sözen**, **Burak Yazgan**, **Ali Şahin**, **Tuğçe Demirel**, **Aslı Ece**, **Alper İsmiçoğlu**, **Esra Özaltın**, **Elif Kağa**, **Ceyda Çörek**, **Seyfettin Üstünsoy** ve **Fethullah Gerin**' e

Yardımları ve içten arkadaşlıkları için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda bulunan tüm çalışma arkadaşlarım **Ayşe Mine Yılmaz**, **Ergül Mutlu Altundağ**, **Betül Güngördü**, **Gülce Sarı** ve **Şenol Yolcu**' ya,

Tüm eğitim hayatım boyunca her konuda samimi yardımlarını eksik etmeyen ve desteklerini her zaman hissettiğim çok sevgili **AİLEME**,

En içten **TEŞEKKÜRLERİMİ** sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-130515-0165 numaralı proje ile desteklenmiştir.

# İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLERİN LİSTESİ .....	viii
RESİMLERİN LİSTESİ .....	ix
TABLoların LİSTESİ.....	x
1.ÖZET.....	1
2. SUMMARY .....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ .....	3
4. GENEL BİLGİLER .....	5
4.1. Ateroskleroz .....	5
4.1.1. Normal bir arterin yapısı .....	5
4.1.2. Ateroskleroz gelişiminde arter hücrelerinin görevi.....	6
4.1.2.1. Endotel hücreleri .....	6
4.1.2.2. Makrofaj hücreleri.....	8
4.1.2.3.Düz Kas Hücreleri.....	10
4.1.3. Aterosklerozun patogenezi.....	11
4.2. Endoplazmik Retikulum (ER) Stres.....	14
4.2.1. ER stres faktörleri ve moleküler mekanizması .....	14
4.2.2. ER stresin ateroskleroz ile ilişkisi .....	16
4.3. Nükleer Faktör-eritroid 2 İlişkili Faktör 2 (Nrf2) .....	18
4.3.1. Nrf2 ve savunma mekanizmaları .....	18
4.3.2.Nrf2 ve ER stres ilişkisinin aterosklerozdaki rolü .....	19
4.4. NADPH Oksidaz ve Aterosklerozdaki Etkisi .....	21
4.5. Proteazomal Degradasyon ve Aterosklerozdaki Rolü.....	22
4.6. Vitamin E .....	24
4.6.1. Vitamin E' nin kimyasal yapısı ve emilimi .....	24
4.6.2. Vitamin E' nin sinyal iletim mekanizmaları ve aterosklerozdaki rolü ....	26
5. GEREÇLER ve YÖNTEMLER.....	28
5.1. Kullanılan Gereçler .....	28
5.1.1. Kullanılan kimyasallar .....	28
Formaldehit (Merck) .....	29
5.1.2. Kullanılan cihazlar .....	30
5.1.3 Çözeltiler .....	30
5.2. Yöntemler.....	32
5.2.1. Deney planı .....	32
5.2.2. Tavşanlar ile ilgili materyallerinin alınması ve saklanması.....	33
5.2.3. Kan tetkiklerinin prensipleri .....	33
5.2.3.1. Serum total kolesterol düzeylerinin ölçülmesi.....	33
5.2.3.2. Serum $\alpha$ -tokoferol düzeylerinin ölçülmesi .....	34
5.2.4. Işık mikroskobu incelemeleri.....	34
5.2.5. Aorta dokusundan total protein izolasyonu.....	34
5.2.6. Protein konsantrasyonunun hesaplanması .....	35

5.2.7 SDS-PAGE jel elektroforezi ve immunblotlama .....	35
5.2.8. Proteazomal aktivitenin tayini .....	36
5.2.9. Kullanılan istatistiksel yöntemler .....	36
6. BULGULAR.....	37
6.1. Serum Kolesterol Düzeyleri.....	37
6.2. Serum Vitamin E Düzeyleri.....	37
6.3. Aortanın Işık Mikroskobu ile İncelenmesi.....	38
6.4. Aorta Dokusunda fosfo IRE-1 Protein Ekspresyonu .....	40
6.5. Aorta Dokusunda fosfo PERK Protein Ekspresyonu.....	40
6.6. Aorta Dokusunda Grp94 Protein Ekspresyonu.....	41
6.7. Aorta Dokusunda Grp78 Protein Ekspresyonu.....	42
6.8. Aorta Dokusunda Nrf2 Protein Ekspresyonu.....	43
6.9. Aorta Dokusunda GST $\alpha$ Protein Ekspresyonu.....	44
6.10. Aorta Dokusunda NOX4 Protein Ekspresyonu.....	45
6.11 Aorta Dokusunda Proteazom Aktivitesi.....	46
7. TARTIŞMA-SONUÇ .....	47
8. KAYNAKLAR .....	53
9. EKLER.....	66
EK-I Deney Hayvanları Etik Krulu Proje Onay Formu.....	66
EK-I Özgeçmiş.....	67

## KISALTMALAR

ABCA	“ATP binding cassette transporter”
AP-1	Aktivatör protein-1
ATF6	“Activating transcription factor 6”
BiP	“Binding immunoglobulin protein”
ECM	Ekstrasellüler matriks
ER	Endoplazmik retikulum
GRP	“Glucose-regulated protein“
GPx	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon S-transferaz
HO-1	Hem oksijenaz-1
ICAM-1	Hücre içi adezyon molekülü-1
IL	İnterlökin
IRE-1	“Inositol-requiring enzyme-1”
KLF2	Kruppel benzeri faktör 2
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
M-CSF	Makrofaj koloni stimüle edici faktör
MMP	Matriks metalloproteinaz
NADPH	Nicotinamid adenin dinükleotit fosfat
NOX	NADPH oksidaz
Nrf2	Nükleer faktör E2-ilişkili faktör 2
NF-κB	Nükleer faktör kappaB
NQO1	NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz
OxLDL	Okside olmuş düşük yoğunluklu lipoproteinler

PDGF	“Platelet-derived growth factor”
PERK	“Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase”
PGI <sub>2</sub>	Prostasiklin
PKC	Protein Kinaz C
PLA2	Fosfolipaz-A2
PI3K	Fosfotidil inositol 3-kinaz
PP2A	Protein fosfataz-2
PPAR $\gamma$	“Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma”
PTK	Protein tirozin kinaz
ROT	Reaktif Oksijen Türleri
SMC	Düz kas hücreleri
SR-A	Çöpçü reseptör-A
tPA	Doku tipi plasminojen aktivatör “
TNF	Tümör nekroz faktör
UPS	Übikitin-proteazom sistemi
UPR	Katlanmamış protein yanıtı
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekül-1

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4.1. Normal bir arterin yapısı .....	5
Şekil 4.2. Vasküler endotel hücreleri ve erken ateroskleroz lezyonlarının gelişimi ...	7
Şekil 4.3. Lezyonel makrofajların proaterojenik rolleri .....	10
Şekil 4.4. Aterosklerotik plağın gelişimi .....	12
Şekil 4.5. ER stres yanıtının oluşumu .....	15
Şekil 4.6. ER stresin erken aterogenez ve ileri plak gelişimindeki rolü .....	17
Şekil 4.7. Nrf2 aktivasyonunu etkileyen faktörler .....	20
Şekil 4.8. Proteazomun yapısı ve protein yıkımı .....	23
Şekil 4.9. $\alpha$ -Tokoferolun yapısı .....	25
Şekil 4.10 Vitamin E'nin gen ekspresyonu ve aterosklerozdaki rolleri .....	27
Şekil 6.1. Torasik aortada fosfo IRE-1 protein ekspresyonu .....	40
Şekil 6.2. Torasik aortada fosfo PERK protein ekspresyonu .....	41
Şekil 6.3. Torasik aortada Grp94 protein ekspresyonu .....	42
Şekil 6.4. Torasik aortada Grp78 protein ekspresyonu .....	43
Şekil 6.5. Torasik aortada Nrf2 protein ekspresyonu .....	44
Şekil 6.6. Torasik aortada GST $\alpha$ protein ekspresyonu .....	45
Şekil 6.7. Torasik aortada NOX4 protein ekspresyonu .....	46
Şekil 6.8. Torasik aortada proteazom aktivitesi .....	46

## RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 6.1. Her deney grubunu temsil eden bir tavşan aortasının ışık mikroskopi fotoğrafları .....	39
Resim 6.2. Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta fosfo IRE-1 protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü .....	40
Resim 6.3. Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta fosfo PERK protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü .....	41
Resim 6.4. Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta Grp94 protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü .....	41
Resim 6.5. Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta Grp78 protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü .....	42
Resim 6.6. Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta Nrf2 protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü .....	43
Resim 6.7. Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta GST $\alpha$ protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü .....	44
Resim 6.8. Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta NOX4 protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü .....	45

## TABLolarIN LİSTESİ

Tablo 4.1. Kardiyovasküler sistemde NOX aktivitesi, düzenlenmesi ve ekspresyonu .....	21
Tablo 6.1. Sekiz hafta süre ile vitamin E'den fakir yem ile beslenen tavşanlara kolesterol ve vitamin E verilmesinin serum kolesterol düzeyine etkisi .....	37
Tablo 6.2. Sekiz hafta süre ile vitamin E'den fakir yem ile beslenen tavşanlara kolesterol ve vitamin E verilmesinin serum vitamin E düzeyine etkisi .....	38

# **Yüksek Kolesterol Diyeti ile Oluşturulan Ateroskleroz Modelinde Endoplazmik Retikulum Stres ve Nükleer Faktör-Eritroid 2 İlişkili Faktör 2 Yolağının Rolü**

**ÖğrencininAdı:** Perinur Bozaykut

**Danışmanı:** Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer

**Anabilim Dalı:** Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

## **1.ÖZET**

**Amaç:** Hiperkolesterolemi, ateroskleroz gelişiminde ana risk faktörü olmakla beraber moleküler mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu nedenle, bu çalışmamızdaki amacımız, yüksek kolesterol diyeti ile oluşturulan ateroskleroz modelinde, oksidatif ve endoplazmik retikulum (ER) stres ile aktive olan hücresel savunma mekanizmalarını incelemek ve vitamin E' nin bu mekanizmalar üzerindeki olası koruyucu etkilerini araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda, 2-4 aylık 24 adet erkek albino tavşan 4 gruba ayrıldı: 1) Vitamin E' den fakir yem ile beslendi. 2) Vitamin E' den fakir yem ile beslendi ve vitamin E i.m. olarak 50 mg/kg/gün uygulandı. 3) % 2 kolesterol içeren vitamin E' den fakir yem ile beslendi. 4) % 2 kolesterol içeren vitamin E' den fakir yem beslendi ve vitamin E i.m. olarak 50 mg/kg/gün uygulandı. Sekiz hafta sonunda, torasik aortalar ışık mikroskobu ile incelendi. Aorta dokusunda fosfo IRE-1, fosfo PERK, Grp94, Grp78, Nrf2, GSTα ve NOX4 protein düzeyleri immunblotlama tekniği ile ve proteazom aktivitesi fluometrik yöntem ile incelendi.

**Bulgular:** Kolesterol ile beslenen tavşanların aorta dokusunda aterosklerotik lezyonlar geliştirirken, vitamin E verilen tavşanlarda lipit birikiminin ve köpük hücre oluşumunun azaldığı gözlemlendi. Aorta dokusunda fosfo IRE-1, fosfo PERK, Grp94, Grp78, Nrf2 ve NOX4 protein ekspresyonlarının kolesterol grubunda kontrollere göre arttığı bulundu. Kolesterol grubunda azalma görülen GSTα ekspresyonu ve proteazomal aktivasyonun ise kolesterol+vitamin E grubunda arttığı bulundu.

**Sonuçlar:** Çalışmamız, kolesterolden zengin diyetin ateroskleroz gelişimine oksidatif ve ER stres ilişkili yollar ile sebep olabileceğini ve vitamin E' nin bu mekanizmalar üzerinden koruma etkisi olabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hiperkolesterolemi, oksidatif stres, ER stres, Nrf2, proteazom

## **The Role of Endoplasmic Reticulum Stress and Nuclear Factor-Erityroid 2 Related Factor in High-Cholesterol Diet Induced Atherosclerosis**

**Name of the Student:** Perinur Bozaykut

**Supervisor:** Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer

**Deparment:** Medical Biochemistry

### **2. SUMMARY**

**Aim:** Hypercholesterolemia is the major risk factor for the development of atherosclerosis although the mechanism of action still remains unclear. Therefore, in the present study, our aim was to investigate cellular defenses activated by oxidative and endoplasmic reticulum stres (ER) on cholesterol diet induced atherosclerosis, and to determine the effects of vitamin E on the related mechanisms, *in vivo*.

**Methods:** Twenty-four male albino rabbits were assigned randomly to four groups fed: 1) vitamin E deficient diet, 2) vitamin E deficient diet with daily intramuscular injections of vitamin E (50 mg/kg), 3) vitamin E deficient diet containing 2% cholesterol and 4) vitamin E deficient diet containing 2% cholesterol with daily intramuscular injections of vitamin E (50 mg/kg). After eight weeks, thoracic aortae were examined by light microscopy. The consequences of hypercholestrolemic diet and vitamin E effect were further examined determining phospho PERK, phospho IRE-1, Grp94, Grp78, Nrf2, GST $\alpha$  and NOX4 protein levels by immunoblotting and the proteasomal activity by fluorometric detection method in aortic tissues.

**Results:** Cholesterol fed rabbits exhibited atherosclerotic lesions and endothelial damage compared to control rabbits wheras lipid accumulation and foam cell formation was detectable in animals fed cholesterol and treated with vitamin E. Phospho IRE-1, phospho PERK, Grp94, Grp78, Nrf2 and NOX4 expressions were increased by the cholesterol-rich diet. Whereas, vitamin E resulted in elevated GST $\alpha$  expression in aortae. Notably, the proteasomal activity which was impaired in cholesterol fed group was increased by vitamin E.

**Conclusion:** Our result demonstrated that cholesterol-rich diet accounts for the development of atherosclerosis via oxidative and ER stress related factors and vitamin E treatment affords protection via these factors.

**Keywords:** Hypercholesterolemia, ER stress, oxidative stres, Nrf2, proteasome

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Ateroskleroz, arterlerin lümen çapının aşamalı olarak daralması sonucunda ortaya çıkan ve beraberinde miyokardial ve serebral enfaktüs gibi iskemik hastalıklar ile yüksek oranda ölüme yol açan kronik inflamatuvar bir hastalıktır (Zhang ve Wahl, 2006). Bunun yanında, kardiyovasküler hastalıklar için birçok risk faktörü arasından hiperkolesterolemi, en önemli risk faktörlerinden biri olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalar, artmış okside LDL (OxLDL) oluşumunun reaktif oksijen türleri ve dolayısıyla oksidatif stres oluşumunu indüklediğini göstermektedir (Carmeli ve ark., 2008).

Makrofaj ve lenfositler aracılığıyla oluşan kronik inflamasyon, dokuda meydana gelen hasarın sonucu olarak gelişir. Endoplazmik retikulum (ER) stres cevabının da bu süreçte önemli rolü vardır. ER stres sensörleri “Inositol-requiring enzyme-1” (IRE-1), “Activating transcription factor 6” (ATF6) ve “Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase” (PERK) endoplazmik retikulum zarında bulunur. Oksidatif stres veya hipoksi gibi koşullarda ER’ un fonksiyonu bozulur ve yanlış katlanmış veya katlanmamış proteinler ER’ da birikir. Bu koşullar altında Grp78 (BiP) proteini, PERK, ATF6 ve IRE-1 proteinlerinden ayrılarak aktivasyonlarına ve katlanmamış protein cevabına yol açar (Parmar ve Schroder, 2012). PERK, ATF6 ve IRE-1’den her biri farklı mekanizmalar üzerinden farklı transkripsiyon faktörlerini ve sinyal iletim mekanizmalarını indükler (Ron ve Walter, 2007).

Nükleer faktör-eritroid 2 ilişkili faktör-2 (Nrf2) redoksa karşı duyarlı bir transkripsiyon faktörüdür ve faz II antioksidan enzimlerin veya stress yanıtları ile ilişkili proteinlerin aktivasyonunda rol oynar (Lee ve Johnson 2004). Birçok çalışma, Nrf2 yüksek ekspresyonunun, glutatyon S-transferaz (GST), hem oksijenaz-1 (HO-1) gibi ARE bağımlı antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırdığını göstererek, Nrf2’ nin inflamasyon hastalıklarındaki korucuyu rolünü göstermiştir (Chen ve ark., 2006). Nrf2’ nin, PERK fosforilasyonu ile aktive olması, ER stres ile de aktive olabildiğini göstermektedir. Nrf2 eksikliğinin, hücreleri ER strese karşı daha hassaslaştırması, Nrf2 aktivasyonunun hücre yaşamı için kritik olduğu göstermektedir. Bu bulgular ER stresin, protein katlanma kapasitesini artırmanın yanında, Nrf2 aktivasyonu ile redoks homeostazisini ve potansiyel olarak proteazom gen ekspresyonu ile de okside olmuş proteinlerin yıkılmasını sağlayarak hücreyi

stresden koruduğunu göstermektedir (Chapple ve ark., 2013). 26S proteazom, sitoplazma, çekirdek ve ER lümenindeki anormal proteinlerin degradasyondan sorumludur (Poppek ve Grune, 2006). Bunun yanında, Nrf2 ve protezom arasında çapraz ilişki bulunmaktadır. 26S proteazom bazal koşullarda Nrf2 degradasyonunu sağlayarak Nrf2 seviyesinin düşük kalmasını sağlamakla beraber, stres koşullarında Nrf2 proteazomal gen ekspresyonunu artırır (Chapple ve ark., 2012).

NADPH oksidaz (NOX) enzimleri, elektronların moleküler oksijene transferinin kataliz ederek oksijenden, hidrojen peroksit veya süperoksit radikali oluşumu katalizleyen enzimlerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, NOX' ların, lezyonlarda makrofaj tutulmasında önemli rolü olduğunu vurgulamıştır. Nrf2 knock-out hücrelerde Nrf2-Keap1 yolağının ROT üretiminin NADPH oksidazlar yolu ile düzenlediğini göstermiştir (Kovac ve ark., 2015). Bunun yanında, fare kalplerinde NOX4 ekspresyon artışı ile Nrf2 yolağının aktive olduğu gösterilmiştir (Brewer ve ark., 2011).

Çeşitli çalışmalarda, vitamin E'nin koroner kalp hastalıkları, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar ve çeşitli kanser tiplerinin gelişimindeki koruyucu etkisi gösterilmiştir (Mardones ve Rigotti, 2004; Reiter ve ark., 2007). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, vitamin E'nin hücrel sinyal iletim yollarında ve çeşitli genlerin ekspresyonları üzerinde antioksidan özelliğinden bağımsız etkileri tanımlanmıştır (Azzi ve Stocker, 2000). Vitamin E'nin ateroskleroz gelişimindeki koruyucu etkisi tavşan modeli çalışmalarımızda da gösterilmiştir. Sonuçlarımız, hiperkolesterolemik tavşanlarda CD36 mRNA ekspresyonunun arttığını ve vitamin E' nin bu artışı baskıladığını göstermektedir (Ozer ve ark., 2006). Bu konuda yaptığımız diğer çalışmalar ile vitamin E'nin oksidatif stres ve lipit birikimi ile ilgili sinyal yollarındaki etkisi açıklanmıştır (Bozaykut ve ark., 2014; Sozen ve ark., 2014).

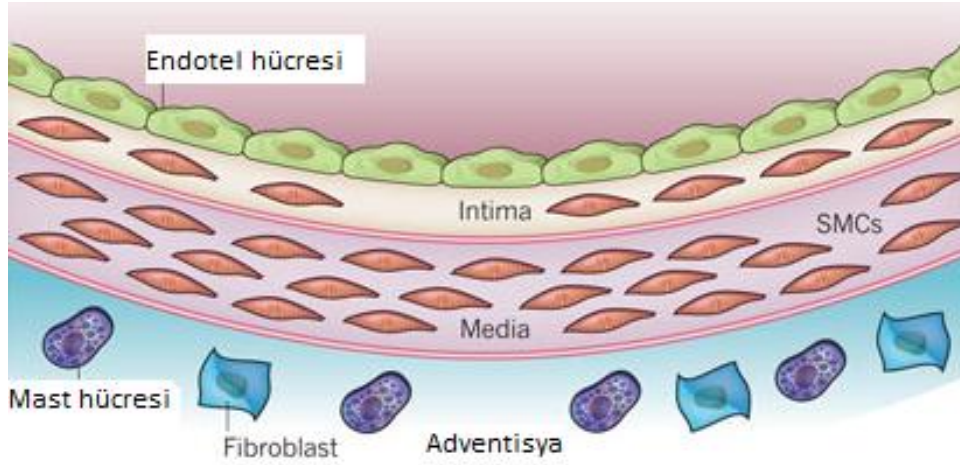
Bu çalışmadaki amacımız, tavşanlarda %2 kolesterol içeren diyet ile indüklenen ateroskleroz modelinde, aorta dokusunda oksidatif stres ve endoplazmik retikulum stresin Nrf2 sinyal yolağı ile ilişkisinin araştırılması ve vitamin E'nin bu mekanizmalar üzerindeki etkisinin incelenmesidir. Bunun için fosfo IRE-1, fosfo PERK, Grp94, Grp78, Nrf2, GST $\alpha$ , NOX4, proteazom alt ünitesi  $\beta$ 5'in protein ekspresyonları ve proteazom aktivitesi ölçüldü. Bunlara ek olarak vitamin E' nin bu ekspresyonlar üzerindeki etkisinin araştırılmasıyla sinyal yolları üzerinde etkisi aydınlatıldı.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Ateroskleroz

#### 4.1.1. Normal bir arterin yapısı

**Tunika İntima:** Tunika intima, 3 tabakalı bir yapı olan arterin en içte bulunan tabakasıdır (Şekil 4.1). İntima, endotel tabakası, tip IV kolajen, laminin, fibronektin ve diğer ekstraselüler matriks molekülleri içeren zemin membranı üzerinde bulunmaktadır. Doğumda çok ince bir yapı olan intima, yaşlanmayla beraber, düz kas hücrelerini içeren daha karmaşık bir yapı haline gelir. İntima yapısı gelişerek ekstraselüler matriks bölümünü oluşturur ve diffuz intimal kalınlığı temsil eder. İntima yapısındaki bazı bölgeler, ateroskleroz yokluğunda bile kalınlaşmaya meyillidir. Bu intimal kalınlaşma, yağ birikimi ile birebir ilişkili olmak zorunda değildir ve ateroma sahip olmayan bireylerde de görülebilir. İçteki elastik membran ise tunika intimaya bağlanarak altındaki tunika media ile arasındaki sınırı oluşturmaktadır (Schwartz ve ark., 1990).



Şekil 4.1. Normal bir arterin yapısı. (Libby ve ark., 2011)

**Tunika Media:** Tunika media tabakası, iç elastik laminanın altında bulunmaktadır ve arter duvarının en geniş tabakasıdır (Şekil 4.1). Farklı miktarlarda elastik ve kollajen fibriller ile proteoglikanlar, bu tabakada bulunan düz kas hücrelerinin arasında bulunurlar. Bunun yanında, düz kas hücreleri ekstraselüler matriksi oluşturur. Media tabakasının içeriği elastik ve muskuler arterler arasında farklılık

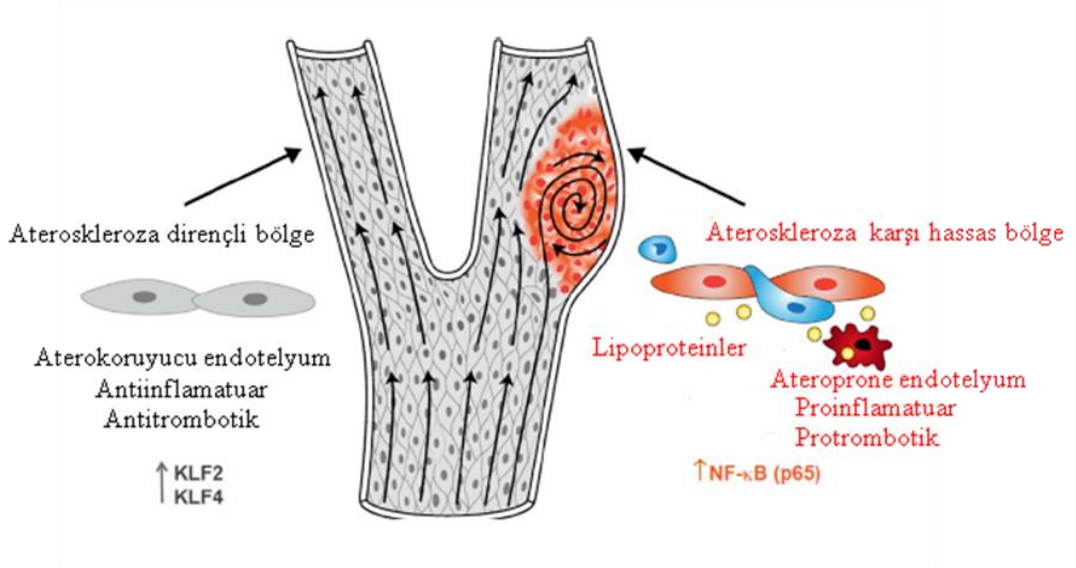
gösterir. Düz kas hücrelerinin normal arterlerdeki çoğalmaları nadir olmakla beraber patolojik koşullarda bu durum değişebilir. Altındaki tabaka olan adventisya tabakasıyla olan sınırı ise eksternal elastik lamina oluşturmaktadır (Schwartz ve ark., 1990).

**Tunika Adventisya:** En dış tabaka olan tunika adventisya kollajen ve elastik fibrillerden oluşmaktadır (Şekil 4.1). Bu tabakanın arter dengesi ve patolojisinde çeşitli rolleri vardır. Tunika adventisya tabakasında bulunan kolajen fibrilleri intimadakine göre daha gevşek bir yapıdadır ve ana içereği düz kaslardır. Bu tabakanın hücre tipleri fibroblast, mast hücreleri, adipositler ve sempatik sinir uçlarını içerir ve bu hücreler diğer arter tabakalarına göre daha seyreklerdir. Vasa vasorum ve sinir uçları bu en dış tabakaya yerleşmişlerdir. Son zamanlardaki hayvan çalışmaları ise, mast hücrelerinin ateroma ve anevrizma oluşumunda rolü olduğunu göstermiştir (Schwartz ve ark., 1990).

#### **4.1.2. Ateroskleroz gelişiminde arter hücrelerinin görevi**

##### **4.1.2.1. Endotel hücreleri**

**Endotel hücrelerinin fonksiyonu, disfonksiyonu ve aterogenez:** Arterin intima bölgesinde bulunan endotel hücreleri, kan ile teması sağlayan yüzeyi oluşturur ve humoral ve mekanik uyarıları karşı topalayıcı ve dönüştürücü olarak görev yapar (Libby ve ark., 2007). Bu aşamada, endotel fenotipinin disfonksiyonel duruma geçişi ateroskleroz gibi çeşitli vasküler hastalıklar için patolojik bir risk faktörü olarak görülmektedir. Ateroskleroz gelişimi, arterlerdeki lezyona hassas bölgelerin etkilenmesi ile oluşur ve bu bölgelerdeki biyomekanik etkilerle endotel disfonksiyonu fenotipi gösteririr. Bu prelezyonel hassas bölgeler ayrıca apoB lipoproteinlerin tutulması ile ayırt edilirken, daha ileri evrelerde bu lipoproteinlerin oksidasyonu endotel disfonksiyonunu ilerletmektedir (Tabas ve ark., 2007). Endotel disfonksiyonu ve apoB lipoproteinlerin tutulması monosit girişini uyarır ve monositlerin makrofaj hücrelerine farklılaşmasına neden olur. Makrofaj hücreleri oksitlenmemiş lipoproteinlerin girişi ile köpük hücrelerine dönüşürken altında fiziksel olarak sağlam ancak işlevsiz endotel hücreleri bulunur.



**Şekil 4.2.** Vasküler endotel hücreleri ve erken ateroskleroz lezyonlarının gelişimi. Erken ateroskleroz evresinde endotel hücreleri proaterosklerotik fenotip göstererek NF-κB sinyal yolağı ile proinflamatuvar yanıtı oluşturur. Endotel hücreleri aterokoruyucu özelliği ise KLF2 ve KLF4 transkripsiyon faktörleri ile sağlanır. (Tabas ve ark., 2015)

**Ateroskleroza dirençli veya hassas özellikte endotelium:** Ateroskleroza dirençli bölgelerdeki endotel hücreleri, ellipsoidal hücre ve nükleer morfoloji gösterirken ateroskleroza duyarlı bölgeler bu şekilde düzenli değildir ve hücreler kübik bir morfolojisi gösterir. Ayrıca, ateroskleroza dirençli bölgelerde endotel üzerinde kalın bir glikokaliks katmanı oluşur (Koo ve ark., 2013). Her ne kadar glikokaliks katmanının ateroskleroz açısından fonksiyonel önemi bilinmiyorsa da, bazı çalışmalar sağlam bir glikokaliks katmanının LDL'nin subendotel boşluğa geçişini azalttığını önermiştir (van den Berg ve ark., 2009). Ateroskleroza duyarlı bölgelerdeki endotel hücreleri, ayrıca endotel bariyerinde fonksiyon bozukluğu gösterirler (McGill ve ark., 1957) ve ateroskleroza dayanıklı bölgelerdeki hücelere kıyasla daha yüksek oranda hücre döngüsü ve hücre yaşlanma gösterirler (Hansson ve ark., 1985). Bunun yanında kronik ER stres belirteçlerini de ekspres ederler (Civelek ve ark., 2009) ve bu durum ateroskleroz gelişimine endotel apoptozu ile katkı sağlayabilir (Zeng ve ark., 2009).

Moleküler düzeyde, ateroskleroza karşı dirençli ve hassas endotel fenotipleri, farklı gen ekspresyonu ve sinyal yolları ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 4.2). Bu iki endotel fenotipi arasından en önemli fark aktive olan transkripsiyon faktörleridir. Aterokoruyucu endotel, Kruppel benzeri faktör 2 (KLF2) ve Kruppel benzeri faktör 4 (KLF4) aktivasyonu ile ateroskleroza hassas endotel ise Nükleer faktör kappa B

(NFκB) yolağı aktivasyonu ile karakterizedir. Bu iki yolak endotel hücrelerinde antagonistik rol oynarlar (Atkins ve Simon, 2013). KLF2 ve KLF4 ekspresyonu MEK5/ERK5/MEF2 sinyal yolu ile aktive edilir (Villarreal ve ark., 2010). KLF2'nin aterokoruyucu özelliğinin önemi, *in vivo* olarak KLF2 inhibisyonunun %31-37 oranında lezyon alanı artışı ile sonuçlanmasıyla gösterilmiştir (Atkins ve ark., 2008). Endotelyal KLF4' un aterosklerozdaki rolü hakkındaki bilgiler daha kapsamlıdır ve yapılan son çalışmalar ile ateroskleroz gelişiminde koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2012). Endotelyal NF-κB sinyal yolunun erken aterogenezdeki kritik rolü, prelezyonal fare aorta dokusunda, ateroskleroza duyarlı bölgelerdeki aktivasyonu ile gösterilmiştir (Hajra ve ark., 2000). Ateroskleroza karşı hassas bölgelerdeki akış, endotel hücrelerinde NFκB yolunu aktive eder (Won ve ark., 2007) ve VCAM-1 ve Toll-benzeri reseptör 2 gibi proaterojenik hücre yüzey reseptörlerinin ekspresyonunu artırır (Mullick ve ark., 2008).

#### **4.1.2.2. Makrofaj hücreleri**

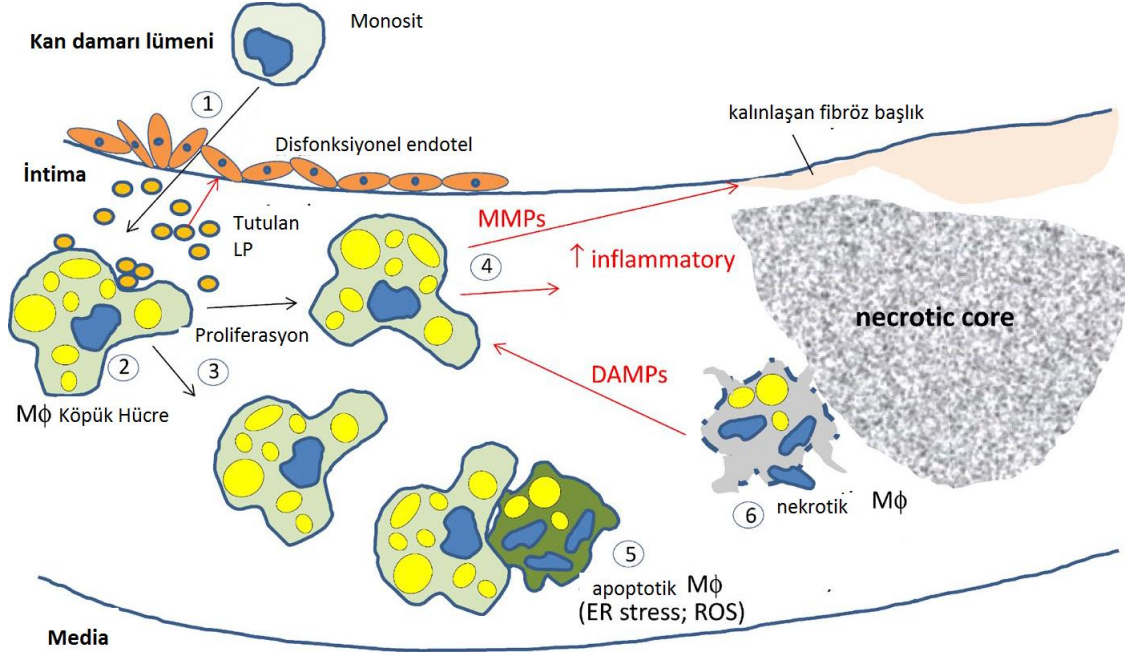
**Makrofaj hücrelerinin kökeni:** Kemokinlerin tetiklediği ve kemik iliğinden türetilen monosit akışı, lezyonlarda ilk olarak lipoprotein tutulması ve endotel hücrelerin aktivasyonu ile tetiklenir. Monosit hücreleri ilk olarak dalakta sentezlenir ve kan dolaşımına geçmeden ve aterosklerotik lezyonlarda konumlanmadan önce burada ek olarak proliferasyon ve aktivasyon aşamaları geçirir (Dutta ve ark., 2012). Yakın zamana kadar, her lezyonel makrofajın tek bir monosit köken aldığı ve bu yüzden aterosklerotik lezyonların proliferasyon geçirdiği düşünülüyordu. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, ileri lezyonlarda makrofaj proliferasyonunun, makrofaj birikimi için önemli bir basamak olduğunu göstermiştir (Robbins ve ark., 2013). Daha önce yapılan *in vitro* çalışmalar, makrofajdaki tip A çöpçü reseptörlerin aktivasyonunun fosfatidilinositol-3-kinaz yolu ile makrofaj proliferasyonunu sağladığını göstermiştir (Sakai ve ark., 2000) ancak bu mekanizma *in vivo* olarak gösterilmemiştir.

**Makrofajların proaterosklerotik rolleri:** Monosit türevli makrofajlar, aterojenik sürecin en önemli oyuncularıdır (şekil 4.3). Kemik iliğinden türetilen hematopoetik kök hücrelerin proliferasyonu ve kolesterol birikimi gibi olaylara sebep olur. Bu durum dolaşımdaki monositlerin artırır ve aterogenez oluşumu ile sonuçlanır (Murphy ve ark., 2014). İnsanlarda kan monosit sayısı ve vasküler hastalıklar arasında bir ilişki bulunmaktadır. Lezyonel makrofajlar, tutulan lipoproteinleri

subendotel bölgeye geçirir. Bu lipoproteinler doğal formunda olabilir ya da oksidasyon, agregasyon gibi modifikasyonlara uğrayabilir. *In vitro* çalışmalar, lipoproteinlerin internalizasyonunun agregat olmuş liproteinlerin fagositozu, çöpçü reseptörler aracılığı ile okside lipoproteinlerin alınması ve natif lipoproteinlerin pinositoz olaylarının birleşimi ile olabileceğini göstermiştir (Haka ve ark., 2009).

Lezyonel makrofajlardaki inflamatuvar sürecin aktivasyonu, proaterojenik süreçte kritik bir önem arz eder. Özellikle M1 benzeri fenotipindeki makrofajların bazı alt grupları, endoteliumu aktive eder ve daha fazla monosit alımına yol açar (Peled ve Fisher, 2014). Makrofaj aktivasyonunun mekanizması tamamen açıklanamamışsa da lipoprotein modifikasyonu gibi olayların Toll-benzeri reseptörleri gibi inflamatuvar sinyal yollarında rolü olan reseptörleri aktive ettiği bilinmektedir. Ayrıca, lipoprotein kolesterolü plazma membranında birikebilir ve burada inflamatuvar reseptör sinyalini membran özelliklerini değiştirerek artırır (Fessler ve Parks 2011; Westerterp ve ark., 2014). Modifiye olmuş lipoproteinler, oksisteroller ve diğer lezyonel faktörler ile indüklenen oksidatif stresi ayrıca diğer inflamatuvar yolları etkinleştirir (Glass ve Witztum, 2001). Örneğin, mitokondriyal oksidatif stres, insan ve hayvan aterosklerozunda tetiklenir ve kültüre edilmiş makrofajlarda okside lipoprotein ve steroller ile tetiklenmiştir. Mitokondriyal oksidatif stres NFκB aktivasyonunu artırır ve sonuç olarak monosit kemokini MCP-1 ve diğer monositlerin alımını indükler (Wang ve ark., 2014).

Lezyonel makrofajların proaterojenik etkisi inflamatuvar ve koruyucu yanıtlar arasındaki hassas denge ile oluşur (Tabas, 2010). Buna örnek olarak, yüksek plazma membran kolesterolünün proinflamatuvar etkisi ile ABCA taşıyıcılarının kolesterol çıkışını sağlamasıyla, dengelenmesi verilebilir. Bunun yanında makrofajlar da liver-X reseptör aracılı antiinflamatuvar yanıtın oluşmasına aracılık ederler (Spann ve ark., 2012). Bunun yanında, inflamatuvar süreçler bazı baskılayıcı faktörleri de tetikleyebilir. Örneğin, NFκB yolu makrofajlarda genetik olarak bloklandığında, IL-10 cevabı da inhibe edildiği için erken lezyon oluşumunun hızlandığı görülmüştür (Kanters ve ark., 2003). Bu yüzden aterosklerozu sadece tek bir inflamatuvar yolağını inhibe ederek engellemenin mümkün olmadığı düşünülmektedir. (Tabas ve Glass, 2013).



**Şekil 4.3.** Lezyonel makrofajların proaterojenik rolleri. Makrofaj hücrelerinin ateroskleroz gelişimindeki rolleri: monositlerin girişi, köpük hücre oluşumu, proliferasyon, MMP aktivasyonu, apoptotik makrofaj gelişimi ve son olarak nekrotik makrofaj gelişimi şeklinde basamaklandırılmıştır. (Tabas ve ark., 2015)

#### 4.1.2.3. Düz Kas Hücreleri

**Düz kas hücrelerinin aterosklerozdaki yeri:** Normal bir arter duvarındaki ikinci ana hücre tipi olan düz kas hücrelerinin normal vasküler dengede ve arter hastalıkların patogenizinde birçok önemli görevi bulunmaktadır. Bu hücreler, kasılma ve gevşemeyi sağlayarak kan akışını kontrol ederler. Bunun yanında, büyük aterosklerotik arterlerde, anormal düz kas kasılması, kan akışını bozan bir ateroskleroz komplikasyonu olan vasospazma neden olabilmektedir. Düz kas hücreleri, normal vasküler homeostazında olduğu gibi aterosklerotik lezyonların oluşumu ve gelişimde kilit bir rol oynayan ekstraselüler matriksi sentezlemektedir. Bu hücreler göç ederek ve proliferasyonla aterosklerozun intimal hiperplastik lezyon oluşumuna katkı sağlarlar. Düz kas ölümü, ateromatöz plak dengesinin bozulmasına neden olabilir (Tabas ve ark., 2015).

Gelişen ateroskleroz lezyonlardaki lipoprotein birikimi, endotel aktivasyonu ve inflammatuar yanıtlar düz kas hücrelerinin aktivasyonu ve fenotip değişimi ile sonuçlanır. Bu süreç boyunca, kontraktıl düz kas hücreleri farklılaşma için belirteç olan genleri baskılar. Bunun bir sonucu olarak, düz kas hücreleri proliferasyon ve

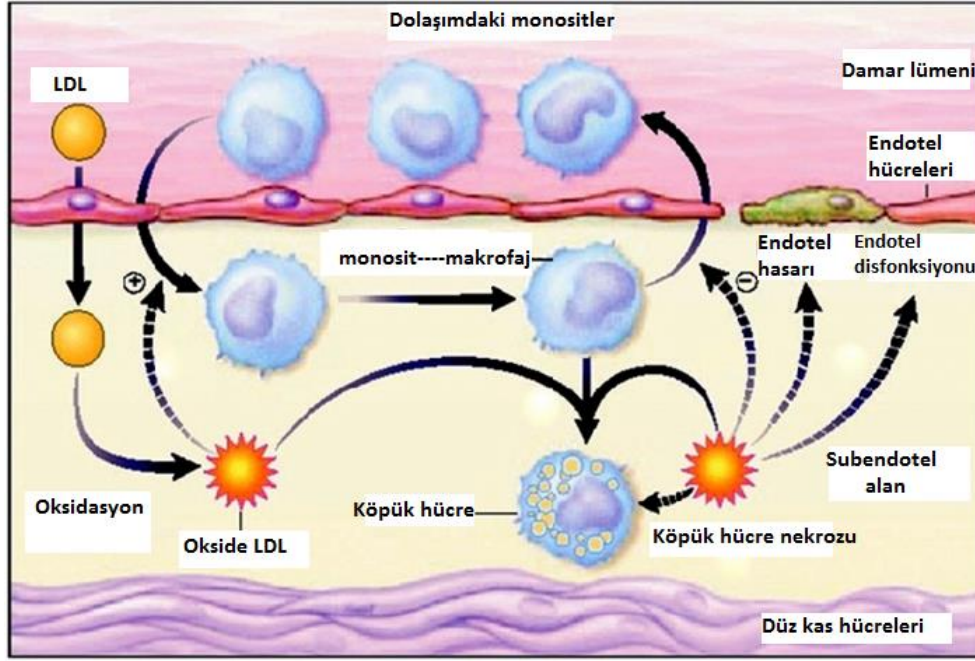
göç ederler ve ekstraselüler matriks üretimi gibi plak stabilizasyonuna sebep olan proteinleri arttırlar (Alexander ve Owens, 2012).

Yapılan son çalışmalar, lezyonel hücrelerin kökeninin ve fenotipik özelliklerinin lezyonel oluşumunun patogenezinde önemli olduğunu göstermiştir. Örneğin, insan koroner arter lezyonlarındaki köpük hücrelerin %50' sinin düz kas hücrelerini eksprese ettiği gösterilmiştir (Allahverdian ve ark., 2014). Bunun yanında bu hücreler ayrıca makrofaj belirteci olan CD68' i de eksprese etmektedirler ve bu hücrelerin kökeni belirsizdir. En önemlisi, düz kas hücresi içeren köpük hücrelerinde, kolesterolü dışarı atan ABCA1 düzeylerinin, düz kas hücresi içermeyen ve CD68 içeren hücrelere göre azalması, ters kolesterol taşınımı açısından da düz kas hücrelerinin önemini göstermektedir. Bu görüşe paralel olarak, son zamanlarda yapılan bir çalışma, kültüre edilmiş düz kas hücrelerinin kolesterol ile yüklenmesinin düz kas hücre belirteçlerinde azalma olduğunu ve bazı makrofaj belirteçlerini eksprese ettiğini ve bozulan makrofaj fonksiyonunu göstermiştir (Vengrenyuk ve ark., 2015).

#### **4.1.3. Aterosklerozun patogenezi**

Aterogenez süreci, aterojenik diyetin içerdiği kolesterol ve doymuş yağlarla oluşan lipoproteinlerin intimada birikmesi ile başlar (Şekil 4.4). Bu lipoprotein partikülleri, arterin intima tabakasında bulunan proteoglikanları çevreler ve agregatlar oluşumuna neden olurlar (Kruthet ve ark., 2002). İntima tabakasındaki proteoglikanlar, lipoproteinlerce bağlanır ve burada tutulur. Bu durum, oksidatif veya diğer kimyasal modifikasyonlara karşı eğilimi artırır ve erken ateroskleroz patogenezinde rolü önemlidir (Williams ve Tabas, 2005).

Lökositlerin alımı ve birikimi, erken lezyon oluşumunda aterogenezin başka bir karakteristik özelliğidir (Cybulsky ve ark., 2004). Normal endotel hücreleri, lökositlerle olan adesiv etkileşimlere karşı dirençli iken aterosklerozun erken safhalarında, lökositler endotelyuma yapışır. Endotel hücre yüzeyinde bazı lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonu, monosit ve T-lenfositlerin endotelyuma yapışmasına neden olur. Selektinler ise lökosit adezyon moleküllerinin başka bir kategorisini oluşturur. P-selektin, endotel hücrelerinde eksprese edildiği için lökosit alımındaki rolü önemlidir ve selektinler, lökositlerin endotel üzerindeki yerini değişmesine sebep olurlar. İmmunglobin ailesi üyesi olan adezyon molekülleri ise lökosit immobilizasyonuna neden olurlar. (Cybulsky ve ark., 2004).



Şekil 4.4. Aterosklerotik plağın gelişimi. (Stocker ve Keaney, 2004)

Endotele bağlanan lökositler, sinyal aldıkları zaman endotel hücreleri içine penetre olur ve arter damarına girerler. Lökositlerin doğrudan göçleri, kemoatraktan veya kemokinler gibi proteinlerin aracılığı ile gerçekleşir. Erken ateromada, 2 grup kemokin etki göstermektedir. Bunlardan birincisi okside lipoproteinlere yanıt olarak endotelyumda üretilen monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) monositlerin doğrudan göçünü veya kemotaksisi sağlar. İnsan aterosklerotik lezyonlarında, normal damarlara göre MCP-1 seviyelerinin yükseldiği görülmüştür. Bu durum, *in vivo* aterogenez boyunca bazı kemokinlerin monosit alınmasına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Tacke ve ark., 2007). Diğer kemoatraktan sitokinler ise lenfosit birikiminde rol almaktadır. Ateromatöz plaklarda bulunan bir sitokin olan gamma interferon ise T-hücre genlerinin tetiklenmesini sağlar (Libby, 2002).

Monositler, arter intimasına girince lipitleri hücre içine alır ve köpük hücreye dönüşür. LDL reseptörü kolesterol ile sıkı bir şekilde düzenlenir ve köpük hücre oluşumuna neden olmaz. Ancak çöpçü reseptör olarak bilinen moleküller aşırı düzeyde lipit alımına ve köpük hücre oluşumuna neden olurlar (Miller ve ark., 2003, van Berkel ve ark., 2005). Bu moleküller modifiye olmuş lipoproteinleri bağlayarak, hücre içine alınmalarında rol oynarlar. Çöpçü reseptörü olan CD36, LDL'nin okside formlarını bağlarken belirgin bir seçicilik gösterir. Makrofajlar bir kere intimaya girip köpük hücreye dönüşünce, çoğalırlar. Aterosklerotik plaklarda, "macrophage-colony stimulating factor" (M-CSF), makrofajların hücre bölünmesini başlatır.

Ateroma oluşumunun başlangıcı, farklılaşan endotel fonksiyonunu ve lökosit birikimini içerirken, ateroma gelişimi düz kas hücreleri de içeren daha karmaşık bir süreçtir (Mulvihill ve ark., 2004; Manabe ve Nagai, 2003). Ateroma oluşturan bu düz kas hücreleri, medianın altından intimaya göç eden hücrelerden oluşmaktadır. Aterosklerotik intimada bulunan düz kas hücreleri, normal arterin media tabakasında bulunan düz kas hücrelerine göre daha hassas bir fenotip göstermektedir (Manabe ve Nagai, 2003). Normal bir insan ateromasında düz kas hücresi bölünmesi nadir bir durum olsa da, ateromatöz plak sürecince düz kas hücresi bölünmesi artmaktadır. Düz kas hücreleri bölünmesinin yanında, bu hücrelerin ölümü de aterosklerotik plak komplikasyona neden olur. Bazı düz kas hücreleri programlı apoptoza giderek gelişmiş ateroma oluşumuna katkıda bulunur (Geng ve Libby, 2002; Littlewood ve Bennett, 2003).

Aterosklerotik plaklarda ekstraselüler matriks, diğer hücrelere kıyasla ileri aterosklerotik plağın büyük bir kısmını oluşturur. Ateromada biriken ana ekstraselüler matriks makromolekülleri, kolajenleri (Tip I ve III) ve bazı proteoglikanlardır (Wight ve Merrilees, 2004). Bunlara ek olarak elastin fiberleri de plaklarda birikmektedir. Vasküler düz kas hücreleri, bu matriks moleküllerini normal arterin durumdaki gibi üretirler. Düz kas hücreleri, aşırı kollajen üretimi için gerekli olan uyarıyı, PDGF ve TGF- $\beta$ ' dan alarak, T-hücreleri gibi lezyonda bulunan birçok hücre tipini üretir. Düz kas hücre birikiminde olduğu gibi, ekstraselüler matriks salgısı da bir dengeye sahiptir. Bu durumda ekstraselüler matriks molekülleri, matriks metalloproteinazlar (MMPs) denilen katabolik enzimlerle yıkılarak dengeleri sağlanır. Düz kas hücreleri, mediadan intimaya yoğun bir ekstraselüler matriksle penetre olduğu için, ekstraselüler matriksin çözünmesi düz kas hücre göçünde de rol oynar.

Plak gelişiminin son aşamasında kalsifikasyon bölgeleri oluşur. Son yıllarda, mineralizasyon mekanizması düz kas hücrelerinin TGF- $\beta$  gibi sitokinlerin sekresyonunu artırarak kalsifikasyona neden olduğu şeklinde açıklanmıştır (Doherty, ve ark., 2003). Ateromatöz plaklar ayrıca kalsiyumu parçalayan gama karboksilennemiş glutamik asit kalıntıları içerdiği için plaklarda mineralizasyon oluşmaktadır.

## 4.2. Endoplazmik Retikulum (ER) Stres

### 4.2.1. ER stres faktörleri ve moleküler mekanizması

Ökoryatik hücrelerde, endoplazmik retikulum (ER), salgılama yolağındaki ilk organeldir. Bu yüzden, ER proteinler diğer salgı organlarına geçişinden önce protein sentezi ve modifikasyonlarında görev yapar. Bu süreç sıkı bir şekilde düzenlenir ve şaperonlar, sinyal molekülleri ve homeostazi sağlayan yıkım mekanizmaları görev yapar (Schroder ve Kaufman, 2005). ER’ da protein katlanması veya modifikasyonunda bir bozulma meydana gelmesi ile stres koşulları oluşur ve hücre buna karşı yanıtı oluşturur. ER stres yanıtının oluşturulmasında başarısızlık olması durumunda ise hücre ölümü gerçekleşebilir.

ER stres yanıtında bazı sinyal yolları görev alır. Bunlar “Unfolded Protein Response” (UPR) ve “Endoplasmic reticulum associated protein degradation” (ERAD)’ dır (Schroder ve Kaufman, 2005). ERAD yolağı, ER stres koşullarında protein yıkımını düzenlerken, UPR modifiye olmuş genlerin transkripsiyonunu ve protein translasyon programlarının koordinasyonunda rol alır (Schroder ve Kaufman, 2005).

ER’ deki protein sentezi ve modifikasyonunun sıkı düzenlenmesinin önemi, bazı patolojik koşullar altında ER stres yollarında bozukluk olmasıyla belirgindir. Proteinlerin yanlış katlanması kistik fibrozis (Lukacs ve ark., 1994),  $\alpha$ -1antitripsin hastalığı (Carlson ve ark., 1989), hiperkolesterolemi (Tolleshaug ve ark., 1983) ve bazı nörolojik hastalıklara (Paschen, 2003) yol açabilir. ER’ de bulunan bazı proteinlerdeki bozukluklar, Diabetes mellitus (Ozcan ve ark., 2004) ve bipolar bozukluk (Kakiuchi ve ark., 2003) gibi hastalıklara yol açabilir. Son zamanlarda, UPR yolağının ayrıca tümör başlangıcı ve gelişimde rol oynadığı açığa çıkmıştır (Romero-Ramirez ve ark., 2004).

ER homeostazi üç ana proteinin kontrolü altındadır. Bunlar; “inositol requiring enzim 1” (IRE-1), “double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase” (PERK) ve “activating transcription factor 6” (ATF6)’ dir (Şekil 4.5). Bu proteinler, ER stres yanıtında protein katlanmasının kapasitesinin artırılması, aktive olan UPR üzerinden tetiklenir (Zhang ve Kaufman, 2006). Bu proteinler, inaktif durumda, ER-bağımlı şaperon olan BiP/GRP78’ ye bağlı dururlar ve stres koşulları altında BiP’den ayrılarak aktive olurlar (Ma ve ark., 2002). BiP bir şaperon olarak, doğal proteinlerin ER içinde doğru katlanmalarını sağlar. UPR sinyal yolağının indüklenmesinin

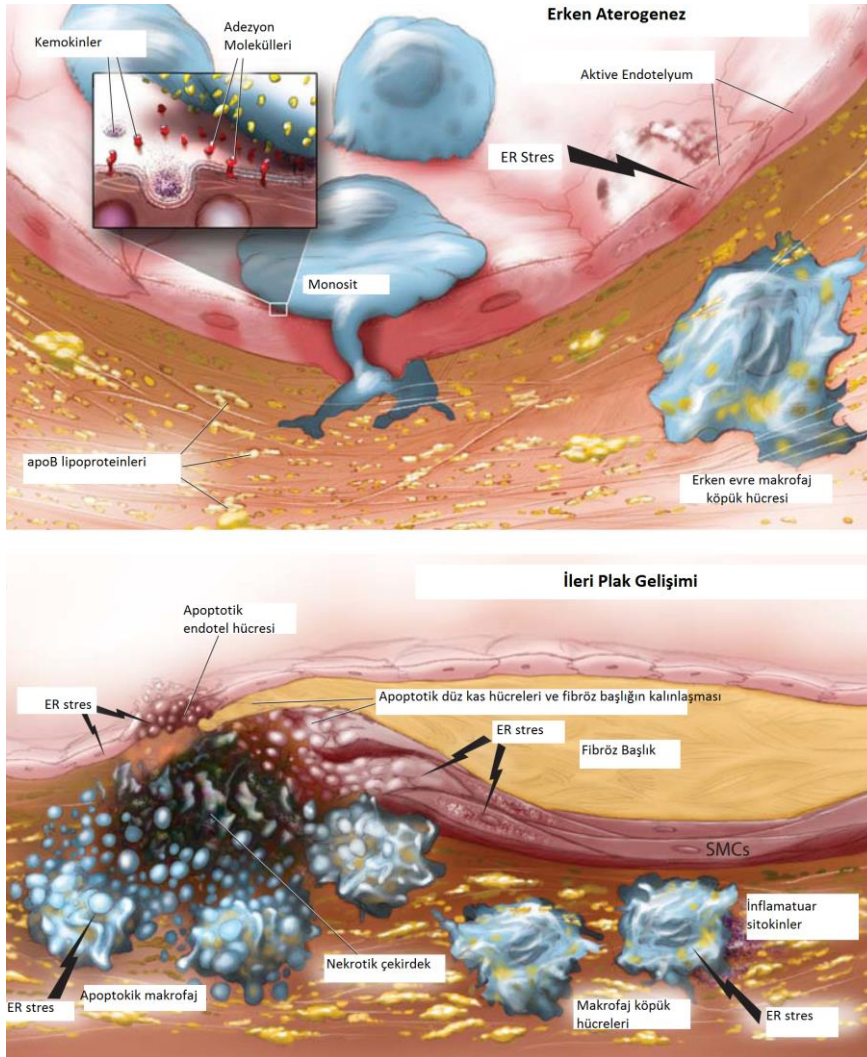


#### 4.2.2. ER stresin ateroskleroz ile ilişkisi

Son yıllarda ER stresin ateroskleroz oluşumunda rol olan arterial ve sistemik faktörler ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Kaufman, 2002; Ron, 2002). ER stresi, geçici ve uzun süreli streslerde özellikle protein sentezi, kalsiyum düzenlenmesi ve hücre içi redoks potansiyeli ile ilişkili fonksiyonlara karşı yanıtta rol alır. UPR olarak da adlandırılan ER stres sinyali IRE-1, ATF6 ve PERK proteinleri ile başlatılır. IRE-1, XBP-1 ve ATF6 ekspresyonlarını düzenleyerek şaperon üretiminde önemli rol oynar ve böylece proteinlerin doğru katlanması ile fizyolojik ve patofizyolojik süreç arasındaki denge kurulur. XBP-1 yoluyla yanıt katlanmış proteinler degradasyonunu sağlar. Başka bir IRE-1 yolu ise apoptoza ve mRNA yıkımına yol açar (Han ve ark., 2009). PERK, eIF2 $\alpha$  fosforilasyonu ile protein translasyonunu azaltır ve böylece translasyonaki hatalar düzeltilir. PERK, ayrıca ATF4 upregulasyonu ve C/EBP homologo protein (CHOP) indüksiyonu ile geçici ER stres sırasında çeşitli fonksiyonların düzeltilmesini sağlar (Zinszner ve ark., 1998).

ER stresi, hem sistemik aterosklerotik risk faktörleri hem de hücre biyolojik süreçleri açısından farklı etkiler gösterebilmektedir (Şekil 4.6). Geçici ER stresi, UPR yolunun aktivasyonu ile hücre için faydalı etkiler gösterir. Ancak bu faydaları etkilerden farklı olarak kronik ER stres, patolojik olarak organ disfonksiyonu ve hastalıklara sebep olabilir (Kaufman, 2002). Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar, uzamış ER stresin arter duvarındaki makrofaj oluşumunda sorumlu olduğunu ve ileri lezyonlarda endotel hücre apoptozuna neden olabileceğini göstermiştir (Şekil 4.6). Buna ek olarak, bu hücrelerdeki ER stres aracılı proinflamatuvar etkiler erken aterogenezi etkileyebilir (Tabas ve ark., 2015). Süregelen ER strese maruziyet hücrede kalıcı ER disfonksiyonuna sebep olur. Ateroskleroz durumunda, kronik ER stresi hepatik lipit metabolizması ve pankreatik beta hücre fonksiyonu, obezite durumu, insülin direnci ve diyabet gibi sistemik risk faktörlerinin oluşumu etkilemektedir (McAlpine ve ark., 2010; Hotamisligil, 2010). Ateroskleroz sürecinde ER stres, özellikle makrofajlar ve endotel hücreleri olmak üzere plak hücrelerini etkilemektedir. Bu aşamada, ER stres yanıtının özellikle apoptoz ile sonuçlanması patolojik hücre ölümünü başlatır. IRE-1' in kronik aktivasyonu, ASK1 ve JNK aktivasyonu ile Bcl aktvitesine sebep olarak apoptoz oluşumunu sağlar. CHOP'un kalıcı aktivasyonu ise apoptozu hücre içi kalsiyum metabolizması etkisi ve Bel proteinlerinin düzenlenmesi ile başlatır (Lin ve ark., 2007). Bu konuda artan çalışmalar, ER stres aracılı apoptozun özellikle makofajlarda, aterosklerotik plak

oluşumunda önemli rol oynadığını kanıtlamıştır. Buna ek olarak, kronik ER stres endotel hücre biyolojisi yoğun bir şekilde etkileyerek aterosklerozda önemli bir rol oynar. ER stres etkileri, endotel hücre fonksiyonunda ve protein ekspresyonlarda meydana gelen değişikliklere sebep olarak, aterogenez sırasında inflamatuvar hücrelerin çekilmesini etkiler. İnsan aortik endotel hücreleri ile yapılan hücre kültürü çalışmaları, UPR aktivatörü tunikamisin uygulanmasının IL-8, IL-6, MCP1 ve kemokin üretiminin arttığını göstermiştir (Gargalovic ve ark., 2006). Bu moleküllerin ekspresyonları ise ATF4 veya XBP1 genlerin susturulmasını ile azalmıştır. Endotel hücrelerindeki UPR aktivasyonu ayrıca ileri aterosklerotik lezyonlarda bulunan okside bir fosfolipit olan, “oxidized 1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-3-glycerophosphorylcholine” (oxPAPC) ile sağlandığını gösterilmiştir (Gargalovic ve ark., 2006).



Şekil 4.6. ER stresin erken aterogenez ve ileri plak gelişimindeki rolü. (Tabas ve ark., 2015)

Yapılan çalışmalar, ER stres altındaki aterosklerotik lezyonlarda ve özellikle CHOP eksprese eden hücrelerde, makrofajların yoğunlukta olduğunu göstermiştir (Zhou ve ark., 2005). CHOP ekspresyonunun lezyon gelişimi sırasında arttığına dair elde edilen bilgiler, insan aterosklerotik lezyonlarından yapılan çalışmalarla onaylanmıştır (Myoishi ve ark., 2007). İnsan koroner arter lezyonları otopside incelenmiş ve lezyonlar UPR belirteçleri açısından incelenmiş ve lezyonlarda, ileri düzeydeki aterosklerotik plaklar ile CHOP ekspresyonu arasında ilişki bulunmuştur.

### **4.3. Nükleer Faktör-eritroid 2 İlişkili Faktör 2 (Nrf2)**

#### **4.3.1. Nrf2 ve savunma mekanizmaları**

Nükleer faktör-eritroid 2 ilişkili faktör 2 (Nrf2-66 kDa), temel lösin fermuar bölgesi içeren bir transkripsiyon faktörüdür (Lee ve Johnson, 2004). Özellikle oksidatif stres koşulları altında etkin olan Nrf2, çekirdekte antioksidan cevap elemanlarına (ARE) bölgesine bağlanarak faz II antioksidan enzimlerin ve stres yanıtları ile ilişkili proteinlerin düzenlenmesini sağlar. Bunlar, sitotoksik elektrofiller veya reaktif oksijen türlerine karşı oluşan hücresel savunmada önemli rolleri olan NAD(P)H:kinon oksidoredüktaz (NQO1), glutatyon S-transferaz (GST), hem oksijenaz-1 (HO-1), glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimleri içerir (Lee ve Johnson, 2004). Bazal koşullar altında, Nrf2 sitoskelet-ilişkili protein olan “Kelch-like ECH-associated protein 1” (Keap1)’e bağlı bir şekilde sitoplazmada inaktif haldedir (Kima ve ark., 2010). Keap1 proteini, Nrf2 übikitinasyonu ve proteazomol yıkımına neden olarak Nrf2’un negatif düzenleyicisi olarak görev yapar (Kobayashi ve ark., 2004). Nrf2, Keap1’den serbestleşince, çekirdeğe yerleşir ve küçükMaf (sMaf) proteini ile heterodimer oluşturur (Kensler ve ark., 2007). Nrf2-sMAF dimeri daha sonra hücre savunma mekanizmasında görev yapan birçok genin aktivasyonunu sağlamak üzere promotör bölgesinde bulunan “ARE” bölgesine bağlanır (Kensler ve ark., 2007). Birçok çalışma, Nrf2 ekspresyonundaki artışın, HO-1, GPx ve NQO1 gibi ARE bağımlı antioksidan enzimlerin ekspresyonunu etkilediğini ve Nrf2’ nin inflamasyon hastalıklarındaki korucuyu rolünü göstermiştir (Purdom-Dickinson ve ark., 2007).

Nrf2’ nin, PERK fosforilasyonu ile de aktive olması, Nrf2’ nin ER stres ile aktive olabildiğini göstermektedir. Nrf2 eksikliğinin ise hücreleri ER strese karşı daha hassaslaştırdığını, ER stres aktivatörleri ile sağlanan Nrf2 aktivasyonunun ise hücre yaşamı için kritik bir süreç olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular ER stresin, protein

katlanma kapasitesini artırmanın yanında, Nrf2 aktivasyonu ile de rol oynadığını göstermektedir. ER stres aracılı aktive olan Nrf2, antioksidan ve faz II enzimleri ile redoks homeostazını ve potansiyel olarak 20S proteazom gen ekspresyonu ile de okside olmuş proteinlerin yok edilmesini sağlayan bir süreç ile hücrenin stresten korur. Bütün bu Nrf2 aracılı cevaplar, devam eden ER stresin ve apoptoik sinyal kaskatlarının aktivasyonunu engellemektedir (Chapple ve ark., 2013).

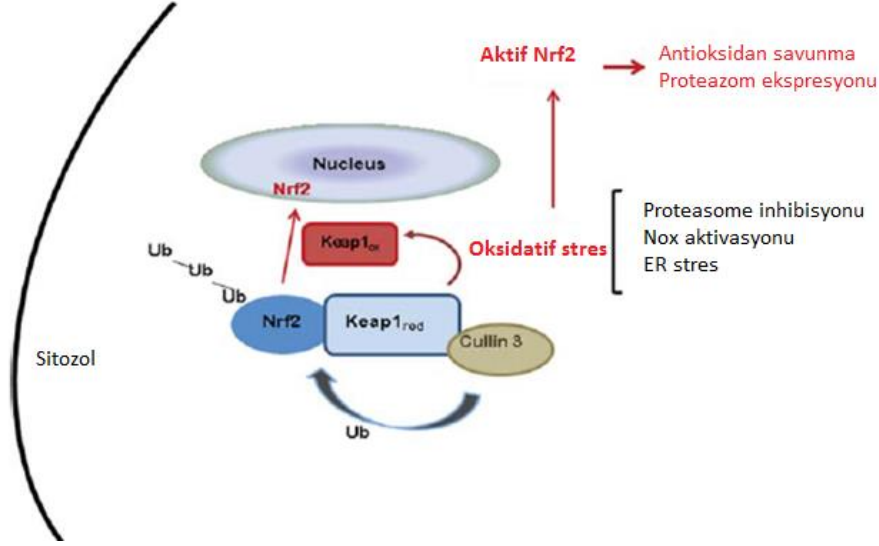
Übikitin-proteazom sistemi protein cevabının bir bileşenidir ve ERAD'a aracılık eder (Xie, 2010). Bunun yanında memeli hücrelerinde, proteazom ekspresyonunun moleküler kontrolü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Fare hücreleri ile yapılan bir çalışma, Nrf2'nin Psmb5 ekspresyonunu düzenlediğini göstermiştir (Kwak ve ark., 2003). Nrf2 ve protezom arasında ayrıca bir çapraz ilişki bulunmaktadır. 26S proteazom bazal koşullarda Nrf2 degradasyonunu sağlayarak Nrf2 seviyesinin düşük kalmasını sağlamakla beraber, stres koşullarında Nrf2 proteazomal gen ekspresyonunu artırır (Chapple ve ark., 2012).

Nrf2' nin başka bir koruyucu etkisi ise matriks metalloproteinazlarla ilişkilendirilmiştir. Nrf2-HO-1 ikilisinin aktivasyonunu sağlayan moleküllerin, makrafajlardaki MMP-9 (Kin et al 2007) ve insan epitelium hücrelerindeki MMP-7 (Lee et al 2007) ekspresyonunu azalttığı bilinmektedir. Grubumuz daha önceki çalışmalarında, yüksek kolesterolü diyet ile 4 hafta süre ile beslenen tavşanlarda, vitamin E injeksiyonu ile yaklaşık 3 kat artan Nrf2 ekspresyonunun MMP-1 ekspresyonunu düzenleyebileceğini göstermiştir (Bozaykut et al, 2014).

#### **4.3.2.Nrf2 ve ER stres ilişkisinin aterosklerozdaki rolü**

UPR mekanizması, çeşitli sinyal yolları ile etkileşerek hücrede ER strese karşı yanıtı oluşturur. Bu yollardan biri olan Nrf2, PERK ile fosforile olarak aktive olur ve antioksidan enzimlerin transkripsiyonunu sağlar. Yapılan çalışmalar, ER stres yanıtında Nrf2 aktivasyonun önemli bir yolu olduğu göstermiştir. Oksidatif stresi indükleyen faktörlere ek olarak ER stres, Nrf2' nin çekirdeğe geçişini PERK-bağımlı bir süreç ile sağlar (şekil 4.7). Bu aktivasyon reaktif oksijen türlerinin (ROT) birikimine veya eIF2 $\alpha$  fosforilasyonuna ihtiyaç duymamaktadır (Cullinan ve ark, 2003). Nrf2' nin oksidatif stres sürecindeki rolü göz önünde alındığı zaman, ER stres yanıtında koruyucu bir görev yapabileceği düşünülmektedir. Nrf2 geni susturulmuş hücreler ile yapılan çalışmalarda, Nrf2' nin UPR sırasında hücre yaşamı için gerekli olduğu, Nrf2' nin overekspresyonun ise hücre yaşamını uzattığı gösterilmiştir

(Cullinan ve ark., 2003). Nrf2 susturulmasının ayrıca ER stres aracılı apoptoza karşı savunmasının düşmesinden ötürü aterosklerozda rol aldığı göstermektedir. Mevcut çalışmalar, ER stres aracılığı ile aktive olan Nrf2' nin hedef genleri aracılığı ile hücrede bir koruma sağladığını öne sürmektedir (Liu ve ark., 2004).



**Şekil 4.7.** Nrf2 aktivasyonu etkileyen faktörler. ER stres, oksidatif stresi etkileyerek Nrf2' nin aktivasyonuna ve çekirdeğe transloke olmasına sebep olur. Aktif Nrf2 proteininin antioksidan savunma ve proteazom ekspresyonu üzerinden ateroskleroz sürecinde rol oynar. (Demasi, 2012)

Nrf2' nin ateroskleroz sürecindeki rolü başka faktörler ile de açıklanır. Yapılan bir çalışma, vasküler düz kas hücrelerinde ER stres koşulları altında HO-1 aktivasyonunun artarak apoptozu inhibe ettiğini ve bunun Nrf2 aracılı olduğunu göstermiştir (Liu ve ark., 2004). Yapılan hücre kültürü çalışmaları, insan aortik düz kas hücrelerinde (HASMC), Nrf2 gen transfeksiyonunun HO-1 ekspresyonunu arttığını ve tavşan aortasında düz kas hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (Levonen et al 2007). NQO1 veya Nrf2 ekspresyonu ise mikrovasküler endotel hücrelerinde, TNF- $\alpha$  tarafından uyarılan VCAM-1 ekspresyonu bloke ettiği gösterilmiştir (Chen, 2003). Nrf2 overekspresyonun ayrıca, tavşan aortalarında oxLDL seviyesini ve makrofaj infiltrasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Levonen et al 2007). Bir başka çalışma ise oxLDL ve 4-hidroksinonenal aldehitinin mürin peritoneal makrofojlarında Nrf2 birikimine neden olarak, HO-1, Prx I ve bunun yanında CD36 gibi strese yanıt veren proteinlerin aktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir (Ishii ve ark., 2004). Bu bilgiler, Nrf2' nin aterogenez oluşumunda CD36 çöpçü reseptörün ekspresyonunu arttırarak proaterojenik rol oynamakla beraber, HO-1 ve NQO1 gibi antioksidan enzimlerin aktivasyonunu sağlamasından ötürü koruyucu rol oynadığını göstermektedir.

#### 4.4. NADPH Oksidaz ve Aterosklerozdaki Etkisi

Potansiyel hücrel ROT kaynakları mitokondri, NADPH oksidaz (NOX) ailesine ait enzimler, disfonksiyonel niktik oksit (NO) sentaz, ksantin oksidaz ve diğer oksijenazları kapsar. Bu kaynaklar arasında NOX, ROT üretimi sırasından birincil etkinliğe sahiptir (Bedard ve Krause, 2007). Bunun da ötesinde, büyüme, farklılaşma, göç ve proliferasyon gibi hücrel olaylarda rol olan redoks bağımlı sinyal yollarının düzenlenmesinde rol alması açısından önemlidir (Brandes ve ark., 2010).

NOX ailesi her biri farklı bir çekirdek alt üniteye sahip 7 üyeye sahip oksidazlardır. Bunlar NOX1-5, DUOX1-2 olarak adlandırılmış üyelerdir (Bedard ve Krause, 2007). Bütün NOX enzimleri NADPH' i elektron taşıyıcısı olarak kullanılır ve elektronların moleküler oksijene transferinin kataliz eder. Böylece oksijenden, hidrojen peroksit veya süperoksit radikali oluşturulur. NOX1, 2, 4, 5 kardiyovasküler hücrelerde eksprese edilirken, NOX5 sadece insanlarda bulunmaktadır (Dikalov ve ark., 2008). Enzimlerin hepsi farklı alt ünitelere ihtiyaç duyar ve fonksiyonel olarak da farklı görevleri bulunmaktadır (Tablo 4.1). NOX1, 2 ve 4 enzim aktivitesini kazanmak için daha küçük bir ünite olan p22phox altünitesine bağlanır (Dikalov ve ark., 2008).

**Tablo 4.1.** Kardiyovasküler sistemde NOX aktivitesi, düzenlenmesi ve ekspresyonu. (Sirker ve ark, 2011)

	<b>NOX1</b>	<b>NOX2</b>	<b>NOX4</b>	<b>NOX5</b>
<b>Aktivite</b>	Çok düşük	Çok düşük	Yüksek	Düşük
<b>p22phox ihtiyacı</b>	Var	Var	Var	Yok
<b>Düzenleyici altüniteleri</b>	NOXO1, NOXA1, Rac	p67phox, p47phox, p40phox, Rac	Yok	Yok
<b>Hücredeki ekspresyonu</b>	Düz kas hücresi, Endotel hücresi	Endotel hücresi, Kardiyomisit, Fibroblast, Düz kas hücresi, İnflamatuar hücreler	Endotel hücresi, Kardiyomisit, Fibroblast, Düz kas hücresi	Endotelyum, Düz kas hücresi

NOX1 genel olarak vasküler düz kas hücrelerinde (VSMC) eksprese olur ancak endotel hücrelerinde de eksprese edildiği bildirilmiştir. NOX2 ise nötrofillerin fagositik yıkımından sorumlu olmakla beraber düşük düzeyde inflamatuvar hücrelerde, kardiomyositlerde, fibroblastlarda ve VSMC'de eksprese olmaktadır. NOX4'ün tüm kardiyovasküler hücrelerde eksprese olduğu bilinmekle beraber

fonksiyonel olarak görevler tamamen açıklanmamıştır. NOX5 ise insan endotel hücreleri ve VSMC2' de ifade edilmektedir ancak diğer NOX izoformlarına göre patolojik etkisi çok daha zayıftır.

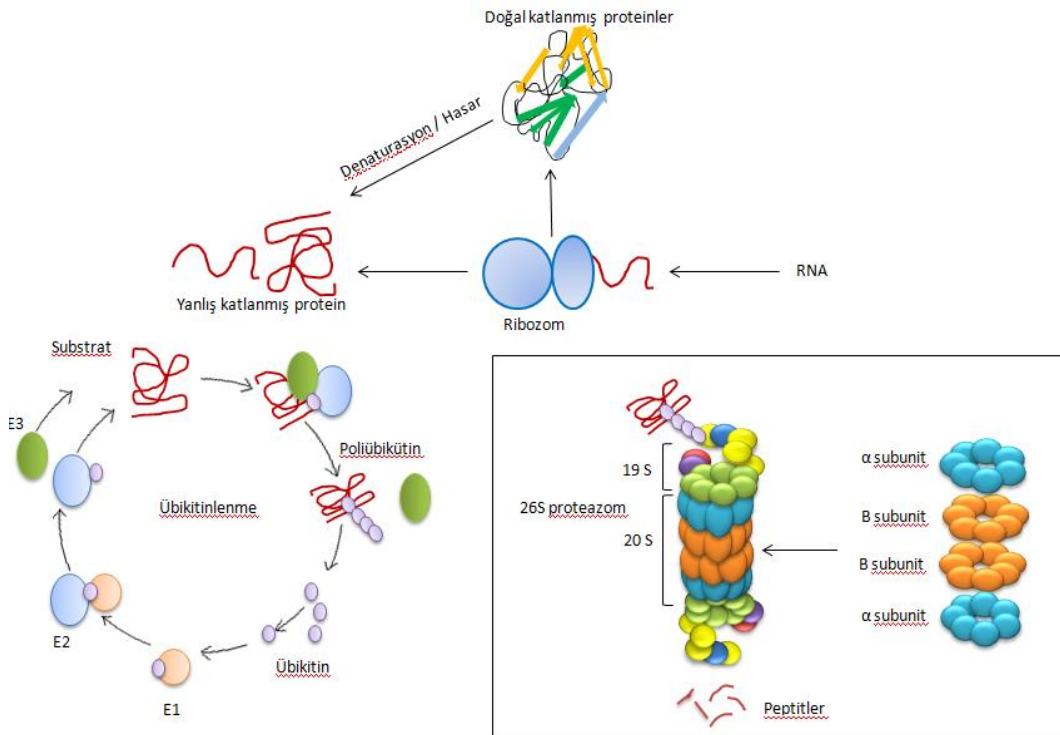
NADPH oksidazların ateroskleroz sürecindeki rolleri, farklı etkiler ile oluşmaktadır. Bütün kan damarı duvarı tabakalarında bulunmasının yanında, (Griendling, 2004) bu enzimler aterogeneze temel rolü olan makrofajlarda bulunmaktadır (Dale ve ark., 2008). Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlarla oluşan süperoksit radikali, LDL'yi okside edebilir ve okside olmuş aterojenik LDL de NOX enzimlerinin sentezini uyarır. Süperoksit aracılı NO inaktivasyonu, endotel aktivasyonu ve VSMC proliferasyonu gibi aterogeneze önemli olan diğer basamakları aracılık yapar. Bunun yanında, NOX-aracılı redoks sinyal yolağı bu süreçlerde önem arz etmektedir (Bae ve ark., 2009).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, NADPH oksidazların lezyonlarda makrofaj tutulmasında önemli rolü olduğunu vurgulamıştır. CD36 sinyal yolağı ile ilişkili okside LDL tarafından oluşturulan makrofaj fonksiyonundaki değişimlerin, ROT bağımlı fosfotaz inaktivasyonu ile sağlandığı gösterilmiştir. Bu olayın NOX inhibitörleri ile engellenmesinin ise bu sürecin NOX bağımlı olabileceğini öne sürmüştür (Park ve ark., 2009). NOX2 aktivitesini yokluğunda, aterosklerotik lezyonel bölgelerde azalma olduğu görülmüştür. p22phox yüksek ekspresyonunun ise arteriyal lezyonların büyümesi ve MMP aktivasyonunda artışa sebep olduğu görülmüştür. (Khatri ve ark, 2004). Bunlara ek olarak, Nrf2 knock-out hücrelerde yapılan bir çalışma, Nrf2-Keap1 yolağının ROT üretiminin NADPH oksidazlar yolu ile düzenlediğini göstermiştir (Kovac ve ark., 2015). Çalışmada ayrıca Nrf2 ekspresyonundaki artışın NOX4 ekspresyonunda artışa sebep olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında, fare kalplerinde NOX4 overekspresyonu ile bir çalışmada Nrf2 yolağının aktive olduğu gösterilmiştir (Brewer ve ark., 2011).

#### **4.5. Proteazomal Degradasyon ve Aterosklerozdaki Rolü**

Hücreler, organizmayı oksidatif hasar gibi durumlarda polipeptidleri kurtarmak ve proteinlerin normal yapılarına geri dönmelerini sağlamak için çeşitli tamir ve proteoliz mekanizmaları içerir. Tamir mekanizmaları sadece bazı metabolik ürünlere yönelik olmak üzere oldukça sınırlıdır. Proteoliz sistemlerinden übikitin-proteazomal sistem (UPS), okside proteinlerin degradasyonunda rol oynayan başlıca enzim sistemidir (Jung ve ark, 2009). Proteazomal sistem başlıca 20S, 26S proteazom ve

immünoproteazom yapılarından oluşmaktadır (Şekil 4.8). 20S proteazom, proteazomal sistemde merkezi yapı olarak bilinmektedir ve ATP ve übikütinden bağımsız degradasyondan sorumludur. 19S ve 11S gibi çeşitli düzenleyicilerin 20S proteazoma bağlanması ile 26S proteazom ve immünoproteazom yapıları oluşmakta, fonksiyon ve aktivitede değişiklikler gözlenmektedir. 26S proteazom ATP ve übikülin bağımlı degradasyondan sorumludur (Grune ve ark., 1997). Bu farklı proteazom yapıları birçok stres durumlarında farklı yanıtlar vermektedir. Proteazomal sistem farklı mekanizmalar ile regüle edilmektedir ve bunların arasında ısı şok proteinleri önemli bir yer tutmaktadır.



**Şekil 4.8.** Proteazomun yapısı ve protein yıkımı. Yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinler übikitinlenir ve proteazom tarafından yıkılır. (Bozaykut ve ark., 2014)

Aşırı ER stresin olduğu durumlarda, hasarlı proteinler proteazomal degradasyon ile uzaklaştırılmaktadır. Proteazom, özellikle oksidasyon ile hasara uğramış ve aktivitesini kaybetmiş proteinlerin organizmadan uzaklaştırılmasında oldukça etkili bir yıkım mekanizmasıdır (Bozaykut ve ark., 2014). Proteazomal sistem ve UPR cevabının yetersiz kaldığı durumlarda devreye giren yolaklar ise apoptoz veya otofajidir (Benbrook ve Long, 2012). Serbest yağ asitleri endoplazmik retikulum membranında doymuş fosfolipitler şeklinde toplanırlar ve endoplazmik retikulum membranının bütünlüğünün ve fonksiyonunun bozulmasına neden olarak apoptoz yol açarlar (Borradaile ve ark., 2006).

UPS, hatalı veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını sağladığından protein turnover sürecinde merkezi bir role sahiptir ve herhangi bir bozulma olması ateroskleroz oluşumunu çeşitli yönlerden etkileyebilir. UPS özellikle düz kas hücreleri olmakla beraber birçok kardiyovasküler hücre tipinde fizyolojik görev yapar. Bunun ötesinde, UPS 'in kanserde teröpatik hedef olarak kullanılması vasküler hastalıklardaki olası koruyucu etkisi için umut vermektedir (Kuhn ve ark., 2011).

UPS, vasküler düz kas hücre patobiyojisini, direkt olarak hastalıkla ilişkili apoptozu, proliferasyon ve farklılaşma gibi süreçleri etkileyerek veya direk olmayan yollarla hücresel yanıtları veya ER stres, inflamasyon ve redoks dengesini etkileyerek rol oynar (Tabas ve Ron, 2011). Vasküler düz kas hücrelerine ek olarak, makrofaj ve lenfosit gibi hücreleri de düzenlenmektedir. UPS ayrıca NF $\kappa$ B yolağını etkileyerek ateroskleroz sırasındaki inflamasyonda önemli bir rol oynar (Zhang ve Kaufman, 2008). Lipid metabolizması açısından ise proteazom inhibitörlerinin ters kolesterol taşınımını ABCA1 üzerinden inhibe ettiği gösterilmiştir (Ogura ve ark., 2011). Proteazom inhibitörleri ayrıca inflamasyon, gen baskılaması ve apoptoz açısından da ateroskleroz üzerinde etki göstermektedir ancak bu etkilerin mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir.

Stres koşullarında proteazom alt üniteleri Nrf2 aktivasyonu ile düzenlemektedir (Kwak ve ark., 2003). Bunun yanında 26S proteazom normal koşullar altında Keap-1 proteinin Nrf2'yi degradasyonu sağlaması ile yıkımına sebep olur (Chapple ve ark., 2012). Ancak kardiyovasküler sistemde uzun süreli proteazomal degradasyon aktivasyonunun, Nrf2 sinyalinin düzenlenmesindeki rolü henüz açıklanmamıştır.

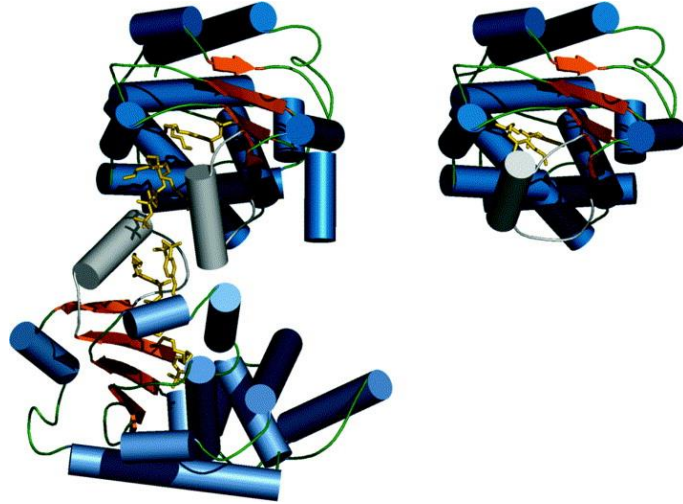
## **4.6. Vitamin E**

### **4.6.1. Vitamin E' nin kimyasal yapısı ve emilimi**

Vitamin E, bütün tokoferoller ve tokotrienoller için kullanılan genel bir terimdir (Singh ve Devaraj, 2007). Hem tokoferoller hem de tokotrienoller kroman halkasının üzerindeki metil gruplarının pozisyonu ve sayısı farklı olan, trimetil ( $\alpha$ -), dimetil ( $\beta$ - veya  $\gamma$ -) ve monometil ( $\delta$ ) tokoferol/tokotrienol formları bulunmaktadır (Traber, 2007). Tokoferoller, doymuş izoprenoid C-16 yan zincir taşıyan ve 2', 4' ve 8' pozisyonlarda metil grubu taşıyan tokolden türevlenir (Azzi ve Stocker, 2000). Tokoferoller, doymuş bir fitil zinciri içerirken, tokotrienoller aynı zincirin 3', 7' ve 11' pozisyonlarında çift bağ bulundurur. Doğal vitamin E kaynakları, bol miktarda  $\alpha$

-T içeren aspir tohumu yağı (59.3 mg/1 g ), zengin miktarda  $\alpha$ -,  $\gamma$  -,ve  $\delta$  -T içeren (62.4, 20.4, and 11.0 mg/1 g) soya yağı ve to  $\alpha$ -T'a (17.2 mg/1 g) ek olarak tokotriyonları (18.3 mg/g) içeren palm yağıdır (Munteanu ve ark., 2004).

Vitamin E' nin farklı formları değişik biyopotansiyelliğe sahiptir ve  $\alpha$ -tokoferol, Vitamin E' nin biyolojik olarak en yüksek aktiviteye sahip ve vücut tarafından en yüksek miktarda absorbe edilen formudur (Singh ve Devaraj, 2007). Vitamin E hidrofobik özelliğinden dolayı, vücut sıvıları ve plazmada özel taşıyım mekanizmaları gerektirir. Vitamin E formları ince bağırsakların proksimal kısmından safra tuzları ve lipitler ile birlikte alınır (Ricciarelli ve ark., 2001). Tokoferoller trigliseridler, kolesterol, lipitler ve apolipoproteinlerle birlikte şilomikronlar içinde taşınırlar. Şilomikronların lipolize olması ile vitamin E' nin bir kısmı dokulara dağılır diğer kısmı şilomikron kalıntıları ile birlikte karaciğer tarafından alınır. Karaciğerde  $\alpha$ -tokoferol transfer protein ( $\alpha$ -TTP, 32 kDa) tarafından spesifik olarak tanınan  $\alpha$ -tokoferol VLDL (Very Low Density Lipoprotein)'e dahil edilip transport edilerek periferal hücrelere gönderilir. Bu özel yapısından dolayı serumda bulunan vitamin E'nin %90'ını LDL ve HDL fraksiyonlarında bulunmaktadır (Azzi ve Stocker 2000; Ricciarelli ve ark., 2001).



**Şekil 4.9.**  $\alpha$ -Tokoferolun yapısı. Sol tarafta  $\alpha$ -tokoferolun açık konformasyon yapısı ve sağ tarafta kapalı konformasyon yapısı şematize edilmiştir. (Meier ve ark., 2003)

#### 4.6.2. Vitamin E' nin sinyal iletim mekanizmaları ve aterosklerozdaki rolü

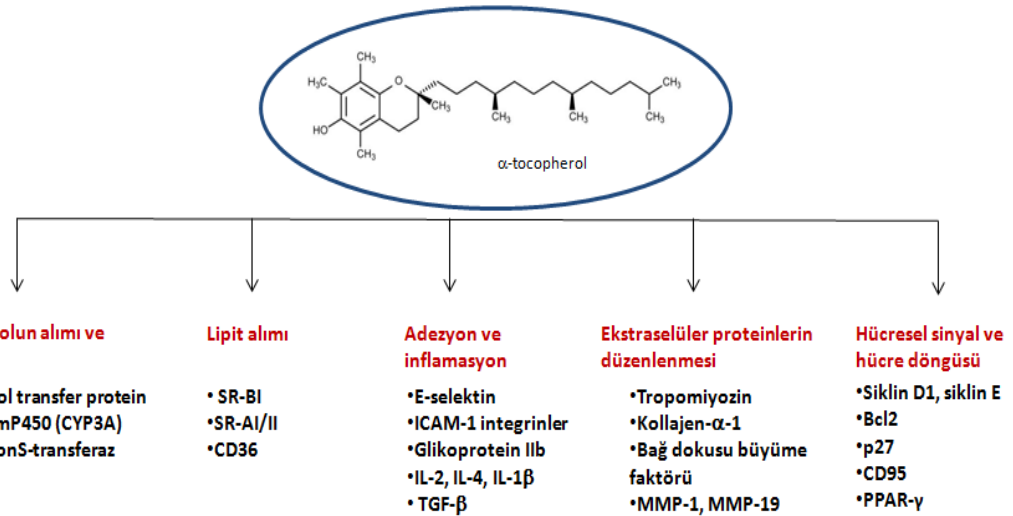
Vitamin E'nin LDL veya plazmada yağda çözünen ve genel zincir kırıcı özellikte olduğu bilinmektedir. Vitamin E' nin 4 izomerinin arasında biyolojik olarak en aktif olanı ise  $\alpha$ -tokoferol' dur (Traber, 2007). Yapılan çalışmalar, vitamin E'nin ateroskleroz ve koroner kalp hastalıklarının gelişiminde koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Katsiki ve Manes, 2009). Vitamin E' nin farmakolojik dozlarının LDL peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (Princen ve ark., 1992).

Ateroskleroz süreci, kronik inflamasyon olarak kabul edilmektedir (Ross, 1999) ve vitamin E' nin bu süreçte antioksidan özelliklerinin yanı sıra sinyal iletim yollarında ve çeşitli gen ekspresyonlarındaki etkileri ile antiinflamatuvar rol oynadığı gösterilmiştir (Azzi ve Stocker 2000; Ozer ve ark., 2006; Bozaykut ve ark., 2014; Sozen ve ark., 2014) (Şekil 4.9). Vitamin E' nin bu antioksidan olmayan özellikleri, LDL oksidasyonunu ötesinde bir koruma sağlayarak kardiyovasküler hastalıklardaki koruyucu rolünün daha geniş olabileceğini öne sürmektedir (Honarbakhsh ve Schachter, 2009). Vitamin E, köpük hücre oluşumu, monosit alımı (Wu ve ark., 1999), kemokin salınımı (Devaraj ve Jialal, 1999) ve makrofajlarda bulunan CD36 gibi çöpçü reseptörlerin ekspresyonunu azaltarak görev yapar (Munteanu ve ark., 2006, Ozer ve ark., 2006). Vitamin E, ayrıca ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak (Zapolska-Downar ve ark., 2000), SMC proliferasyonunu (Ozer ve ark., 1993) ve platelet agregasyonunu (Freedman ve ark., 1996) inhibe ederek ve NO biyoyararlanımını (Keaney ve ark., 1993) arttırarak ateroskleroz gelişiminde koruyucu rol oynayabilir. Vitamin E'nin bu etkilerini, oxLDL tarafından aktive edilen protein kinaz C sinyal yollarının inhibisyonu gibi antioksidan olmayan mekanizmalarla sağladığı gösterilmiştir (Murohara ve ark., 2002). Özer ve beraberindekiler (1998)  $\alpha$ -tokoferolün PKC aktivitesini baskıladığını, bir antioksidan olan probukolun ise PKC aktivitesini baskılamada etkili olmadığını göstermişlerdir.  $\alpha$ -tokoferolün PKC aktivitesindeki etkisinin, enzimin defosforiasyonu yolu ile meydana geldiği *in vivo* modelde gösterilmiştir (Ricciarelli ve ark., 1998).

Yapılan çalışmalar, okside LDL ile indüklenen NF- $\kappa$ B aktivasyonunun, vitamin E aracılı PKC baskılanması ve I $\kappa$ B degradasyonu ile engellendiğini göstermiştir (Li ve ark., 2000). Bunun yanında, insanlarda yaşlanmaya bağlı olarak artan MMP-1 ekspresyonu,  $\alpha$ -tokoferol ile azalmaktadır (Ricciarelli ve ark., 1999).  $\alpha$ -tokoferol,

MMP-1 gen transkripsiyonunu doğal inhibitörü olan TIMP-1'i etkilemeden direk şekilde azaltmıştır (Ricciaeelli ve ark., 1999). Grubumuzun daha önce yaptığı çalışmalar ise Vitamin E'nin lipit birikimini PPAR $\gamma$  ve ABCA1 mRNA ekspresyonlarını arttırarak azalttığını göstermiştir (Bozaykut ve ark., 2014).

Vitamin E'nin diğer bir antiaterojenik özelliği, endotelial NO sentaz mRNA ekspresyonunun upregülasyonunu sağlamasıdır (Goya ve ark., 2006). Bu şekilde endotelial hücrenin okside LDL ve reaktif oksijen türlerine karşı koruyarak ve endotel hücre proliferasyonunu sağlayarak, endotel apoptozisinin azaltmasına ve endotel disfonksiyonunu engellemesine neden olur (Ulrich-Merzenich ve ark., 2002, Li ve ark., 2000). Bunlara ek olarak, grubumuz daha önceki çalışmalarında, vitamin E'nin ateroskleroz sürecinde oluşan oksidatif stres üzerindeki etkisini göstermiştir. Ateroskleroz sürecinde yaklaşık 3 kat artan süperoksit radikali seviyelerinin vitamin E tarafından kontrol seviyelerine kadar düştüğü gözlenmiştir (Bozaykut ve ark., 2014).



Şekil 4.10. Vitamin E'nin gen ekspresyonu ve aterosklerozdaki rolleri. (Azzi ve ark., 2004)

## 5. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

Hayvanlara uygulanan yöntemlerin etik kurallara uygunluğu “Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu” tarafından 02.12.2014 tarihi ve 79.2014.mar numarası ile onaylanmıştır.

### 5.1. Kullanılan Gereçler

Kontrol ve deney grupları 2-4 aylık erkek albino tavşanlardan oluşturuldu. Tavşan yemi (vitamin E'den fakir olarak hazırlandı) M.Barbaros Denizeri Yem Sanayi'nden ve RRR- $\alpha$ -tokoferol (Evigen, i.m.) Aksu Farma Tıbbi Ürünler İlaç Sanayii'nden temin edildi. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar uygun kalite ve saflıktaydı.

#### 5.1.1. Kullanılan kimyasallar

PMSF (Sigma)

DTT (Biomatik)

EDTA (Sigma)

Tris baz (Sigma)

Bradford için protein assay (Biorad)

SDS (Sigma)

Akrilamid-bisakrilamid solüsyonu (Biorad)

Amonyum persülfat (Sigma)

TEMED (Sigma)

Glisin (Sigma)

2- $\beta$  Mercaptoethanol (Merck)

Brom fenol mavisi (Merck)

Metanol (Merck)

Ponceau S (Sigma)

Sodyum klorür (Merck)

Kolesterol (Dolder)

Dietileter (Kimetsan)

Formaldehit (Merck)

Tween 20 (Biomatik)

Skim Milk Powder (Fluka)

Protein molekül ağırlığı belirteci (Precision Plus Protein Standards, Biorad)

Phospho PERK rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling)

Phospho IRE-1 rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling)

Grp94 rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling)

Grp78 rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling)

Nrf2 rabbit monoclonal antibody (Santa Cruz)

GST $\alpha$  goat polyclonal antibody (Abcam)

NOX4 rabbit monoclonal antibody (Thermo)

Immun-Star goat anti-rabbit HRP conjugate (Biorad)

Immun-Star goat anti-mouse HRP conjugate (Biorad)

Trans-Blot Transfer Medium (Biorad)

Kemiluminesans kit 20X LumiGLO ve 20X Peroxide (Cell Signaling)

N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amido-4-Methylcoumarin (Sigma)

7-Amino-4-methylcoumarin (Sigma)

Hexokinase F-300 (Sigma)

2-Deoxyglucose (Sigma)

ATP (Sigma)

Leupeptin hemisulfate salt (Sigma)

### 5.1.2. Kullanılan cihazlar

Ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi “High Performance Liquid Chromatography, HPLC” (Waters), U.V dedektör ve integratör (Waters)

Hitachi modüler sistem P800 (Roche)

Elektroforez için güç kaynağı (Biorad) ve Elektroforez sistemi (EC 330 Midicell)

U.V görüntüleme cihazı (Vilbert Lourmat)

Otoklav (Hirayama Hiclave)

Mikrosantrifüj (Thermo)

pH metre (Corning)

Vorteks (Cleaver Scientific)

Santrifüj (Sartorius)

Spektrofotometre (Biorad)

Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Biorad)

Mini-PROTEAN 3 Cell (Biorad)

Orbital Shaker (Major Science)

Ultra Turrax T25, Homojenizatör (IKA)

ChemiDoc (BioRad)

### 5.1.3 Çözeltiler

**0.1 M Disodyumetilendiamintetraasetat (EDTA):** 1.861 g etilendiamintetraasetat beher içine alındı ve 40 mL ddH<sub>2</sub>O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. pH'sı sodyum hidroksit ile 8.0' e ayarlandı ve ddH<sub>2</sub>O ile 50 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavlanarak sterilize edildi.

**0.1 M Fenilmetansulfonilflorid (PMSF):** 34.8 mg PMSF tartılarak ependorf içine alındı ve 2 mL metanol eklendikten sonra vorteks yardımıyla çözünmesi sağlandı. Hazırlanan çözelti 15 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'da saklandı.

**1 M Ditiotreitol (DTT):** 154.2 mg DTT tartılarak ependorf içine alındı ve 1 mL ddH<sub>2</sub>O eklendikten sonra vorteks yardımıyla çözünmesi sağlandı. Hazırlanan özelti 40 µl'lik hacimlere bölünerek -20°C'da saklandı.

**10 mM Fosfat tampon solüsyonu (PBS-Phospate buffer saline):** 10 mM disodyum hidrojen fosfat üzerine 10 mM sodyum dihidrojen fosfat pH'sı 7.4'e ayarlandı. Çözeltinin her 100 mL'si için 0.9 g NaCl eklendi. Hazırlanan özelti otoklavlanarak sterilize edildi.

**1 M Tris-HCl tamponu:** 242.2 mg tris tartılarak beher içine alındı ve 80 mL ddH<sub>2</sub>O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. pH'ı 5N HCl ile 7.4' e ayarlandı ve bir balon jøjeye alınan çözelti ddH<sub>2</sub>O ile 100 mL'ye tamamlandı.

**1,5 M Tris-HCl tamponu:** 18.2 mg tris tartılarak beher içine alındı ve 60 mL ddH<sub>2</sub>O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. pH'sı 5N HCl ile 8.8'e ayarlandı ve bir balon jøjeye alınan çözelti ddH<sub>2</sub>O ile 80 mL'ye tamamlandı.

**Sodyum dodesil sülfat (SDS) (%10):** 50 g SDS tartılarak beher içine alındı ve üzerine 80 mL ddH<sub>2</sub>O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlanarak oda ısısında saklandı.

**Amonyumpersülfat (APS) (%10):** 0.1 g amonyumpersülfat tartılarak ependorf içine alındı ve 0.9 mL ddH<sub>2</sub>O eklendikten sonra vorteks yardımıyla çözünmesi sağlandı. Deney günü taze hazırlandı.

**Ponceau S boyası:** 0.1 g Ponceau S tartılarak beher içine alındı ve 500 µg asetik asitle birlikte 30ml ddH<sub>2</sub>O eklenerek manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Çözündükten sonra bir balon jøjeye alınan çözelti ddH<sub>2</sub>O ile 50 mL'ye tamamlandı.

**5X Elektroforez (Running) Buffer:** 30 g Tris, 143 g Glisin, 5 g SDS tartılarak balon jöje içine alındı üzerine 1000 mL ddH<sub>2</sub>O eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. Kullanmadan önce 1X olacak şekilde seyreltildi.

**25 mM Tris, 192 mM Glisin, % 20 v/v Metanol PH: 8,3 Transfer Buffer:** 3.03 g Tris, 14.4 g glisin tartılarak balon joje içine alındı ve 800 mL ddH<sub>2</sub>O ile 200 ml metanol eklendikten sonra manyetik karıştırıcı yardımıyla çözünmesi sağlandı. +4 °C'ye konularak kullanıma hazır hale getirildi.

**10X Tris-Buffered Saline (TBS):** 24.2 g Tris, 80 gr. NaCl tartılarak balon joje içine alındı ve 300 mL ddH<sub>2</sub>O eklenerek konsantre HCl ile pH'sı 7.6'ya ayarlandı. Distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı.

**1X Tris-Buffered Saline Tween 20 (TBST):** Önceden hazırlanan 10X TBS 1 litre 1X yapılarak üzerine 500 µL Tween 20 eklendi.

**Protein izolasyonu için homojenizasyon tamponu:** 15 mL' lik tüp içerisine 100 µL EDTA + 10 µL DTT + 10 µL PMSF + 50 µL Leupeptin+ 6,85 µg Pepstatin+ 50 µg Aprotinin+1,84 mg sodyum vanadat eklendi. 1 M Tris-HCl (PH:7,4) ile 10 mL'ye tamamlandı.

**3x 26S tampon çözeltisi:** 13,6 g Tris baz, 1,7 g KCl, 0,8 g Mg-Acetate x 4H<sub>2</sub>O, 0,76 MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O 240 ml distile su ile 250 ml'lik şişeye eklendi. Kimyasallar çözüldükten sonra pH 8.2' ye ayarlandı ve distile su ile 250 ml'ye tamamlandı.

**Fluoropeptit-substrat SUC 2 nM stok solüsyonu:** 10 mg SUC 6,55 ml DMSO içerisinde çözüldü. 100 µl'lik aliyatlar şeklinde ependorflara bölündü ve -20°C' ye kaldırıldı.

## 5.2. Yöntemler

### 5.2.1. Deney planı

Çalışmada yaşları 2-4 ay arasında değişen (anne sütünden kesildikten hemen sonra) ve ağırlıkları 1000-2000 gr arasında olan 24 adet erkek albino tavşan kullanıldı. Tavşanlar her grupta 6 adet olacak şekilde aşağıdaki protokole uygun şekilde gruplandırıldı. Bütün Tavşanlar vitamin E' den fakir yem ile beslendi.

1. Grup: Yem ile beslendi.
2. Grup: Yem ile beslendi ve vitamin E i.m. olarak 50 mg/kg/gün uygulandı.
3. Grup: % 2 kolesterol içeren yem ile beslendi.

4. Grup: % 2 kolesterol içeren yem ile beslendi ve vitamin E i.m. olarak 50 mg/kg/gün uygulandı.

Enjeksiyonlar her iki bacağına gūnaşırı intramuskūler olarak uygulandı. Būttūn tavşanlar gūnde 100 g yem ile 8 hafta sūre ile beslendi ve her bir tavşan ayrı bir kafeste barındırıldı. Kolesterol içeren yem, kolesterolūn dietileter içinde ōzūndūrūlerek yeme karıştırmalı ve daha sonra eterin tamamen uçurulması Őeklinde hazırlandı.

### **5.2.2. Tavşanlar ile ilgili materyallerinin alınması ve saklanması**

Tūm tavşanlardan deney Őncesi kulak veninden kan Őrneklere alındı, santrifūj edilene kadar buz Őzerinde bekletildi ve +4<sup>0</sup>C de 4000 rpm'de santrifūj edildi.

Sekiz hafta sonunda tavşanlara periton içine 50 mg/kg ketamin HCl ve 5 mg/kg ksilazin HCl uygulanarak derin anestezi sağlandı. Toraks disseksiyonunu takiben aortaları serbestleştirildi. Saė ventrikūlden injektōrle 10 mL kan alındıktan sonra aortalar arkus hizasından kesildi veyaklaşık 3 mm uzunluğunda bir kesit mikroskopik incelemeler için % 10 tamponlanmış formalin içinde tespit edildi. Daha sonra torasik aorta diyafram hizasına kadar çıkarıldı. Adventisya tabakası temizlendi, damar uzunlamasına açıldı, endotel tabaka kazındı. Protein izolasyonu yapılacak aorta dokuları sıvı nitrojenle hemen dondurularak -80 °C'ye kaldırıldı.

Serum lipit profili ve vitamin E analizleri için kan Őrneklere kuru tūplere ayrıldı ve santrifūjlenerek serumları ayrıldı, vitamin E için kullanılacak serumlar azot gazından geçirildi.

### **5.2.3. Kan tetkiklerinin prensipleri**

Kan kolesterol deėerlerinin saptanması Hitachi Modūler sistem P800 (Roche), kan vitamin E dūzeylerinin Őlūlmesi ters fazlı yūkssek performanslı sıvı kromatografisi (Waters) kullanılarak yapıldı.

#### **5.2.3.1. Serum total kolesterol dūzeylerinin Őlūlmesi**

Bu yōntem, kolesterol esteraz kolesterol esterlerini serbest kolesterol ve yaė asitlerine hidrolizi prensibine dayanır. Kolesterol oksidaz kolesterolūn oksidasyonunu katalizleyerek kolest-4-ene-3-one ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşturur. Peroksidaz varlığında, oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fenol ve 4-aminofenazon ile oksidatif bir etkileşim sağlayarak kırmızı renkli kinonemin bileşiklerini oluşturur. Bu kırmızı renkli kinonemin bileşikleri spektrofotometrik olarak absorbanları Őlūlerek total

kolesterolün miktarları mg/dL olarak belirlenmektedir. Reaktif olarak sodyum kolat, fenol, 4-aminofenazon, kolesterol esteraz, kolesterol oksidaz, peroksidaz kullanıldı.

#### **5.2.3.2. Serum $\alpha$ -tokoferol düzeylerinin ölçülmesi**

200  $\mu$ L tavşan serumu tüpe ayrıldı, 200  $\mu$ L askorbatlı etanol (1 gr/L) ile muamele edilerek deproteinize edildi. 24  $\mu$ L asetonitril eklenerek 1 dakika vortekslendi. Üzerine 500  $\mu$ L HPLC grade heksan eklenerek 2 dakika vortekslendi ardından 1 dakika 3000 rpm (1000 g)'de santrifüjlendikten sonra en üstteki heksan fazı toplandı. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Bu şekilde serumdaki  $\alpha$ -tokoferol yaklaşık 1500  $\mu$ L heksan içinde elde edildi. Bu çözeltinin 1250  $\mu$ L'si tüpe alındı ve 36 °C su banyosunda sıvı azotla heksan tamamen uçuruldu. Tüplerin ağzı sıkıca parafilmlelenerek çalışmaya hazır hale getirildi.

HPLC uygulaması için tüpteki kalıntının üzerine 20  $\mu$ L askorbatlı etanol (1 gr/L) eklendi ve vortekslendi. Ardından 400  $\mu$ L mobil faz (metanol : su ; 95:5) eklendi, 1 dakika vortekslendi ve 1 dakika sonikasyonla degaze edildi. Karışım 45 nm'lik filtrelerden süzüldü.

Bu süzüntüden alınan 50  $\mu$ L örnek, akış hızı 1.5 mL/dk olacak şekilde HPLC C-18 Bondapak kolonuna injekte edildi ve absorbans değerleri Waters UV dedektör ile 294 nm'de okundu.  $\alpha$ -Tokoferol tepeleri standart tepelerle karşılaştırılarak konsantrasyon hesaplandı ve  $\mu$ g/mL olarak ifade edildi (Nierenberg ve Nann, 1992).

#### **5.2.4. Işık mikroskobu incelemeleri**

Örnekler, %10 tamponlanmış formalin içinde 4 saat tespit edildikten sonra yükselen alkol serilerinden geçirilerek suları alındı. Daha sonra 30'ar dakika 2 kere ksilenle muamele edildikten sonra 1 gece 60 °C'de erimiş parafin içinde bekletildi ve daha sonra parafine gömüldü. 5  $\mu$ m kalınlığında alınan kesitler hemotoksilen-eosin boyası ile boyandı ve ışık mikroskobu incelemeleri yapıldı.

#### **5.2.5. Aorta dokusundan total protein izolasyonu**

Tavşan torasik aorta dokusundan yaklaşık 100 mg aorta parçası steril bir cam tüp içerisine konuldu. Üzerine 0,5 ml homojenizasyon tamponu eklenerek 2 dakika buz içerisinde bekletildi. Ultraturax homojenizatörü kullanılarak 24.000 rpm' de 20 saniye homojenize edildi. Dokular iyice homojenize olmamış ise işlem tekrarlandı. Doku homojenatı + 4 °C' de 10000 rpm' de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant

protein tayini için ayrıldı. Bradford yöntemi kullanılarak protein tayini yapıldı ve total protein içeren homojenat -20 °C’ de saklandı.

#### **5.2.6. Protein konsantrasyonunun hesaplanması**

Elde edilen örneklerdeki total protein konsantrasyonu, Bradford protein tayini (BioRad Protein Assay) yöntemi ile ölçüldü. Öncelikle Bovine Serum Albümin (BSA) kullanılarak 0 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.8 mg/ml, 1.0 mg/ml, 1.2 mg/ml konsantrasyonlarında standartlar hazırlandı. Her bir ependorfa 4µl standart veya bilinmeyen örnek ve 200 µl çalışma ayıracı (protein assay – Biorad) eklendi. Daha sonrasında karanlık ortamda 5 dk olmak üzere inkübasyona bırakıldı. Oluşan mavi renkli ürün 595 nm’ de absorpsiyon spektrofotometrede (smartSpec plus, Biorad) ölçüldü. Oluşturulan standart eğriye göre örneklerdeki protein miktarları hesaplandı.

#### **5.2.7 SDS-PAGE jel elektroforezi ve immunblotlama**

İlk olarak %5’ lik yükleme jeli (1 M Tris-HCl, %30 (w/v) Akrilamid, %10 (w/v) SDS, %0,05 (w/v) APS ve %0,05 (w/v) TEMED, pH:6.8) ve % 12’ lik ayırma jeli (1.5 M Tris-HCl, %30 (w/v) Akrilamid, %10 (w/v) SDS, %0.05 (w/v) APS, %0.05 (w/v) TEMED eklenerek pH 8.8) hazırlandı. Aorta dokuları için 30 µg protein içeren homojenatlar 1 mM Tris-HCl, %40 gliserol, %8 SDS, %20 2-β-merkaptotanol, %0.03 bromfenol mavisini içeren jel yükleme tamponu ile 1’e 4 oranında sulandırıldı ve 95°C’de 4 dakika ısıtılarak denatüre edildi. Denatüre edilen örnekler polimerize olmuş jele yüklendi. 2 L, elektroforez yürütme tamponu içinde 100 volt sabit akımda 1-1.5 saat sürede proteinler ayrıştırıldı (Biorad, Mini-PROTEAN 3 Cell). Protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak “Precision Plus Protein Standards” (Biorad) kullanıldı.

Ayrıştırılan proteinler, immunblotlama ile ortam sıcaklığında 100 volt sabit akımda, 25 mM Tris-baz, 192 mM glisin ve %20 v/v metanol içeren, pH 8.3’lük transfer tamponunda 2 saat sürede 0.2 µm kalınlıktaki nitrosellüloz membrana aktarıldı (mini transblot elektroforetik transfer cell-BioRad). Daha sonra membran ponceau S boyası ile muamele edilip proteinlerin transferi kontrol edildi. Membran antikor ile tayin edilene kadar PBS içerisinde +4 de bırakıldı.

Antikor ile tayin için ilk aşama olarak membran %5 oranında süt tozu TBST içerisinde hazırlanarak 1 saat bloke edildi. Sonrasında, membran %5 süt tozu-TBST

karışımı ile %1000-500 oranında fosfo IRE, fosfo PERK, Grp94, Grp78, Nrf2, GST $\alpha$ , NOX4 proteinlere karşı geliştirilmiş primer antikolar ile +4 derecede gece boyu inkübe edildi. Bağlanmamış antikoların PBST ile yıkanmasından sonra membran süt tozu-TBST karışımı ve 1/5000 dilusyonlarda tavşanlara karşı geliştirilmiş amplifiye horseradish peroksidaz (HRP) işaretli keçi sekonder antikoru ile 1 saat inkübe edildi. Membran PBST ile yıkandıktan sonra kemiluminesans kit ile (20X LumiGLO ve 20X Peroxide, Cell Signaling) kemiluminesans bir reaksiyon gerçekleştirildi ve ChemiDoc cihazı (BioRad) görüntüleme cihazı ile ve İmegelab programı kullanılarak membranların görüntü alındı. Tüm görüntülerdeki bantların piksel yoğunluğu 'Image J Programı' ile eşit büyüklükte alanlarda ölçüldü.

### **5.2.8. Proteazomal aktivitenin tayini**

Aorta dokularından izole edilen protein homojenatlarından proteazom aktivitesi flurojenik ELISA metodu ile belirlenmiştir. 10  $\mu$ L süpernatant alındı ve 96 kuyuluk mikropklarda her örnek 3 paralel olarak buz üzerinde çalışıldı. Örneklerin üzerine 33,3  $\mu$ L 26S tampon çözeltisi [450 mM Tris(base), 90 mM KCl, 15 mM Mg-Acetate x 4 H<sub>2</sub>O, 15 mM MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O], 0,2  $\mu$ L DTT (0.5 M), 66,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O ve 10  $\mu$ L 2 mM flurojenik proteozom substratı "suc-leu-leu-val-tyr-methylcoumaryl amide" (Suc-LLVY-MCA) ilave edildi ve peptidaz aktivitesi ölçüldü. Reaksiyon 37 °C'de, 30 dakika boyunca yürütüldü. Reaksiyon sonucunda açığa çıkan metilkumarin peptidin floresansı 365 nm eksitasyon ve 460 nm emisyon dalga boylarında florimetride ölçüldü. Metilkumarin standart çözeltilerinin floresanslarının direkt ölçümüyle hazırlanan standart eğriye göre proteazom aktivitesi dakika ve mg protein başına nmol MCA açığa çıkışı olarak hesaplandı. Hesaplama için örneklerin protein miktarları Bradford yöntemi ile tayin edildi.

### **5.2.9. Kullanılan istatistiksel yöntemler**

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri GraphPad yazılımı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmelerde ANOVA testi kullanılarak anlamlılık sınırı p<0.05 olarak alınmıştır. Değerler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak gösterilmiştir.

## 6. BULGULAR

### 6.1. Serum Kolesterol Düzeyleri

Kontrol, vitamin E, kolesterol ve kolesterol + vitamin E gruplarındaki tavşanların 0. haftada serum kolesterol düzeyleri sırasıyla;  $70.6 \pm 6.4$  mg/dL,  $100 \pm 29.7$ mg/dL,  $66 \pm 22.8$  mg/dL,  $50.5 \pm 11.1$  mg/dL olarak belirlendi. Sekizinci hafta sonunda tavşanların serum kolesterol düzeyleri, kontrol grubunda  $46.3 \pm 1.5$  mg/dL, vitamin E grubunda  $63 \pm 9.5$  mg/dL, kolesterol grubunda  $2321 \pm 769.9$  mg/dL, kolesterol + vitamin E grubunda  $2508.7 \pm 469.5$  mg/dL olarak bulundu (Tablo 6.1). Kolesterol alan grupların 8. hafta sonunda kolesterol düzeylerinin yaklaşık olarak 40 kat arttığı ve meydana gelen artışın kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ( $p < 0.001$ ).

GRUPLAR	Serum kolesterol düzeyleri (mg/dL)	
	0. hafta	8. hafta
Kontrol	$70.6 \pm 6.4$	$46.3 \pm 1.5$
Vitamin E	$100 \pm 29.7$	$63 \pm 9.5$
Kolesterol	$66 \pm 22.8$	$2321 \pm 769.9^{*\dagger}$
Kolesterol + Vitamin E	$50.5 \pm 11.1$	$2508.7 \pm 469.5^{*\dagger}$

**Tablo 6.1.** Sekiz hafta süre ile vitamin E'den fakir yem ile beslenen tavşanlara kolesterol ve vitamin E verilmesinin serum kolesterol düzeyine etkisi. 0. hafta ile 8. hafta kıyaslandığında  $*p < 0.001$ , 8. hafta kontrol grubu, kolesterol ve kolesterol + vitamin E grupları ile kıyaslandığında  $^{\dagger}p < 0.001$ , ortalama  $\pm$  standart sapma, (n=3).

### 6.2. Serum Vitamin E Düzeyleri

Sekiz hafta sonunda kontrol grubunda serum vitamin E düzeyi ortalaması  $2.88 \pm 1.36$   $\mu$ g/mL, vitamin E grubunda  $29.22 \pm 20.14$ , kolesterol grubunda  $24.52 \pm 3.42$   $\mu$ g/mL, kolesterol + vitamin E alan grupta  $17.39 \pm 10.31$   $\mu$ g/mL olarak ölçüldü (Tablo 6.2). Sekizinci hafta kontrol grubu ile vitamin E, kolesterol grubu ve kolesterol + vitamin E grubu kıyaslandığında kolesterol + vitamin E grubundaki

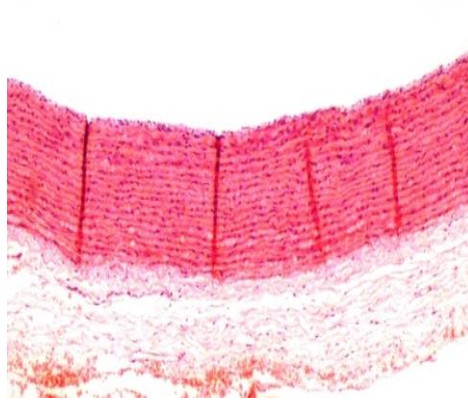
serum vitamin E düzeylerinin artışı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ). Yağda çözünen bir vitamin olan vitamin E' nin LDL içerisinde taşınmasından ötürü, Vitamin E'den fakir beslenen kolesterol grubunda artan LDL değerlerine paralel bir şekilde, vitamin E değerlerinin normalden yüksek çıktığı görülmüştür.

GRUPLAR	Serum vitamin E düzeyleri ( $\mu\text{g/mL}$ )
	8. hafta
Kontrol	$3.2 \pm 1.8$
Vitamin E	$22.1 \pm 5.5^{*\dagger}$
Kolesterol	$24.7 \pm 3.1^{*\dagger}$
Kolesterol + Vitamin E	$23.9 \pm 4.2^{*\dagger}$

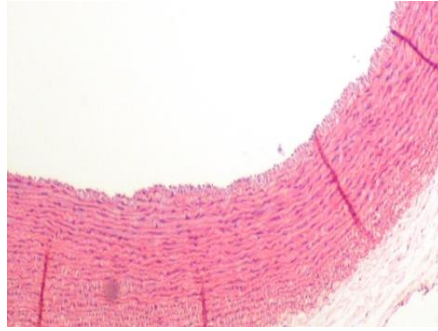
**Tablo 6.2:** Sekiz hafta süre ile vitamin E'den fakir yem ile beslenen tavşanlara kolesterol ve vitamin E verilmesinin serum vitamin E düzeyine etkisi. 8. hafta, vitamin E, kolesterol ve kolesterol + vitamin E grubu kontrol grubu ile kıyaslandığında  $\dagger p<0.001$ , ortalama  $\pm$  standart sapma, (n=3).

### 6.3. Aortanın Işık Mikroskobu ile İncelenmesi

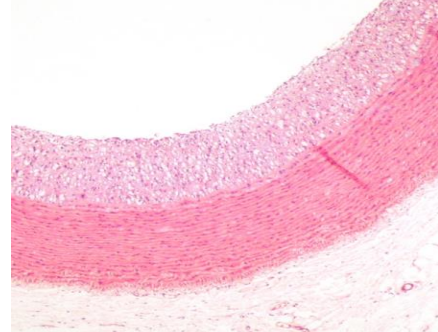
Kontrol ve vitamin E grubundaki tavşanların aorta örneklerinde bütünlüğü bozulmamış endotel tabakası ve internal elastik lamina, normal bir intima ve media tabakasına sahip olan damar kesitleri görüldü (Resim 6.1A ve 6.1B ). Kolesterolde zengin yem ile beslenen grupta endotel tabakasının bütünlüğünün bozulduğu ve intimada hücre tabakasında belirgin bir kalınlaşma olduğu gözlemlendi. İntimadaki hücrelerin sitoplazmalarında lipit vakuollerinin birikerek köpük hücreleri oluştuğu gözlemlendi. Elastik liflerin bozulmuş olduğu ve düz kas hücreleri arasında yer yer lipit damlacıklarının bulunduğu gözlemlendi (Resim 6.1C). Kolesterol+vitamin E verilen grupta, kolesterol grubuna kıyasla damar yapısında intimal kalınlaşmanın olmadığı veya minimal olduğu, intima veya mediada köpük hücrelerin çok düşük seviyede görüldüğü, media tabakasında elastik liflerin yapısının ise normal olduğu gözlemlendi (Resim 6.1D).



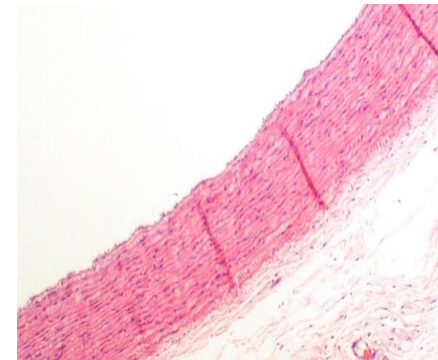
**A**



**B**



**C**

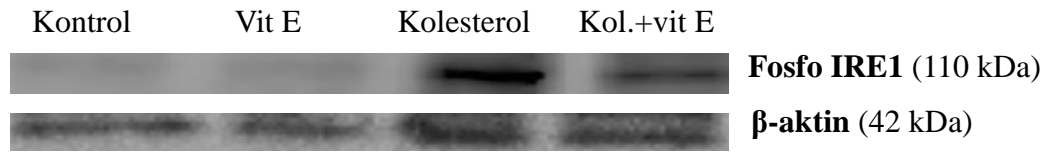


**D**

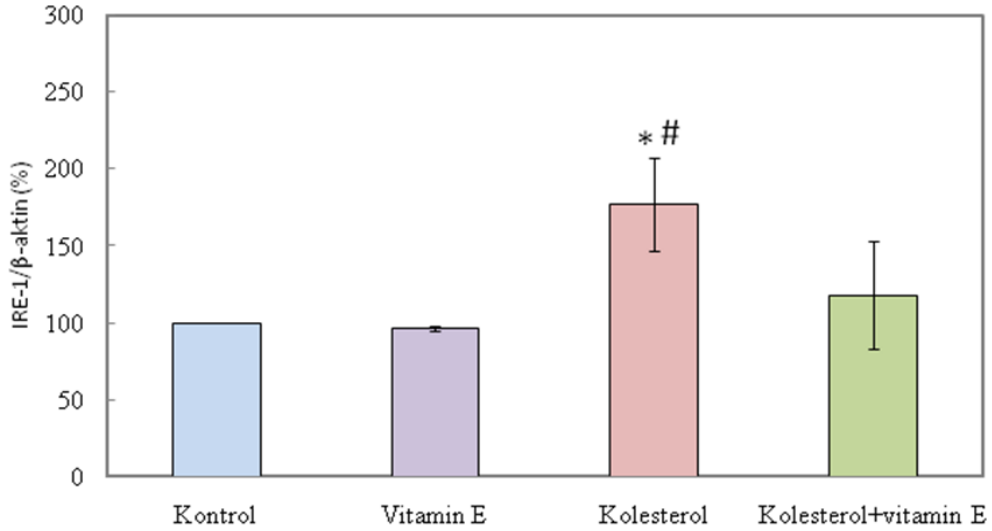
**Resim 6.1.** Her deney grubunu temsil eden bir tavşan aortasının ışık mikroskopi fotoğrafları (x40). A)Kontrol grubu (x40), B)Vitamin E (x40), C)Kolesterol grubu (x40) ve D) Kolesterol + vitamin E grubu (x40).

#### 6.4. Aorta Dokusunda fosfo IRE-1 Protein Ekspresyonu

Kolesterol ve Vitamin E' nin ER stres üzerindeki etkisini incelemek amacıyla torasik aorta örneklerinden hazırlanan total protein homojenatlarından fosfo IRE-1 protein ekspresyonu immunblotlama yöntemi ile analiz edildi ve  $\beta$ -aktin' e göre normalize edildi (Resim 6.2). Kontrol grubunun protein ekspresyonu % 100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde, vitamin E grubu  $97,1 \pm 6,3$ , kolesterol grubu  $178,1 \pm 32,7$ , kolesterol+vitamin E grubu  $118,7 \pm 35,8$  olarak bulundu. 8 hafta süre kolesterol verilmesi ile pPERK protein ekspresyonunun yaklaşık olarak 2 kat arttığı bulunmuştur ( $p < 0,05$ ) (Şekil 6.1).



**Resim 6.2.** Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta fosfo IRE-1 protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü.

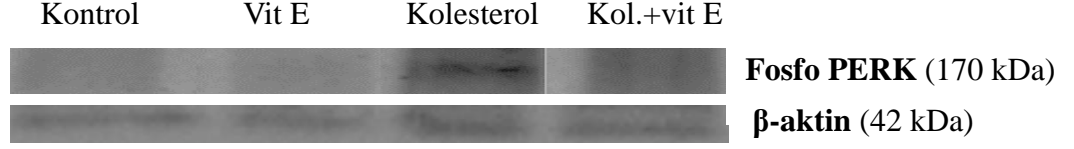


**Şekil 6.1.** Torasik aortada fosfo IRE-1 protein ekspresyonu. Kolesterol grubu, kontrol grubu ve vitamin E grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu \* $p < 0,05$  vs kontrol, # $p < 0,05$  vs vitamin E, (n=3).

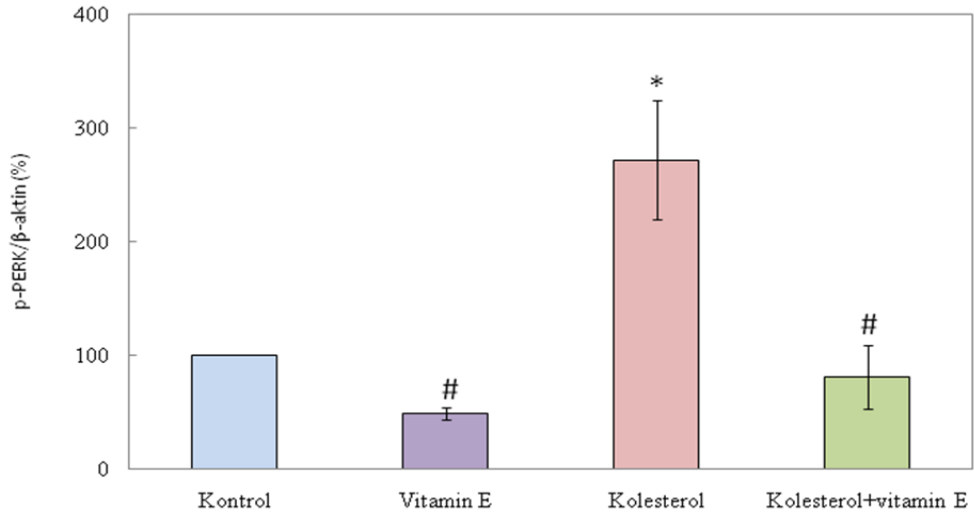
#### 6.5. Aorta Dokusunda fosfo PERK Protein Ekspresyonu

Kolesterol ve vitamin E' nin ER stres üzerindeki etkisini incelemek amacıyla torasik aorta örneklerinden hazırlanan total protein homojenatlarından ER stres belirteci fosfo PERK protein ekspresyonu immunblotlama yöntemi ile analiz edildi ve  $\beta$ -aktin' e göre normalize edildi (Resim 6.3). Kontrol grubunun protein ekspresyonu % 100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde, vitamin E grubu  $48,4 \pm 5,2$ , kolesterol grubu  $271,1 \pm 52,9$ , kolesterol+vitamin E grubu  $81,1 \pm 27,9$

olarak bulundu. Kolesterol grubu kontrol grubuna kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı, yaklaşık 3 kat bir artış olduğu ve kolesterol içeren diyetle ek olarak vitamin E verilmesinin fosfo PERK seviyesini anlamlı bir düzeyde düşürdüğü görülmüştür ( $p<0.05$ ) (Şekil 6.2).



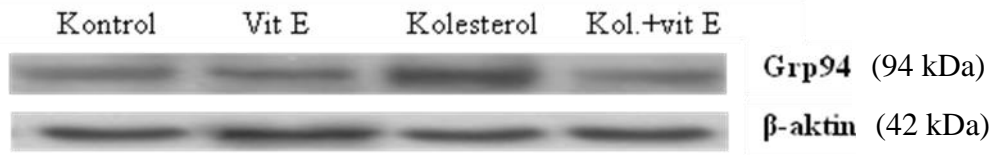
**Resim 6.3.** Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta fosfo PERK protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü.



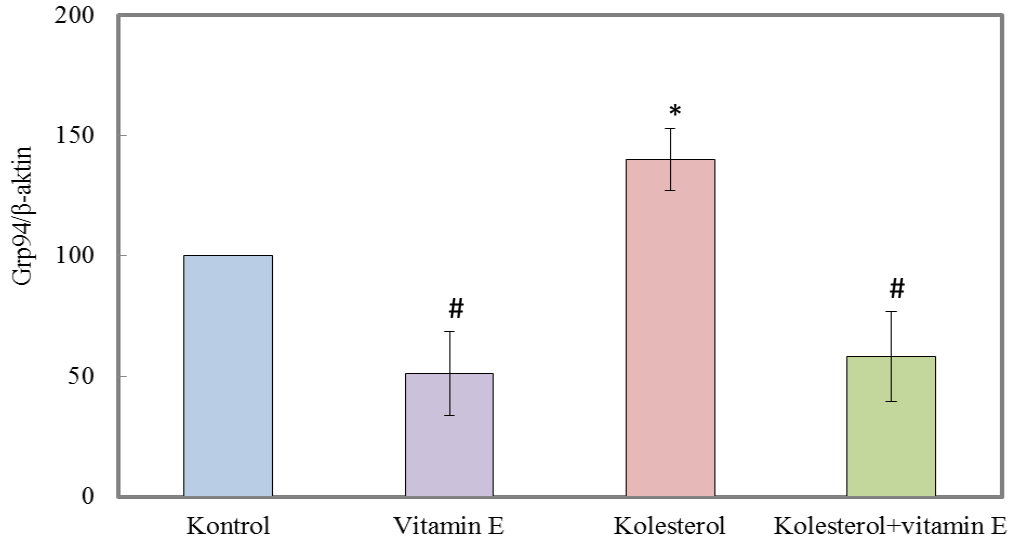
**Şekil 6.2.** Torasik aortada fosfo PERK protein ekspresyonu. Kolesterol grubu kontrol grubu ile, vitamin E grubu ve kolesterol+vitamin E grubu kolesterol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu \* $p<0.05$  vs kontrol, # $p<0.05$  vs kolesterol, (n=3).

### 6.6. Aorta Dokusunda Grp94 Protein Ekspresyonu

Torasik aorta örneklerinden hazırlanan total protein homojenatlarından ER şaperonu Grp94 protein ekspresyonu immunblotlama yöntemi ile analiz edildi ve  $\beta$ -aktin' e göre normalize edildi (Resim 6.4). Kontrol grubunun protein ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde, vitamin E grubu  $51,2\pm 17,5$ , kolesterol grubu  $140,2\pm 12,9$ , kolesterol+vitamin E grubu  $58,4\pm 18,6$  olarak bulundu. Kontrol grubuna göre, kolesterol grubunda istatistiksel olarak anlamlı, yaklaşık 1,5 kat bir artış olduğu ve bu artışın vitamin E grubu verilen grupta azaldığı görüldü ( $p<0.05$ ) (Şekil 6.3).



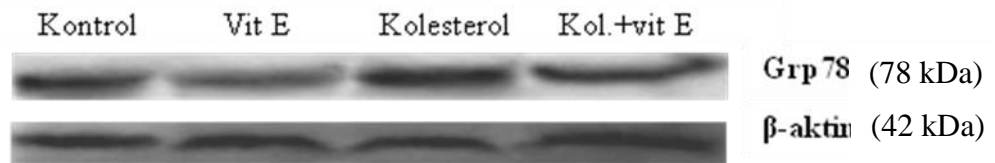
**Resim 6.4.** Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta Grp94 protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü.



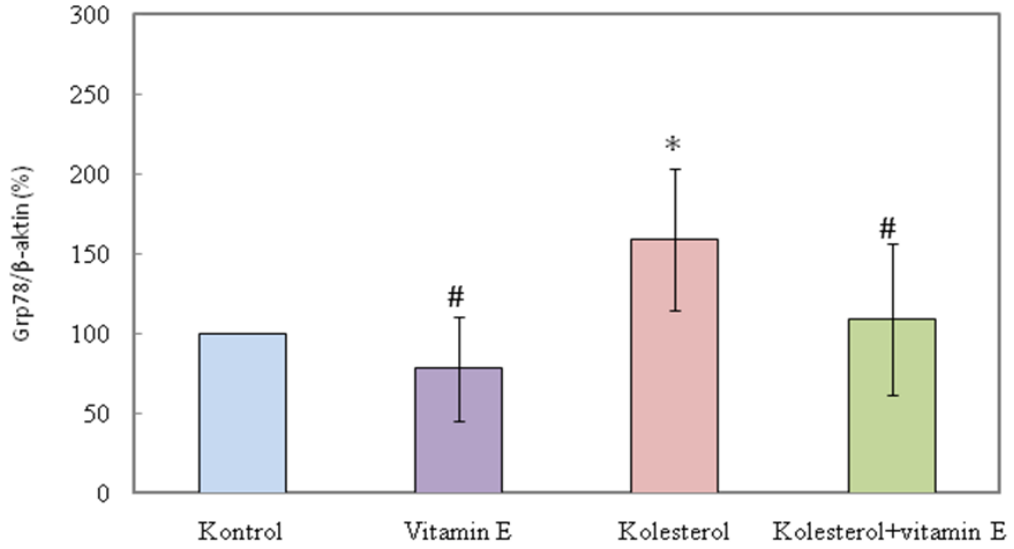
**Şekil 6.3.** Torasik aortada Grp94 protein ekspresyonu. Kolesterol grubu kontrol grubu ile, vitamin E grubu ve kolesterol+vitamin E grubu kolesterol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu \*p<0.05 vs kontrol, #p<0.05 vs kolesterol, (n=3).

### 6.7. Aorta Dokusunda Grp78 Protein Ekspresyonu

Torasik aorta örneklerinden hazırlanan total protein homojenatlarından diğer bir ER şaperonu olan Grp78 protein ekspresyonu immunblotlama yöntemi ile analiz edildi ve  $\beta$ -aktin' e göre normalize edildi (Resim 6.5). Kontrol grubunun protein ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde, vitamin E grubu  $78,1\pm 32,5$ , kolesterol grubu  $159,2\pm 44,5$ , kolesterol+vitamin E grubu  $108,9\pm 47,1$  olarak bulundu. Kolesterol grubu, kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı, yaklaşık 1,5 kat bir artış olduğu ve artışın vitamin E grubu verilen grupta azaldığı görüldü ( $p<0.05$ ) (Şekil 6.4).



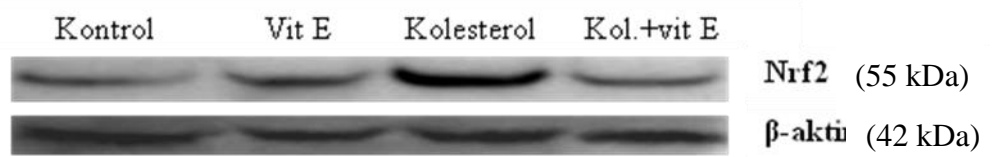
**Resim 6.5.** Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta Grp78 protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü.



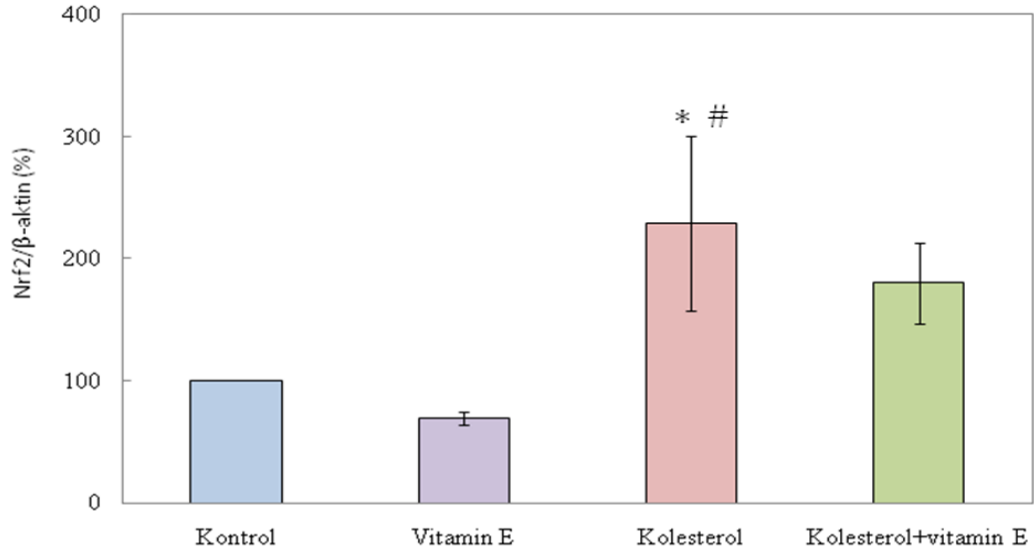
**Şekil 6.4.** Torasik aortada Grp78 protein ekspresyonu. Kolesterol grubu kontrol grubu ile, vitamin E grubu ve kolesterol+vitamin E grubu kolesterol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu \* $p < 0.05$  vs kontrol, # $p < 0.05$  vs kolesterol, (n=3).

### 6.8. Aorta Dokusunda Nrf2 Protein Ekspresyonu

Kolesterol ve Vitamin E'nin Nrf2 ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla torasik aorta örneklerinden hazırlanan total protein homojenatlarından Nrf2 protein ekspresyonu  $\beta$ -aktine'e göre normalize edilerek immunblotlama yöntemi ile analiz edildi (Resim 6.6). Kontrol grubu ekspresyonu % 100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde, vitamin E grubu  $69,4 \pm 5,5$ , kolesterol grubu  $228,3 \pm 71,4$ , kolesterol+vitamin E grubu  $179,8 \pm 32,9$  olarak bulundu. Kolesterol grubunda Nrf2 protein ekspresyonunun, kontrol ve vitamin E grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı arttığı görüldü ( $p < 0.05$ ) (Şekil 6.5).



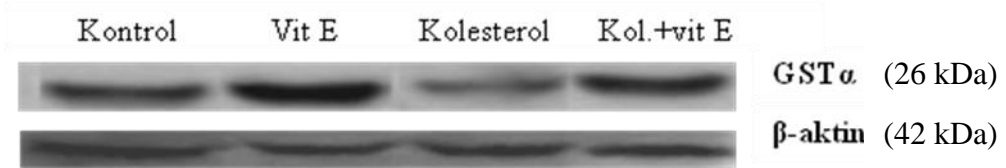
**Resim 6.6.** Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta Nrf2 protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü.



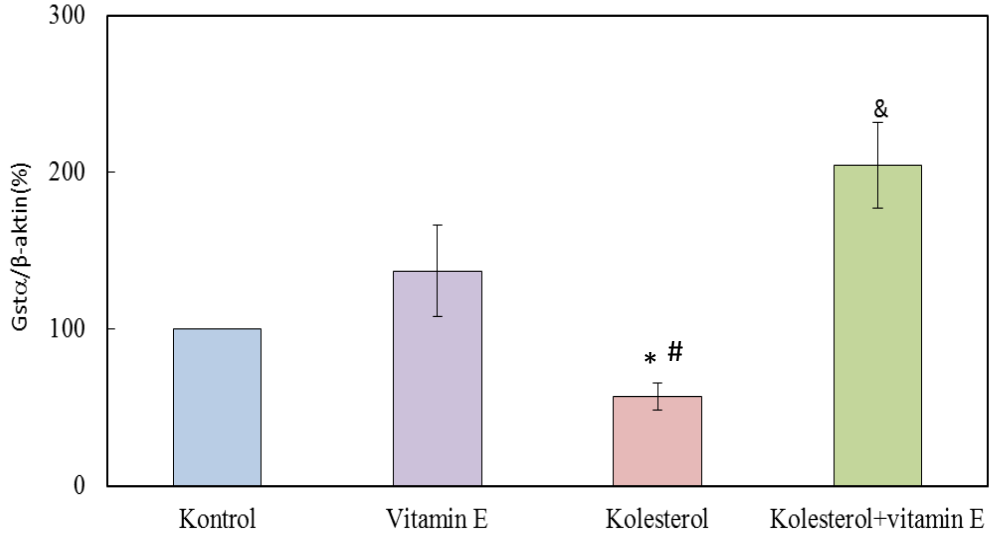
**Şekil 6.5.** Torasik aortada Nrf2 protein ekspresyonu. Kolesterol grubu, kontrol grubu ve vitamin E grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. \* $p < 0.05$  vs kontrol, # $p < 0.05$  vs vitamin E, (n=3).

### 6.9. Aorta Dokusunda GSTα Protein Ekspresyonu

Kolesterol ve vitamin E'nin GSTα ekspresyonu üzerindeki etkisini incelemek amacıyla torasik aorta örneklerinden hazırlanan total protein homojenatlarında GSTα protein ekspresyonu β-aktine'e göre normalize edilerek analiz edildi (Resim 6.7). Kontrol grubu ekspresyonu % 100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde, vitamin E grubu  $137,1 \pm 29,2$ , kolesterol grubu  $57,1 \pm 8,8$  kolesterol+vitamin E grubu  $204,4 \pm 27,5$  olarak bulundu. GSTα protein ekspresyonunun kolesterol grubunda kontrol ve vitamin E grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde düştüğü, vitamin E verilemeyen gruplarda ise arttığı görüldü ( $p < 0.05$ ) (Şekil 6.6).



**Resim 6.7.** Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta GSTα protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü.



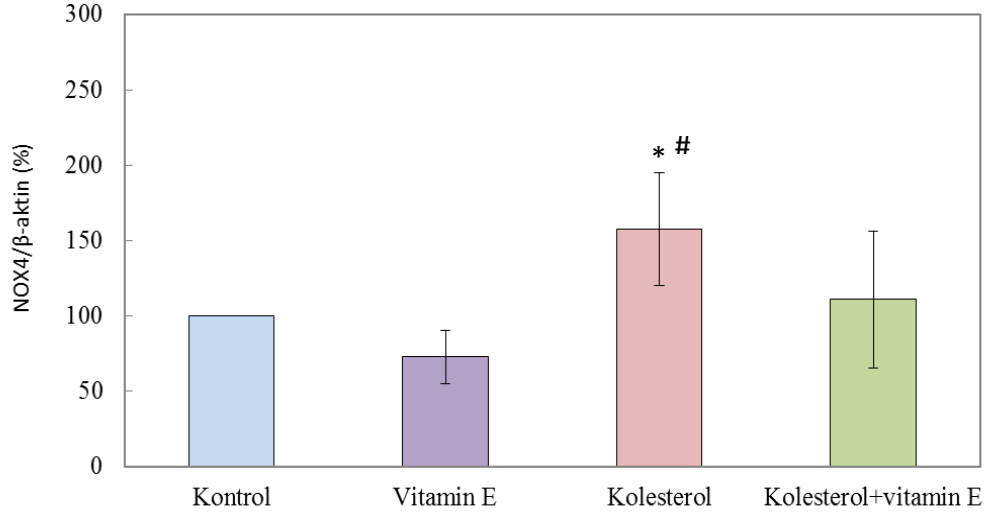
**Şekil 6.6.** Torasik aortada GSTα protein ekspresyonu. Kolesterol grubu kontrol ve vitamin E grubu ile ve kolesterol+vitamin E grubu ile kolesterol grubu kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. \* $p < 0.05$  vs kontrol, # $p < 0.05$  vs vitamin E, & $p < 0.05$  vs kolesterol (n=3).

#### 6.10. Aorta Dokusunda NOX4 Protein Ekspresyonu

Torasik aorta örneklerinden hazırlanan total protein homojenatlarından NOX4 protein ekspresyonu immunblotlama yöntemi ile analiz edildi ve β-aktin ekspresyonuna göre normalize edildi (Resim 6.8). Kontrol grubu ekspresyonu % 100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde, vitamin E grubu  $72,7 \pm 17,8$ , kolesterol grubu  $157,4 \pm 37,5$  kolesterol+vitamin E grubu  $110,8 \pm 46,6$  olarak bulundu. Kolesterol grubu NOX4 ekspresyonunu, kontrol ve vitamin E grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark olduğu bulundu ( $p < 0.05$ ) (Şekil 6.9).



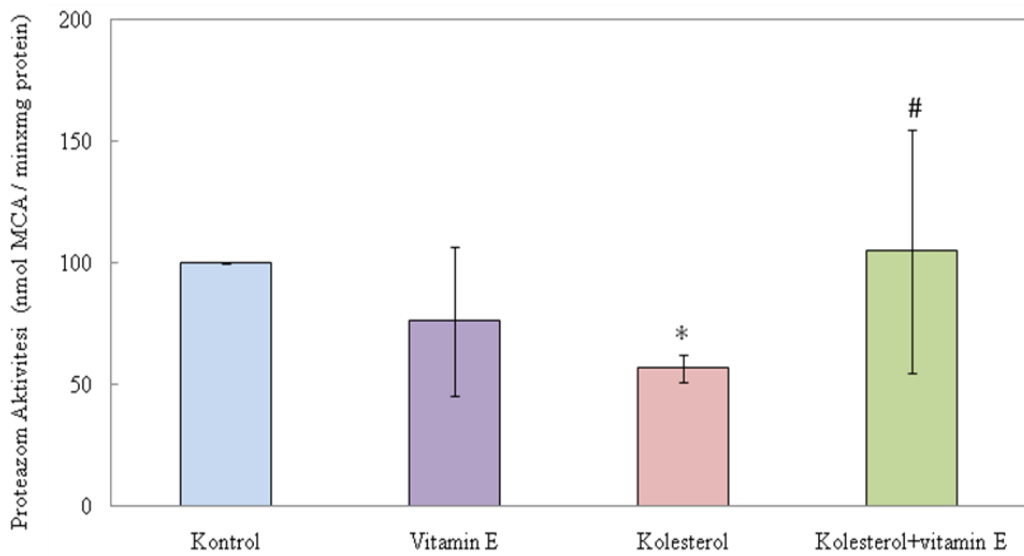
**Resim 6.8.** Örnek olarak her gruptan bir tavşana ait torasik aorta NOX4 protein ekspresyonunun X-Ray film üzerinde bandlarının görüntüsü.



**Şekil 6.7.** Torasik aortada NOX4 protein ekspresyonu. Kolesterol grubu kontrol grubu ve vitamin E grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. \* $p < 0.05$  vs kontrol, # $p < 0.05$  vs kolesterol, (n=3).

### 6.11 Aorta Dokusunda Proteazom Aktivitesi

Torasik aorta örneklerinden hazırlanan total protein homojenatlarından flurojenik metot ile proteazom aktivitesi tayin edildi. Kontrol grubu ekspresyonu %100 kabul edilerek diğer gruplar değerlendirildiğinde, vitamin E grubu  $76,2 \pm 30,7$ , kolesterol grubu  $56,8 \pm 5,6$ , kolesterol+vitamin E grubu  $104,9 \pm 50,1$  olarak bulundu. Kontrol grubuna kıyasla kolesterol grubunda proteazomal aktivitenin düştüğü ve bu azalmanın kolesterol+vitamin E grubunda arttığı istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Şekil 6.8).



**Şekil 6.8.** Torasik aortada proteazom aktivitesi. Kolesterol grubu kontrol grubu ile ve kolesterol+vitamin E grubu kolesterol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. \* $p < 0.05$  vs kontrol, # $p < 0.05$  vs kolesterol, (n=3).

## 7. TARTIŞMA-SONUÇ

Ateroskleroz ve komplikasyonları dünyada en önde gelen ölüm sebepleri arasındadır. Ateroskleroz, lipitten zengin makrofajlar, VSMC, yağlar ve ECM birikimi ile karakterize edilen proinflamatuvar bir hastalıktır (Libby, 2002; Lusic, 2000; Shah, 2002). Genetik ve çevresel koşulların yanında, ateroskleroza oluşumuna neden olan en önemli faktörler serum kolesterol düzeylerindeki artış ve okside LDL oluşumu olarak görülmektedir (Christopher ve Joseph, 2001). Yüksek kolesterol içeren diyet, hücreler olarak birçok değişikliğe sebep olabilir. Bu değişiklikler hücreler arası matriks miktarının artması, düz kas hücrelerinin çoğalması ve bu hücrelerde bulunan bazı enzim aktivitelerindeki değişiklikleri kapsar. Bunun yanında, yapılan birçok çalışma okside LDL' nin yükselen değerlerinin aterosklerozun gelişmesinden sorumlu en önemli faktör olduğunu göstermektedir. Ayrıca okside LDL oluşumunun reaktif oksijen türleri ve dolayısıyla oksidatif stres oluşumunu indüklediği düşünülmektedir (Carmeli ve ark., 2008). Oksidatif hasar birçok sinyal yolağını düzenlemesi ve inflamasyondaki rolü açısından kardiyovasküler risk faktörleri arasında hastalığın gelişimini tetikleyen önemli mekanizmalar arasındadır (Vogiatzi ve ark., 2009). Bunun yanında yapılan birçok klinik, epidemiyolojik ve hayvan çalışmaları vitamin E'nin ateroskleroz gelişiminde koruyucu etkiye sahip olduğu göstermiştir (Ozer ve ark., 2006; Munteanu ve Zingg 2007; Dietrich ve ark., 2009; Bozaykut ve ark., 2014; Sozen ve ark., 2014).

Önceki çalışmalarımız ile tavşanlarda deneysel olarak 4 hafta boyunca %2 kolesterol içeren diyet ile beslenmenin, histolojik ve biyokimyasal olarak aterosklerotik lezyonları oluşturulabildiği histolojik olarak gösterilmiştir. (Ozer ve ark., 1998; Ozer ve ark., 2006; Bozaykut ve ark., 2014). Bu çalışmamızda yüksek kolesterol diyeti ile oluşturan ateroskleroz modelinde ileri redoks sinyal yolaklarının ve bu redoks yolaklarının endoplazmik retikulum stresi üzerindeki etkilerinin incelenmesi planlandı. Bu amaçla ER stres belirteçleri fosfo IRE, fosfo PERK, Grp94, Grp78 ve redoks sinyal yolakları ile ilişkili NOX4, Nrf2 ve GSTα ekspresyonları ve bunlara ilaveten proteazom aktivitesi aorta dokusunda kontrol grubu ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirildi, kolesterolün ve vitamin E' nin bu ekspresyonlar üzerindeki etkisi araştırıldı. Araştırmamızda, 8 hafta süre ile bir grup

tavşana %2 kolesterol içeren yem, bir gruba sadece vitamin E ve diğer bir gruba ise kolesterol diyetine ek olarak vitamin E verildi. Deney sonunda tavşanların serum kolesterol düzeylerinin yaklaşık 40 kat kadar arttığı, oluşturulan hiperkolesteroleminin damarlarda aterosklerotik lezyonlar oluşturduğu gösterildi. Kolesterol verilen grupta yükselen serum kolesterol düzeyleri ve aterosklerotik lezyonlarının oluşumu, 8 haftalık süre ile yüksek kolesterol diyetinin ateroskleroz modelini oluşturabildiğini göstermektedir.

Işık mikroskopisi ile yapılan çalışmalarda elde edilen bulgular şu şekildedir: 8 hafta boyunca yüksek kolesterol diyeti ile beslenen grupta endotel tabakasının bütünlüğünün bozulduğu ve intima tabakasında belirgin bir kalınlaşma olduğu bulundu. Bu bölgelerde lipit birikimi ile köpük hücre kümelerinin olduğu ve düz kas hücreleri arasında yer yer lipit damlacıklarının bulunduğu gözlemlendi. Kolesterol+vitamin E grubu, kolesterol grubu ile kıyaslandığında damar yapısında intimal kalınlaşmanın minimal olduğu, intima ve media tabakasında köpük hücrelerin seviyesinin azaldığı, media tabakasında elastik liflerin yapısının ise normal olduğu görüldü. Kontrol grubu ve sadece vitamin E verilen gruplarda ise herhangi bir oluşum gözlenmedi. Elde edilen bulgular, 8 hafta süre boyunca yüksek kolesterol içeren diyetin aterosklerotik lezyon gelişiminde önemli rol oynadığını, vitamin E' nin ise lezyon gelişimine karşı koruyucu etkisinin olduğu histolojik açıdan göstermiştir.

ER fonksiyonu, çeşitli yollar ile ateroskleroz gelişimini etkileyebilir. Bunlardan birincisi, ER' de birçok önemli lipojenik yollar bulunmasından ötürü lipit metabolizması ve UPR arasında direk bir ilişki olmasıdır (Gregor ve Hotamisligil, 2007). Örneğin, XBP1 ER' de fosfotilkolin sentezinde rol oynamaktadır (Sriburi, 2004). Yapılan çalışmalar da ER stresin lipogenez ve hepatik lipit birikimine neden olduğunu göstermiştir (Ozcan, 2004; Lee ve ark., 2008). ER stresin diğer bir etkisi, anormal insulin aksiyonu ve insulin direnci ile hiperglisemiye neden olmasıdır. Metabolik açıdan bakıldığında, hiperglisemi obezite, tip 2 diabetes ve ateroskleroz arasında bir köprü görevi görmektedir (Ozcan, 2004; Gregor ve Hotamisligil, 2007). ER stresi ayrıca inflamatuvar faktörlerin ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile de ilişkilendirilmiştir. Hiperkolesterolemi gibi oksidatif stres koşullarına yol açan faktörler de ER strese sebep olabilir ve bu durumda daha ileri redoks potansiyeli ve inflamasyon oluşabilir. Tüm bu bilgiler, çalışmamızın sonucu

ile ilişkili olmakla beraber, yüksek kolesterol diyeti ile hücrelerde stres koşullarının arttığı ve bunun bir sonucu olarak ER stres düzeylerinin artmasıyla ER stresin ateroskleroz gelişiminde rolü olduğunu göstermektedir. Yapılan çalışmada, ER stres belirteçleri olarak bilinen fosfo IRE-1 ve fosfo PERK ve bunun yanında ER şaperonları Grp94 ve Grp78 ekspresyonlarının kolesterol grubunda kontrole grubuna göre anlamlı bir şekilde artmaktadır ( $p<0.05$ ). Fosfo PERK, Grp94 ve Grp78 ekspresyonlarında görülen bu artış ise kolesterol+vitamin E grubunda kolesterol grubuna göre kıyaslandığında anlamlı bir şekilde azalmaktadır ( $p<0.05$ ). Bu sonuçlar, yüksek kolesterol içeren diyetin ER stres düzeylerini arttırdığını ve vitamin E' nin ise bu süreçte ER stres düzeylerini, ER stres yanıtının ana proteinleri üzerinden normal seviyesine getirebileceğini göstermiştir.

NOX enzimleri vasküler hücreler ve kan damarları ile ilişkili bağışıklık hücrelerinde ROT oluşumundan sorumlu bir enzim sınıfıdır. NOX aracılığı ile oluşan ROT, vasküler homeostazının sağlanmasında önemlidir. NOX aktivitesindeki artışın ayrıca oksidatif stresi indüklediği bilmektedir. Daha önce yapılan bir çalışmamızda, yüksek kolesterol ile beslenen tavşanların aorta dokularında artmış oksidatif stres düzeyleri süperoksit radikali seviyelerindeki artış ile gösterilmiştir (Bozaykut ve ark., 2014). Bu çalışmada ise NOX4 enziminin protein düzeyleri ölçüldü ve kolesterol grubunda yaklaşık 1,5 kat artış bulundu ( $p<0.05$ ). Bu sonuç önceki çalışmamızla paralel bir şekilde NOX4 ekspresyonunun yükselmesinin artan oksidatif stres ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Buna ek olarak başka çalışmalar, NADPH oksidazların aterosklerozdaki farklı rollerini göstermiştir. NOX enzimlerinin, lezyonlarda makrofaj tutulmasında önemli rolü olduğunu ve CD36 sinyal yolağı ile oluşan okside LDL tarafından oluşturulan makrofaj fonksiyonundaki değişimlerin, ROT bağımlı fosfat inaktivasyonu ile sağlandığı gösterilmiştir (Park ve ark., 2009). p22phox ekspresyonlarındaki artışın ise arteriyal lezyonların büyümesi ve MMP aktivasyonunda artışa sebep olduğu görülmüştür (Khatri ve ark., 2004). Yapılan başka bir çalışma ise Nrf2 ekspresyonundaki artışın NOX4 ekspresyonunda artışa sebep olduğunu göstermiştir (Kovac ve ark., 2015). Bunun yanında, fare kalplerinde NOX4 overekspresyonu ile Nrf2 yolağının aktive olduğu bulunmuştur (Brewer ve ark., 2011). Bu bilgiler ışığında, NOX4 ekspresyonunun Nrf2 aktivasyonu ile karşılıklı bir ilişkisi olduğu görülmektedir.

Nrf2 transkripsiyon faktörünün ise ateroskleroz gelişiminde farklı etkileri bulunmaktadır. Nrf2, CD36 çöpçü reseptörünün ekspresyonunu arttırarak aterojenik özellik göstermekle beraber GST, HO-1, NQO1 gibi antioksidan proteinlerin ekspresyonunu düzenleyerek hücrenin redoks kapasitesinin azaltmaktadır. Nrf2 proteini oksidatif ve ER stresi artışı veya NOX aktivasyonu gibi hücrenin stres kapasitesini arttıran koşullarda aktive olmaktadır (Demasi, 2012). Çalışmamızın sonuçları, bu bilgilere uyum sağlayarak kolesterol verilen tavşanlarda kontrollere oranla Nrf2 protein ekspresyonunun anlamlı bir şekilde arttığını ( $p<0.05$ ) göstermektedir. Nrf2 ekspresyonundaki bu artış daha önceki çalışmamızda gösterilen CD36 ekspresyonu artışı (Ozer ve ark., 2006) ile ilişki olarak, CD36 yolağı ile indüklenebilceğini göstermektedir. Bunun yanında bu çalışmamızda gösterilen artan ER stresi, PERK bağımlı fosforilasyon ile Nrf2 aktivasyonuna neden olmuş olabilir. Daha önceki çalışmamızda, hiperkolesterolemik diyetin oksidatif stres düzeylerini arttırması ile oksidatif stresin Nrf2 aktivasyonu üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Bu çalışmamızda ek olarak, kolesterol grubunda gözlenen NOX4 ekspresyonlardaki artış ile hücredeki redoks potansiyelinin arttığının ve bunun da Nrf2 protein ekspresyonlarında artışa sebep olabileceğini gösterilmiştir.

Proteazomal sistem, hatalı veya yanlış katlanmış proteinlerin yıkımını sağladığından proteazom aktivitesinde herhangi bir bozulma olması aterosklerotik plaklarda protein agregatlarının oluşumuna neden olur ve ateroskleroz gelişimindeki rolü kritiktir. Proteazomal sistem, vasküler hücre patobiyolojisini direkt olarak hastalıkla ilişkili apoptoz, proliferasyon ve farklılaşma gibi süreçleri etkileyerek veya dolaylı olarak hücresel yanıtları veya ER stres, inflamasyon ve redoks dengesini etkileyerek rol oynar (Tabas ve Ron, 2011). Lipit metabolizması açısından ise proteazom inhibitörlerinin ters kolesterol taşınımı ABCA1 üzerinden inhibe ettiği gösterilmiştir (Ogura ve ark., 2011). Ancak artan oksidatif veya ER stresi gibi durumlarda proteazomal sistemin aktivitesi bozulabilir. Bu bilgiler ile doğru orantılı bir şekilde yüksek kolesterol diyeti ile oluşturan ateroskleroz modelimizde, artan oksidatif ve ER stresine yanıt olarak, proteazom aktivitesi kolesterol grubunda anlamlı bir şekilde düştüğü ve kolesterol+vitamin E grubunda ise bu düşüş kolesterol grubuna göre anlamlı bir şekilde yükseldiği bulundu ( $p<0.05$ ). Nrf2 proteini stres koşulları altında aktive olarak proteazom alt ünitelerinin ekspresyonu düzenlemektedir (Kwak ve ark., 2003). Bunun yanında 26S proteazom bazal

koşullarda Nrf2 degradasyonunu sağlayarak Nrf2 seviyesinin düşük kalmasını neden olur (Chapple ve ark., 2012). Bulduğumuz sonuçlar bu bilgiler ile bağlantılı olmakla beraber, proteazom aktivitesi ve Nrf2 ekspresyonu arasında ters ilişki bulunmaktadır. Kolesterol grubunda gözlenen proteazom aktivitesindeki azalma ile Nrf2 proteininin degradasyonunu engellemesinin sonucu olarak Nrf2 yüksek protein ekspresyonu arasında bağlantı bulunmaktadır.

Grubumuzun daha önceki çalışmaları ile vitamin E'nin antioksidan özelliğine ek olarak sinyal yollarını etkilediğini göstermiştir (Sirikci ve ark.,1996; Ozer ve ark., 1998; Ozer ve ark., 2006; Bozaykut ve ark., 2014; Sozen ve ark., 2014). Kolesterol ile beslenen tavşanlarda aterosklerotik lezyonların gelişiminin vitamin E ile önlediğini, hiperkolesteroleminin aorta düz kas hücrelerinde protein kinaz C' nin aktivitesini 2 kat arttırdığını, vitamin E'nin ise bunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Sirikci ve ark.,1996). Özer ve beraberindekiler (Ozer ve ark., 1998) *in vivo* sistemde  $\alpha$ -tokoferolün PKC aktivitesini baskıladığını, bir antioksidan olan probukolun ise PKC aktivitesini baskılamada etkili olmadığını göstermişlerdir. Bu bulgular  $\alpha$ -tokoferolün ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu etkisinin antioksidan özelliğine bağlı olmayacağını belirtmektedir. Buna ek olarak, yüksek kolesterol diyeti ile beslenen tavşanlarda CD36 mRNA ekspresyonunun arttığını ve vitamin E'nin bunu baskıladığı gösterilmiştir (Ozer et al 2006). Grubumuzun başka bir çalışması ise Vitamin E'nin PPAR $\gamma$  ve ABCA1 ekspresyonlarının arttırması ile makrafajlardan kolesterol akışını sağlayarak ateroskleroz sürecinde koruyucu bir rol üstlenmiş olabileceğini göstermiştir (Bozaykut ve ark., 2014). Bunun yanı sıra aterogenez sürecindeki inflamatuvar etkileri bulan ve ateroskleroz oluşumuna katkıda bulunan MMP-1 ekspresyonun ise vitamin E verilen grupta azalması da, vitamin E'nin bir başka etkisini göstermektedir. Bu çalışmamızda ise vitamin E'nin ER stres üzerindeki koruyucu etkileri araştırıldı ve kolesterol ile artan ER stres yanıtının, kolesterol+vitamin E grubunda ER stres belirteçleri fosfo PERK, Grp94 ve Grp78 ekspresyonları düşürerek rol oynadığı bulundu ( $p<0.05$ ). Buna ek olarak artan oksidatif stres ile bağlantılı olarak artan NOX4 ekspresyonun ise kolesterol+vitamin E grubunda azaldığı görüldü. Kolesterol diyeti ile bozulan proteazom aktivitesinin ise kolesterol diyetin ek olarak verilen vitamin E ile arttığı ( $p<0.05$ ) görüldü. Antioksidan bir protein olan GST $\alpha$  protein ekspresyonunun ise vitamin E verilen gruplarda anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ( $p<0.05$ ).

Sonuç olarak bu çalışmada, yüksek kolesterol diyeti ile indüklenen ateroskleroz gelişimi ve patogenezinde ER stres belirteçleri fosfo IRE-1, fosfo PERK, Grp94 ve Grp78'in, buna ek olarak redoks sinyal yolları ile ilişkili NOX4, Nrf2 ve proteazom yollarının önemli görevleri olduğu ve birbirleri ile ilişkileri gösterilmiştir. Bu süreçte vitamin E'nin antioksidan özelliklerinin dışında, ER stres ve oksidatif mekanizmalara ek olarak proteazomal degradasyonu gibi çeşitli sinyal iletim yolları ve gen ekspresyonları etkileyerek rol oynadığı düşünülmektedir.

## 8. KAYNAKLAR

Alexander MR, Owens GK. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu Rev Physiol.* 2012; 74:13–40.

Allahverdian S, Chehroudi AC, McManus BM, Abraham T, Francis GA. Contribution of intimal smooth muscle cells to cholesterol accumulation and macrophage-like cells in human atherosclerosis. *Circulation;* 2014;129:1551–1559.

Atkins GB, DI Simon. Interplay between NF- $\kappa$ B and Kruppel-like factors in vascular inflammation and atherosclerosis: location, location, location. *J Am Heart Assoc.* 2013; 2:e000290.

Atkins GB, Wang Y, Mahabeleshwar GH, Shi H, Gao H, Kawanami D, Natesan V, Lin Z, Simon DI, Jain MK. Hemizygous deficiency of Kruppel-like factor 2 augments experimental atherosclerosis. *Circ Res.* 2008; 103:690–693.

Azzi A, Gysin R, Kempna P, Munteanu A, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM. Regulation of gene expression by alpha-tocopherol. *Biol Chem.* 2004; 385(7): 585-91.

Azzi A, Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res.* 2000; 39(3): 231-55.

Bae YS, Lee JH, Choi SH, Kim S, Almazan F, Witztum JL, Miller YI. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized low-density lipoprotein: tolllike receptor 4- and spleen tyrosine kinase-dependent activation of NADPH oxidase 2. *Circ Res.* 2009; 104(2):210–218.

Barella L, Muller PY, Schlachter M, Hunziker W, Stocklin E, Spitzer V, Meier N, de Pascual-Teresa S, Minihane AM, Rimbach G. Identification of hepatic molecular mechanisms of action of alpha-tocopherol using global gene expression profile analysis in rats. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1689(1): 66-74.

Basseri S, Austin RC. Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. *Biochem Res Int.* 2012; 2012: 841362.

Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007; 87(1):245–313.

Bozaykut P, Karademir B, Ozer NK. Regulation of protein turnover by heat shock proteins. *Free Radic Biol Med.* 2014; 77C:195-209.

Bozaykut P, Karademir B, Yazgan B, Sozen E, Siow RC, Mann GE, Ozer NK. Effects of vitamin E on peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 in hypercholesterolemia induced atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2014; 70: 174–181.

Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(5):687–706

Brewer AC, Murray TV, Arno M, Zhang M, Anilkumar NP, Mann GE, Shah AM. Nox4 regulates Nrf2 and glutathione redox in cardiomyocytes in vivo. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51(1):205-15.

Bu DX, Tarrio M, Grabie N, Zhang Y, Yamazaki H, Stavrakis G, Maganto-Garcia E, Pepper-Cunningham Z, Jarolim P, Aikawa M, et al. Statin-induced Kruppel-like factor 2 expression in human and mouse T cells reduces inflammatory and pathogenic responses. *J Clin Invest*. 2010; 120:1961–1970.

Carlson JA, Rogers B, Sifers RN., Finegold MJ, Clift SM, DeMayo FJ. Accumulation of PiZ alpha 1-antitrypsin causes liver damage in transgenic mice. *J Clin Invest*. 1989; 83(4), 1183–1190.

Carmeli E, Harpaz Y, Kogan NN, Fogelman Y. The effect of an endogenous antioxidant glabridin on oxidized LDL. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2008; 19(1): 49-63.

Chapple SJ, Siow CMR, Mann GE. Crosstalk between Nrf2 and the proteasome: Therapeutic potential of Nrf2 inducers in vascular disease and aging. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012; 44: 1315–1320.

Chapple SJ, Xinghua C, Mann GE. Effects of 4-hydroxynonenal on vascular endothelial and smooth muscle cell redox signaling and function in health and disease. *Redox Biol*. 2013; (1): 319–331.

Christopher C, Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart. *Circ Res*. 2007, 101: 975-984.

Civelek M, Manduchi E, Riley RJ, Stoeckert Jr CJ, Davies PF. Chronic endoplasmic reticulum stress activates unfolded protein response in arterial endothelium in regions of susceptibility to atherosclerosis. *Circ Res*. 2009;105:453–461.

Cullinan SB, Zhang D, Hannink M, Arvisais E, Kaufman RJ, Diehl JA. Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Mol Cell Biol*. 2003; 23(20), 7198–7209.

Cybulsky MI, Won D, Haidari M. Leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions. *Can J Cardiol.* 2004; 20(Suppl B):24B.

Dale DC, Boxer L, Liles WC. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*; 2008; 112(4):935–945.

Das H, Kumar A, Lin Z, Patino WD, Hwang PM, Feinberg MW, Majumder PK, Jain MK. Kruppel-like factor 2 (KLF2) regulates proinflammatory activation of monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:6653–6658.

Devaraj S, Jialal I.  $\alpha$ -Tocopherol decreases interleukin-1 $\beta$  release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:1125–1133.

Devaraj S, Hugou I, Jialal I. Alpha-tocopherol decreases CD36 expression in human monocyte-derived macrophages. *J Lipid Res.* 2001; 42(4): 521-7.

Dikalov SI, Dikalova AE, Bikineyeva AT, Schmidt HH, Harrison DG, Griendling KK. Distinct roles of Nox1 and Nox4 in basal and angiotensin II-stimulated superoxide and hydrogen peroxide production. *Free Radic Biol Med.* 2008; 45(9):1340–1351

Doherty TM, Asotra K, Fitzpatrick LA. Calcification in atherosclerosis: Bone biology and chronic inflammation at the arterial crossroads. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100:11201.

Dutta P, Courties G, Wei Y, Leuschner F, Gorbатов R, Robbins CS, Iwamoto Y, Thompson B, Carlson AL, Heidt T. Myocardial infarction accelerates atherosclerosis. *Nature*; 2012; 487:325–329.

Fang H, Lin J, Wang L, Xie P, Wang X, Fu J, Ai W, Chen S, Chen F, Zhang F. Kruppel-like factor 2 regulates dendritic cell activation in patients with acute coronary syndrome. *Cell Physiol Biochem.* 2013; 32:931–941.

Fessler MB, Parks JS. Intracellular lipid flux and membrane microdomains as organizing principles in inflammatory cell signaling. *J Immunol.* 2011; 187:1529–1535.

Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J.  $\alpha$ -Tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation*; 1996; 94:2434–2440.

Furukawa M, Xiong Y. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase. *Mol Cell Biol.* 2005; 25:162–171.

Gargalovic PS, Gharavi NM, Clark MJ, Pagnon J, Yang WP, He A, Truong A, Baruch-Oren T, Berliner JA, Kirchgessner TG, Lusis AJ. The unfolded protein response is an important regulator of inflammatory genes in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:2490–2496.

Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: A struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1370.

Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell.* 2001; 104:503–516.

Gotoh T, Endo M, Oike Y. Endoplasmic Reticulum Stress related inflammation and cardiovascular diseases. *International Journal of Inflammation.* 2011; 2011: 259462

Goya K, Sumitani S, Otsuki M. The thiazolidine-dione drug troglitazone up-regulates nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells. *J Diab Complicat,* 2006; 20:336–342.

Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *J Lipid Res.* 2007; 48:1905–1914.

Griendling KK. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart.* 2002; 90:491.

Grune T, Reinheckel T, Davies KJA. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J.* 1997; 11(7): 526-34.

Hajra L, Evans AI, Chen M, Hyduk SJ, Collins T, Cybulsky MI. The NF-kappa B signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:9052–9057.

Haka AS, Grosheva I, Chiang E, Buxbaum AR, Baird BA, Pierini LM, Maxfield FR. Macrophages create an acidic extracellular hydrolytic compartment to digest aggregated lipoproteins. *Mol Biol Cell.* 2009; 20:4932–4940.

Han D, Lerner AG, Vande WL, Upton JP, Xu W, Hagen A, Backes BJ, Oakes SA, Papa FR. IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell.* 2009; 138:562–575.

Hansson GK, Chao S, Schwartz SM, Reidy MA. Aortic endothelial cell death and replication in normal and lipopolysaccharide-treated rats. *Am J Pathol.* 1985; 121:123–127.

Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000; 5(5), 897–904.

Herrmann J, Soares SM, Lerman LO, Lerman A. Potential role of the ubiquitin proteasome system in atherosclerosis: aspects of a protein quality disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51(21): 2003-2010.

Hitomi J, Katayama T, Eguchi Y, Kud T, Taniguchi M, Koyama Y. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Abeta-induced cell death. *J Cell Biol*. 2004; 165(3), 347–356.

Honarbakhsh S, Schachter M. Vitamins and cardiovascular disease. *British Journal of Nutrition*; 2009; 101:1113–1131.

Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med*. 2010; 16:396–399.

Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med*. 2009; 30(4): 191-296.

Kakiuchi C, Iwamoto K, Ishiwata M, Bundo M, Kasahara T, Kusumi I. Impaired feedback regulation of XBP1 as a genetic risk factor for bipolar disorder. *Nat Genet*. 2003; 35(2), 171–175.

Kanters E, Pasparakis M, Gijbels MJ, Vergouwe MN, Partouns-Hendriks I, Fijneman RJ, Clausen BE, Forster I, Kockx MM, Rajewsky K, et al. Inhibition of NF-kappaB activation in macrophages increases atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest*. 2003; 112:1176–1185.

Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*. 2002;110:1389–1398.

Keaney JF Jr, Gaziano JM, Xu A. Dietary antioxidants preserve endothelium-dependent vessel relaxation in cholesterol-fed rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:11880–11884.

Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1–Nrf2–ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2007; 47:89–116.

Khatri JJ, Johnson C, Magid R, Lessner SM, Laude KM, Dikalov SI, Harrison DG, Sung HJ, Rong Y, Galis ZS. Vascular oxidant stress enhances progression and angiogenesis of experimental atheroma. *Circulation*; 2004; 109(4):520–525.

Kima J, Chad JN, Surh YJ. A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutation Research*; 2010; 690: 12–23.

Kobayashi A, Kang MI, Okawa H, Ohtsuji M, Zenke Y, Chiba T, Igarashi K, Yamamoto M. Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol*. 2004; 24:7130–7139.

Koo A, CF Dewey Jr, and G Garcia-Cardena. Hemodynamic shear stress characteristic of atherosclerosis-resistant regions promotes glycocalyx formation in cultured endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013; 304:C137–C146.

Kovac S, Angelova PR, Holmström KM, Zhang Y, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1850(4):794-801.

Kozutsumi Y, Segal M, Normington K., Gething MJ, Sambrook J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature*; 1998; 332(6163), 462–464.

Kuhn JD, Orłowski ZR, Bjorklund CC. Second generation proteasome inhibitors: carfilzomib and immunoproteasome-specific inhibitors (IPSIs). *Curr Cancer Drug Targets*. 2011;11:285–295.

Kwak MK, Wakabayashi N, Greenlaw JL, Yamamoto M, Kensler TW. Antioxidants enhance mammalian proteasome expression through the Keap1-Nrf2 signaling pathway. *Mol Cell Biol*. 2003; 23: 8786–8794.

Lee AH, Glimcher LH. Intersection of the unfolded protein response and hepatic lipid metabolism. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66:2835–2850.

Lee AH, Scapa EF, Cohen DE, Glimcher LH. Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*; 2008; 320:1492–1496

Levonen AL, Inkala M, Heikura T, Jauhiainen S, Jyrkkanen HK, Kansanen E, Maatta K, Romppanen E, Turunen P, Rutanen J, Yla-Herttuala S. Nrf2 gene transfer induces antioxidant enzymes and suppresses smooth muscle cell growth in vitro and reduces oxidative stress in rabbit aorta in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007; 27:741–747.

Li D, Saldeen T, Romeo F. Oxidized LDL up-regulates angiotensin II type receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Circulation*; 2000;102:1970–1976.

Libby P, Bonow RO, Mann DL, Zipes DP. (Eds), Braunwald's Heart Disease; 8th Edition. 2007;. p. 987-89.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*; 2011; 473(7347):317-25.

Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherothrombosis: From population biology and bench research to clinical practice. *J Am Coll Cardiol*. 2006; 48:A33.

Lin JH, Li H, Yasumura D, Cohen HR, Zhang C, Panning B, Shokat KM, Lavail MM, Walter P. IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*; 2007; 318:944–949.

Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*. 2003; 14:469.

Liu XM, Peyton KJ, Ensenat D, Wang H, Schafer AI, Alam J. Endoplasmic reticulum stress stimulates heme oxygenase-1 gene expression in vascular smooth muscle: Role in cell survival. *J. Biol. Chem*. 2004; 280(2), 872–877.

Lukacs GL, Mohamed A, Kartner N, Chang X B, Riordan J.R, & Grinstein S. Conformational maturation of CFTR but not its mutant counterpart (delta F508) occurs in the endoplasmic reticulum and requires ATP. *EMBO J*. 1994; 13(24), 6076–6086.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*; 2000; 407:233– 41.

Ma K, Vatter KM, Wek RC. Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem*. 2002; 277(21), 18728–18735.

Manabe I, Nagai R. Regulation of smooth muscle phenotype. *Curr Atheroscler Rep*. 2003; 5:214.

Mardones P, Rigotti A. Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in alpha-tocopherol metabolism and potential implications for disease. *J Nutr Biochem*. 2004; 15(5): 252-60.

McAlpine CS, Bowes AJ, Werstuck GH. Diabetes, Hyperglycemia and Accelerated Atherosclerosis: Evidence Supporting a Role for Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Signaling. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2010; 10(2):151-7.

McGill HC, Jr, JC Geer, and RL Holman. Sites of vascular vulnerability in dogs demonstrated by Evans blue. *AMA Arch Pathol*. 1957; 64:303–311.

Miller YI, Chang MK, Binder CJ, et al. Oxidized low density lipoprotein and innate immune receptors. *Curr Opin Lipidol*. 2003; 2;(14):437.

Minuz P, Fava C, Lechi A. Lipid peroxidation, isoprostanes and vascular damage. *Pharmacol Rep.* 2006; 58:57–68.

Mullick AE, K Soldau, WB Kiosses, TA Bell III, PS Tobias, and LK Curtiss. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med.* 2008; 205:373–383.

Mulvihill ER, Jaeger J, Sengupta R. Atherosclerotic plaque smooth muscle cells have a distinct phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24:1283.

Munteanu A, Taddei M, Tamburini I, Bergamini E, Azzi A, Zingg JM. Antagonistic Effects of Oxidized Low Density Lipoprotein and  $\alpha$ -Tocopherol on CD36 Scavenger Receptor Expression in Monocytes. *J Biol Chem.* 2006; 281(10): 6489-97

Murohara T, Ikeda H, Katoh A. Vitamin E inhibits lysophosphatidylcholine induced endothelial dysfunction and platelet activation. *Antioxid Redox Signal.* 2002; 4:791–798.

Murphy PA, RO Hynes. Alternative splicing of endothelial fibronectin is induced by disturbed hemodynamics and protects against hemorrhage of the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014; 34:2042–2050.

Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation*; 2007;116:1226–1233.

Ogura M, Ayaori M, Terao Y, Hisada T, Iizuka M, Takiguchi S et al. Proteasomal inhibition promotes ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 expression and cholesterol efflux from macrophages in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31:1980–1987.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*; 2004; 306(5695), 457–461.

Ozer NK, Azzi A. Effect of vitamin E on the development of atherosclerosis. *Toxicology*; 2000; 148:179–85.

Ozer NK, Negis Y, Aytan N, Villacorta L, Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E inhibits CD36 scavenger receptor expression in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*; 2006; 184(1): 15–20.

Ozer NK, Palozza P, Boscoboinik D, et al. a-Tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein kinase C activity in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 1993; 322:307–310.

Ozer NK, Şirikçi O, Taha S, San T, Moser U, Azzi A. Effect of vitamin E and probucol on dietary cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24(2):226-33

Pabbisetty SK, W Rabacal, D Maseda, D Cendron, PL Collins, KL Hoek, VV Parekh, TM Aune, and E Sebzda. KLF2 is a rate-limiting transcription factor that can be targeted to enhance regulatory T-cell production. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111:9579–9584.

Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest.* 2009; 119(1):136–145.

Parmar VM, Schröder M. Sensing endoplasmic reticulum stress. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 738:153-68.

Paschen W. Endoplasmic reticulum: A primary target in various acute disorders and degenerative diseases of the brain. *Cell Calcium.* 2003; 34(4): 365–383.

Peled M, Fisher EA. Dynamic aspects of macrophage polarization during atherosclerosis progression and regression. *Front Immunol.* 2014; 5:579.

Poppek D, Grune T. Proteasomal defense of oxidative protein modifications. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8: 173–184.

Prasad K, Kalra J. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: Effect of vitamin E. *Am Heart J.* 1993; 125(4): 958-73.

Princen HM, van Poppel G, Vogelesang C. Supplementation with vitamin E but not b-carotene in vivo protects low density lipoprotein from lipid peroxidation in vitro: Effect of cigarette smoking. *Arterioscler Thromb.* 1992; 12:554–562.

Purdom-Dickinson SE, Lin Y, Dedek M, Morrissy S, Johnson J, Chen QM. Induction of antioxidant and detoxification response by oxidants in cardiomyocytes: evidence from gene expression profiling and activation of Nrf2 transcription factor. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42:159–176.

Reinheckel T, Sitte N, Ullrich O, Kuckelkorn U, Davies KJ, Grune T. Comparative resistance of the 20S and 26S proteasome to oxidative stress. *Biochem J.* 1998; 335, 637-42.

Reiter E, Jiang Q, Christen S. Anti-inflammatory properties of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol. *Mol Aspects Med.* 2007; 28(5-6): 668-91.

Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A. Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation*; 2000; 102(1): 82-7.

Rimbach G, Minihane AM, Majewicz J, Fischer A, Pallauf J, Virgli F, Weinberg PD. Regulation of cell signalling by vitamin E. *Proc Nutr Soc.* 2002; 61(4): 415-25.

Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, Gorbатов R, Sukhova GK, Gerhardt LM, Smyth D. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med.* 2013; 19:1166–1172.

Romero-Ramirez L, Cao H, Nelson D, Hammond E, Lee A H, Yoshida H, et al. XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Res.* 2004; 64(17), 5943–5947.

Ron D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. *J Clin Invest.* 2002;110:1383–1388.

Ross R. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340: 115–126.

Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, Horiuchi S. Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000; 11:503–509.

Schroder M, Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res.* 2005; 569(1–2), 29–63.

Schwartz SM, Heimark RL, Majesky MW. Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiol Rev.* 1990; 70(4):1177-209.

Shah PK, Galis ZS. Matrix metalloproteinase hypothesis of plaque rupture: players keep piling up but questions remain. *Circulation*; 2002; 104:1878 –80.

Singh U, Devaraj S. Vitamin E: Inflammation and Atherosclerosis. *Vitamins and Hormones*; 2007; 76: 519-549.

Sirikci O, Ozer NK, Azzi A. Dietary cholesterol-induced changes of protein kinase C and the effect of vitamin E in rabbit aortic smooth muscle cells, *Atherosclerosis*; 1996; 126:253–63.

Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from in vivo models and clinical studies. *Basic Res Cardiol.* 2011; 106:735–747.

Sozen E, Karademir B, Yazgan B, Bozaykut P, Ozer NK. Potential role of proteasome on c-jun related signaling in hypercholesterolemia induced atherosclerosis. *Redox Biol.* 2014; 2: 732–738.

Spann NJ, LX Garmire, JG McDonald, D. Myers, SB Milne, N Shibata, D Reichart, JN Fox, I Shaked, D Heudobler, et al. Regulated accumulation of desmosterol integrates macrophage lipid metabolism and inflammatory responses. *Cell*; 2012; 151:138–152.

Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW. Membrane biogenesis and the unfolded protein response. *J Cell Biol.* 2004; 167:35–41.

Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1381-478.

Sussan TE, Jun J, Thimmulappa R, Bedja D, Antero M. Disruption of Nrf2, a Key Inducer of Antioxidant Defenses, Attenuates ApoE-Mediated Atherosclerosis in Mice. *PLoS ONE*; 2008; 3(11).

Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science*; 2013; 339:166–172.

Tabas I, García-Cardeña G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol.* 2015; 209:1 13–2.

Tabas I, Williams KJ, Boren J. Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications. *Circulation*; 2007; 116:1832–1844.

Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol.* 2011; 13:184–190.

Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:36–46.

Tacke F, Alvarez D, Kaplan TJ. Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 2007; 117:185.

Takada K, Wang X, Hart GT, Odumade OA, Weinreich MA, Hogquist KA, Jameson SC. Kruppel-like factor 2 is required for trafficking but not quiescence in postactivated T cells. *J Immunol.* 2011; 186:775–783.

Tolleshaug H, Hobgood K, Brown MS, Goldstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: Multiple mutations disrupt transport and processing of a membrane receptor. *Cell*; 1983; 32(3), 941–951.

Traber MG. Vitamin E regulatory mechanisms. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27:347–362.

Ulrich-Merzenich G, Metzner C, Schiermeyer B. Vitamin C and vitamin E antagonistically modulate human vascular endothelial and smooth muscle cell DNA synthesis and proliferation. *Eur J Nutr.* 2002; 41:27–34.

van Berkel TJ, Out R, Hoekstra M. Scavenger receptors: Friend or foe in atherosclerosis?. *Curr Opin Lipidol.* 2005; 16:525.

van den Berg BM, Spaan JA, Vink H. Impaired glycocalyx barrier properties contribute to enhanced intimal low-density lipoprotein accumulation at the carotid artery bifurcation in mice. *Pflugers Arch.* 2009; 457:1199–1206.

Vengrenyuk Y, Nishi H, Long X, Ouimet M, Savji N, Martinez FO, Cassella CP, Moore KJ, Ramsey SA, Miano JM, Fisher EA. Cholesterol loading reprograms the microRNA-143/145-myocardin axis to convert aortic smooth muscle cells to a dysfunctional macrophage-like phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2015; 35:535–546.

Villarreal G, Zhang Y, Larman HB, Gracia-Sancho J, Koo A, Garcia-Cardena G. Defining the regulation of KLF4 expression and its downstream transcriptional targets in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 391:984–989.

Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol.* 2009; 50(5):402–409.

Wang Y, Wang GZ, Rabinovitch PS, Tabas I. Macrophage mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and nuclear factor- $\kappa$ B-mediated inflammation in macrophages. *Circ Res.* 2014; 114:421–433.

Westertep M, Bochem AE, Yvan-Charvet L, Murphy AJ, Wang N, Tall AR. ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circ Res.* 2014; 114:157–170.

Wight TN, Merrilees MJ. Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res.* 2004; 94:1158.

Williams KJ, Tabas I. Lipoprotein retention and clues for atheroma regression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; 25:1536.

Won D, Zhu SN, Chen M, Teichert AM, Fish JE, Matouk CC, Bonert M, Ojha M, Marsden PA, Cybulsky MI. Relative reduction of endothelial nitric-oxide

synthase expression and transcription in atherosclerosis-prone regions of the mouse aorta and in an in vitro model of disturbed flow. *Am J Pathol.* 2007;171:1691–1704.

Wu D, Koga T, Martin KR. Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell production of chemokines and adhesion to monocytes. *Atherosclerosis*, 1999; 147:297–307.

Xie Y. Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *J Mol Cell Biol.* 2010; 2: 308–317.

Zeng L, Zampetaki A, Margariti A, Pepe AE, Alam S, Martin D, Wang, ZG, Cockerill G. Sustained activation of XBP1 splicing leads to endothelial apoptosis and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:8326–8331.

Zhang K, Kaufman RJ. From endoplasmic-reticulum stress to the inflammatory response. *Nature*; 2008;454:455–462.


Zhang Y, Wahl LM. Synergistic enhancement of cytokine-induced human monocyte matrix metalloproteinase-1 by C-reactive protein and oxidized LDL through differential regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and prostaglandin E2. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(1): 105-13.

Zhou G, Hamik A, Nayak L, Tian H, Shi H, Lu Y, Sharma N, Liao X, Hale A, Boerboom L. Endothelial Kruppel-like factor 4 protects against atherothrombosis in mice. *J Clin Invest.* 2012; 122:4727–4731.

Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, Stevens JL, Ron D. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 1998; 12:982–995.

## 9. EKLER

### EK-I DeneY Hayvanları Etik Kurulu Proje Onay Formu

  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
PROJE ONAY FORMU

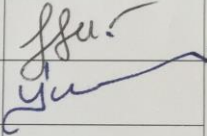
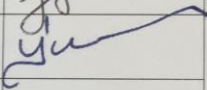
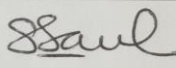
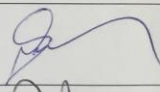

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	79_2014.mar	Çalışma: Doktora Tezi		
	PROJE ADI	Yüksek Kolesterol Diyeti ile Oluşturulan Ateroskleroz Modelinde Endoplazmik Retikulum Stres ve Nükleer faktör-eritroid 2 ilişkili faktör 2 Yolağının Rolü			
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof.Dr. Nesrin Kartal ÖZER			
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD			
	DESTEKLEYİCİ	*****			

KARAR BİLGİLERİ	Tarih: 02.12.2014 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.
-----------------	---

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
----------------------	--

ÇALIŞMA ESASI	DeneY hayvanları ile yapılacak olan bilimsel araştırma, test, sağlık hizmetleri uygulamaları ve eğitim-öğretim gibi temel etkinliklerde kullanılan yöntem ve materyaller ile ilgili etik standartları gözetmek, etik ilkeler doğrultusunda görüş bildirmek, araştırma önerilerini incelemek ve sertifikası olmayanların deneY hayvanı kullanmalarını engellemektir.
---------------	---

ÜYELER	
--------	--

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyelığı	Onaylanan Proje ile ilişkisi		Toplantıya katılım		İmza
Prof. Dr. Göksel ŞENER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi ve DeneY Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürü	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof.Dr. İnci ALICAN	Fizyoloji	Yürütücü Sekreteri	Var	Yok	Evet	Hayır	
Prof. Dr. Ayşen YARAT	Biyokimya	M.Ü Diş Hekimliği Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Serap ŞİRVANCI	Histoloji Embriyoloji ABD	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	
Doç.Dr. Rezzan AKER	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	EVET	HAYIR	
Doç.Dr. Gürkan SERT	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi	Var	Yok	Evet	Hayır	
Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ	Veteriner Hekim	M.Ü Tıp Fakültesi ve DeneY Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Sorumlu Veterineri	Var	Yok	Evet	Hayır	
Bio. Arif GÜMÜŞ	Biyoloji	İstanbul Hfzssihha Enstitüsü Müdürlüğü, Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var	Yok	Evet	Hayır	
Billur AYGÖR	Emekli Memur	Kurumla ilişkisi olmayan TC vatandaşı üye	Var	Yok	Evet	Hayır	

## EK-I Özgeçmiş

<b>Adı</b>	Perinur	<b>Soyadı</b>	Bozaykut
<b>Doğum Yeri</b>	Develi	<b>Doğum Tarihi</b>	21.05.1986
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>Tel</b>	0555 8232919
<b>E-mail</b>	perinurbozaykut@gmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora</b>	Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya AbD	
<b>Yüksek Lisans</b>	Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya AbD	2011
<b>Lisans</b>	Marmara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2009
<b>Lise</b>	Kadıköy Anadolu Lisesi	2005

### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl - Yıl)</b>
Öğretim Görevlisi	İstanbul Medipol Üniversitesi	2015-

	<b>Sayısal</b>	<b>Eşit Ağırlık</b>	<b>Sözel</b>
<b>ALES Puanı</b>	78	77	

<b>Yabancı Dil Sınav Notu<sup>#</sup></b>								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	93							

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama*</b>	<b>Konuşma*</b>	<b>Yazma*</b>
İngilizce	İyi	İyi	İyi

### Bilgisayar Bilgisi

<b>Program</b>	<b>Kullanma becerisi</b>
Microsoft Office	İyi

## **ÖDÜLLER**

- 1) Erasmus Programı Bursu, King's College London, İngiltere, 02-08/11.
- 2) Physiological Society Travel Grant, Physiology 2011, Oxford University, Oxford, İngiltere, 11-14 Temmuz 2011.
- 3) Poster birinciliği ödülü, Physiology 2011 Kongresi, Oxford Üniversitesi, Oxford, İngiltere, 11-14 Temmuz 2011.
- 4) "Early Research Career Award", SFRR-Europe 2011 Meeting, 7-10 Eylül 2011, İstanbul.
- 5) Asistan Bildiri Yarışması Birincilik Ödülü, 19 Nisan 2013, Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İstanbul.
- 6) "Young Investigator Award", MOKAD, 3rd EACR-Sponsored Anticancer Agent Development Congress, 18-19 Mayıs 2015, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

## **ÇALIŞTIĞI PROJELER**

- 1) Araştırmacı, Marmara Üniversitesi Bilimsel Projeler Araştırma Komisyonu. "Hiperkolesterolemi Modelinde Lipit Birikimi ve Aterogeneizde Rol Oynayan Faktörlerin Aydınlatılması" Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. 2010-2011, İstanbul.
- 2) Bursiyer, TÜBİTAK-COST CM1001-110S281, "Yaşlanma Sürecinde Isı Şok Proteinlerinin Oksidatif Protein Modifikasyonlarındaki Rolü". Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. 2011-2014, İstanbul.
- 3) Araştırmacı, Marmara Üniversitesi Bilimsel Projeler Araştırma Komisyonu, "Yüksek Kolesterol Diyeti ile Oluşturulan Ateroskleroz Modelinde Endoplazmik Retikulum Stres ve Nükleer faktör-eritroid 2 ilişkili faktör 2 Yolağının Rolü". Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. 2014-2015, İstanbul.
- 4) Bursiyer, TÜBİTAK-115Z137, "Kemoterapi Sürecinde Kullanılan Isı Uygulamasına Karşı Hücrel Savunma Mekanizmalarının Rolü". Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. 2015, İstanbul.

## KATILDIĞI KURSLAR/KONGRELER

- 1) Boğaziçi Üniversitesi, 3. Moleküler Biyoloji ve Genetik Semineri, 10-11 Mayıs 2008, İstanbul.
- 2) 3. Uluslararası Moleküler Tıp Kongresi, 5-8 Mayıs 2009, İstanbul.
- 3) Yaşlanma ve İlgili Hastalıkların Mekanizması ve Mikrobelerin Rolü, Marmara Üniversitesi, 11 Eylül 2009, İstanbul.
- 4) 21. Ulusal Biyokimya Kongresi, Moleküler Tanı Teknikleri Çalıştayı, 28 Ekim 2009, İstanbul.
- 5) Proteomik Araştırmaları Temel Bilgiler ve Uygulama Örnekleri, 10-11 Aralık 2009, İstanbul.
- 6) Deney Hayvanları Kullanımı ve Etik Yaklaşımı, Güz Dönemi 2010. (Sertifika)
- 7) Kök Hücre Sempozyumu, Marmara Üniversitesi, 5 Mart 2010, İstanbul.
- 8) “Protein Maintenance and Turnover in Ageing & Diseases, FEBS Advanced Lecture Course”, 4-10 Haziran 2010, Spetses, Yunanistan.
- 9) 35<sup>th</sup> FEBS Kongresi, “Molecules of Life”, 26 Haziran-1 Temmuz 2010, Göteborg, İsveç.
- 10) Proteomik İstanbul, Uluslararası Katılımlı Proteomik Çalıştayı, İstanbul Üniversitesi, 12-17 Temmuz 2010.
- 11) Floresans Tekniklerin Tıpta ve Biyolojide Uygulamaları, Acıbadem Üniversitesi, 5 Ekim 2010.
- 12) 30th London Vascular Biology Forum, University College London, 16 Mart 2011, Londra, İngiltere.
- 13) 61th BMS Meeting, Queen Mary University, 18-19 Nisan 2011, Londra, İngiltere.
- 14) Physiology 2011, Oxford University, 11-14 Temmuz 2011, Oxford, İngiltere.
- 15) SFRR-Europe 2011 Meeting, Redox Biology and Micronutrient: From signaling to translation and back, 7-10 September 2011, İstanbul.
- 16) 1<sup>st</sup> Cell Death Research Techniques Theoretical Course, 25-25 Kasım 2011, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.
- 17) Oxygen Club of California World Congress 2012, Cell Signaling, Gene-Nutrition Interactions, 20–23 Haziran 2012, Alba, İtalya.

- 18) 16<sup>th</sup> SFRR Biennial Toplantısı, 6-9 Eylül 2012, Londra, İngiltere.
- 19) FEBS EMBO 2014 Kongresi, 30 Ağustos-4 Eylül 2014, Paris, Fransa.
- 20) SFRR-E Meeting 2014, 6-7 Eylül, 2014, Paris, Fransa.
- 21) 40. FEBS Kongresi, 4-9 Temmuz 2015, Estrel Convention Center, Berlin, Almanya.

## YAYINLAR

- 1) Bakondi E, Catalgol B, Bak I, Jung T, **Bozaykut P**, Bayramicli M, Ozer NK, Grune T. Age-related loss of stress-induced nuclear proteasome activation is due to low PARP-1 activity. *Free Radical Biology & Medicine*, (2010); 50(1):86-92.
- 2) **Bozaykut P**, Sozen E, Kaga E, Ece A, Ozaltin E, Ek B, Ozer NK, Grune T, Bergquist J, Karademir B. The role of heat stress on the age related protein carbonylation. *Journal of Proteomics*, (2013); 89: 238–54.
- 3) Sozen E, Karademir B, Yazgan B, **Bozaykut P**, Ozer NK. Potential role of proteasome on c-jun related signaling in hypercholesterolemia induced atherosclerosis. *Redox Biology* (2014); 2: 732–738.
- 4) **Bozaykut P**, Karademir B, Yazgan B, Sozen E, Siow RC, Mann GE, Ozer NK. Effects of vitamin E on peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 in hypercholesterolemia induced atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine*, (2014); 70: 174–181.
- 5) **Bozaykut P**, Karademir B, Ozer NK. Regulation of protein turnover by heat shock proteins. *Free Radical Biology & Medicine*, (2014); 77: 195-209.

## ULUSLARARASI KONGRELERDE SUNULAN POSTER ve SÖZLÜ BİLDİRİLER

- 1) **Bozaykut P**, Catalgol B, Kaga E, Sozen E, Ozer NK. The Main Genetic Pathways Playing Roles in Atherosclerosis. Protein maintenance and turnover in ageing & diseases, FEBS Advanced Lecture Course, 4-10 June 2010, Spetses, Yunanistan.
- 2) Kaga E, Catalgol B, **Bozaykut P**, Sozen E, Ozer NK. Identification of Differentially Expressed Proteins as Biomarkers of Atherosclerosis Induced by

Hypercholesterolemia. Protein maintenance and turnover in ageing & diseases, FEBS Advanced Lecture Course, 4-10 June 2010, Spetses, Yunanistan.

- 3) Sozen E, Catalgol B, Kaga E, **Bozaykut P**, Ozer NK. Oxidative Stress Related Signaling Pathways Related in Atherosclerosis Process. Protein maintenance and turnover in ageing & diseases, FEBS Advanced Lecture Course, 4-10 June 2010, Spetses, Yunanistan.
- 4) **Bozaykut P**, Catalgol B, Sozen E, Yazgan B, Kaga E, Ozer NK. Expressions of Matrix Metalloproteinases in Atherosclerosis. 35<sup>th</sup> FEBS Congress Molecules of Life, 26 June- 1 July 2010, Göteborg, İsveç. (Poster ve Sözlü Sunum)
- 5) **Bozaykut P**, Catalgol B, Yazgan B, Sozen E, Siow R, Mann GE, Ozer NK. Induction of vascular antioxidant defences in response to dietary lipids and atherogenesis in hypercholesterolemic rabbits. Physiology 2011 Congress, 11-14 July 2011, Oxford University, Oxford, İngiltere.
- 6) **Bozaykut P**, Catalgol B, Yazgan B, Ustunsoy S, Sozen E, Kaga E, Siow R, Mann GE, Ozer NK. The transcription factors PPAR $\gamma$  and Nrf2 effect lipid accumulation and cholesterol efflux in in vivo model of atherosclerosis, SFRR-Europe 2011 Meeting, Redox Biology and Micronutrient: From signaling to translation and back, 7-10 September 2011, İstanbul.
- 7) Kaga E, Catalgol B, Yazgan B, Ustunsoy S, Sozen E, **Bozaykut P**, Ozer NK. Proteomic Analysis of Rabbit Aorta In Hypercholesterolemia Induced Atherosclerosis. SFRR-Europe 2011 Meeting, Redox Biology and Micronutrient: From signaling to translation and back, 7-10 September 2011, İstanbul.
- 8) Sozen E, Catalgol B, Yazgan B, Ustunsoy S, **Bozaykut P**, Kaga E, Ozer NK. Role of Protein Kinase C, C-Jun And Matrix Metalloproteinase In Hypercholesterolemia Induced Atherosclerosis. SFRR-Europe 2011 Meeting, Redox Biology and Micronutrient: From signaling to translation and back, 7-10 September 2011, İstanbul.
- 9) Catalgol B, **Bozaykut P**, Sozen E, Ece A, Ozaltin E, Ozer NK, Grune T. Different response of proteasomal degradation in normal and tumor cells during heat stress. Oxygen Club of California World Congress 2012, Cell Signaling, Gene-Nutrition Interactions, 20–23 Haziran 2012, Alba, İtalya.
- 10) **Bozaykut P**, Sozen E, Catalgol B, Yazgan B, Ustunsoy S, Siow RC, Mann GE, Ozer NK. Effect of Hypercholesterolemic Diet and Vitamin E on Signal

Transduction and Proteasomal System in Rabbit Aorta. 16<sup>th</sup> SFRRRI Biennial Meeting, 6-9 September 2012, Londra, İngiltere.

- 11) Sozen E, **Bozaykut P**, Catalgol B, Yazgan B, Ustunsoy S, Ozer NK. Activation of AP-1 Protein and Related Increase of Matrix Metalloproteinase Expression in Hypercholesterolemia Induced Atherosclerosis. 37th FEBS Congress, From Single Molecules to Systems Biology, 4-9 September 2012, Sevilla, İspanya.
- 12) Sozen E, Yazgan B, Catalgol B, **Bozaykut P**, Kaga E, Ozer NK. The Effect of Hypercholesterolemia Induced Oxidative Stress on Cardiac Failure and Autophagy: Role of Vitamin E. FEBS Special Meeting on Protein Quality Control and Ubiquitin Systems in Health and Disease, 14-16 November 2012, Kuşadası.
- 13) **Bozaykut P**. The role of vascular antioxidant defences in response to dietary lipids and atherogenesis in hypercholesterolemic rabbit aorta. COST Action CM1001 “Lipid peroxidation by-products in metabolic diseases”, 13-14 January 2013, Jerusalem, İsrail.
- 14) **Bozaykut P**, Sozen E, Karademir B, Yazgan B, Siow RC, Mann GE, Ozer NK. Role of vitamin E on PPARgamma and Nrf2 related signalling pathways in *in vivo* model of atherosclerosis. FEBS EMBO 2014 Congress, 30 August-4 September 2014, Paris, Fransa.
- 15) Sozen E, Karademir B, Yazgan B, **Bozaykut P**, Ozer NK. The effect of proteasome on c-jun related signaling mechanisms in hypercholesterolemia induced oxidative stress. FEBS EMBO 2014 Congress, 30 August-4 September 2014, Paris, Fransa.
- 16) **Bozaykut P**, Sozen E, Karademir B, Yazgan B, Ozer NK. The Role of Hypercholesterolemic Diet and Vitamin E on Nrf2 Pathway, Endoplasmic Reticulum Stress and Proteasome Activity. SFRR-E Meeting 2014, September 6th-7th, 2014, Paris, Fransa.
- 17) Karademir B, **Bozaykut P**, Ozer NK. Heat shock proteins and Proteasomal degradation in normal and tumor cells. SFRR-E Meeting 2014, September 6th-7th, 2014, Paris, Fransa.
- 18) **Bozaykut P**, Ozer NK, Karademir B. Inhibition of Molecular Mechanisms Related to Hyperthermia Induced Thermotolerance. 3rd EACR-Sponsored Anticancer Agent Development Congress, 18–19 May 2015, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

- 19) Bozaykut P, Karademir B, Ozer NK.** Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress Related Molecular Mechanisms in Atherosclerosis. 5th International Congress of Molecular Medicine, 20–22 May 2015, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.
- 20) Bozaykut P, Karademir B, Ozer NK.** Unfolded protein response to the hypercholesterolemia induced endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis. 40<sup>th</sup> Congress of FEBS, 4-9 July 2015, Estrel Convention Center, Berlin, Almanya. (Poster ve Sözlü Sunum)