



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERLİPİDEMİ YAPILMIŞ FARELERİN KANLARINDA
OKSİDLENMİŞ DÜŞÜK DENSİTELİ LİPOPROTEİN VE LİPİD
PEROKSİDASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ALİ ŞAHİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. NESRİN EMEKLİ

İSTANBUL-2010

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERLİPİDEMİ YAPILMIŞ FARELERİN KANLARINDA
OKSİDLENMİŞ DÜŞÜK DANSİTELİ LİPOPROTEİN VE LİPİD
PEROKSİDASYONUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

ALİ ŞAHİN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. NESRİN EMEKLİ

İSTANBUL-2010

I. TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans (*) Doktora ()

Anabilim Dalı: Biyokimya

Tez Sahibi : Ali ŞAHİN

Tez Başlığı : Hiperlipidemi yapılmış farelerin kanlarında oksidlenmiş düşük dansiteli lipoprotein ve lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesi.

Sınav Yeri : Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

Sınav Tarihi : 29.09.2010

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Prof.Dr. Nesrin EMEKLİ

Kurumu

Marmara Üniversitesi Diş
Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp
Bilimleri A.B.D., Biyokimya B.D.

İmza



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

Prof.Dr. İlhan Yaylım ERALTAN

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp
Anabilim Dalı

Doç.Dr. Oğuz ÖZTÜRK

İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp
Anabilim Dalı



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 45.../10.../2010 tarih ve 98. sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr.
Gül den Z. OMURTAG
Müdür

II. BEYAN

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

Tarih

Biyolog Ali Şahin

III. TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her safhasında danışmanım Marmara Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Biyokimya Bilim Dalı Başkanı Sayın Hocam **Prof. Dr. Nesrin Emekli'nin** büyük yardım, ilgi ve desteğini gördüm. Onun teşviki ve yönlendirmesi olmasaydı bu çalışmayı sonuçlandıramazdım. Kendisine şükranlarım sürekli ve kalıcı olacaktır.

Çalışmamın laboratuvar deneylerini M.Ü. Diş hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Biyokimya Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirdim. Bu çalışmalarım sırasında her türlü bilgi destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Ayşen Yarat'a, Doç. Dr. Tuğba T. Akbay'a, Doç. Dr. Ebru Işık Alturfan'a, Dr. Leyla Koç Öztürk'e ve çalışma arkadaşlarım Arş. Gör. Şehkar Nihal Oktay'a, Nazlı Benun Kılıç'a,

Biyokimya konusunda bilgilenmemi sağlayan Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki bütün hocalarıma,

Çalışmamın immünolojik kısmının gerçekleştirilmesinde bilgi desteklerini gördüğüm Yrd. Doç. Dr. Zeynep Akdetse ve ekibine,

M.Ü. Haydarpaşa Kampüsünde deney hayvanlarımızın bakımı ve değerlendirilmesi konusunda yardımlarını esirgemeyen Veteriner Hekim Dilek Özbeyli'ye,

Deneyisel çalışmalarım sırasında güler yüzleri ile yardımlarını esirgemeyen M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri yardımcı personellerinden Kamil Çalışkan'a

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

Biyolog Ali Şahin

İstanbul - 2010

IV. İÇİNDEKİLER

I.	TEZ ONAYI.....	iii
II.	BEYAN	iv
III.	TEŞEKKÜR.....	v
IV.	İÇİNDEKİLER	vi
V.	KISALTMALAR	ix
VI.	ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
VII.	TABLO LİSTESİ.....	xiv
1.	ÖZET	1
2.	SUMMARY	2
3.	GİRİŞ ve AMAÇ	4
4.	GENEL BİLGİLER	7
4.1.	Ateroskleroz Patogenezi.....	7
4.2.	Koroner Arter Hastalığı ve Ateroskleroz	10
4.3.	Koroner Arter Hastalıklarında Risk Faktörleri	10
4.4.	Lipoproteinler.....	11
4.4.1.	Apolipoproteinler	12
4.4.2.	Şilomikronlar	16
4.4.3.	Çok düşük dansiteli lipitler (VLDL).....	17
4.4.4.	Düşük Dansiteli lipoproteinler (LDL).....	17
4.4.5.	Yüksek Dansiteli Lipoproteinler (HDL)	18
4.4.6.	Lipoprotein (a)	21
4.5.	Kolesterol ve LDL kolesterol.....	22
4.5.1.	LDL ve Kolesterol metabolizması	25
4.6.	LDL Kolesterolun Ateroskleroz Patogenezindeki Rolü	27
4.6.1.	LDL Modifikasyonu ve İntimaya Geçiş	29
4.6.2.	LDL kolesterol ve Proteoglikanlar.....	33
4.7.	Sialik Asid ve LDL	35
4.8.	Lipid Peroksidasyonu ve Ateroskleroz	36
4.8.1.	Serbest Radikaller	36
4.8.2.	Oksijenin Radikal Biyokimyasındaki Yeri	36
4.8.3.	Nitrik Oksid (NO)	38
4.8.4.	Antioksidan Sistemler	39

4.9.	Oksidlenmiş LDL ve Sitokin ilişkisi.....	40
4.10.	Damar Sistemi.....	41
4.10.1.	İntima	41
4.10.2.	Media.....	42
4.10.3.	Adventisya	42
4.10.4.	Damar Endoteli ve Özellikleri	43
4.10.5.	Normal ve Aterosklerotik Endotel	44
4.11.	Lipid Metabolizmasında Dokular	45
4.11.1.	Karaciğer ve Yağ Dokusu	45
4.11.2.	Diğer Dokular.....	47
4.12.	Hiperlipidemi	47
4.12.1.	Primer Hiperlipidemi	48
4.12.2.	Sekonder Hiperlipidemi	48
4.12.3.	Deneyisel Hiperlipidemi	48
4.13.	Koroner Arter Hastalıkları ve Hemostaz.....	49
4.14.	Bu Mekanizmalara Bağlı Olarak Aterosklerozun Safhaları.....	49
4.15.	Eliza Yöntemi Hakkında Bilgi	53
5.	METOD ve MATERYAL	56
5.1.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	56
5.2.	Kullanılan Araç ve Gereçler.....	56
5.3.	Kullanılan Deney hayvanları ve oluşturulan gruplar	57
5.4.	Deney Hayvanlarının Beslenmeleri	57
5.5.	Hiperlipidemi oluşturulması. Apo B ve LDL Konj. verilmesi.....	58
5.6.	Deney hayvanlarından kan örneklerinin alınması.....	58
5.7.	Deney hayvanlarından doku örneklerinin hazırlanması.....	58
5.8.	Kan ve doku örneklerinde incelenen parametreler ve yöntemleri	59
5.8.1.	Serumda Total lipid tayini.....	59
5.8.2.	Serumda Total kolesterol tayini (Kat.no.C507-480).....	60
5.8.3.	Serumda LDL kolesterol tayini (Kat. No. L530-100).....	62
5.8.4.	Serumda ve Dokuda ox-LDL tayini (USCN-Kat.No. E0527Mu)	63
5.8.5.	Karaciğer Homojenatında Total Protein Tayini	66
5.8.6.	Karaciğer Homojenatında Glutasyon(GSH) tayini.....	68
5.8.7.	Karaciğer Homojenatında Total Siyalik Asit Tayini	71
5.9.	İstatistiksel Değerlendirme.....	72

6.	BULGULAR	73
6.1.	Çeşitli Gruplarda Serumdaki Lipid Göstergelerine Ait Bulgular	73
6.1.1.	Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması	74
6.1.2.	Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması.....	75
6.1.3.	Hiperlipidemik ve LDL Gruplarının Karşılaştırılması.....	76
6.2.	Serumda Ox-LDL Sonuçları	77
6.2.1.	Serum Ox-LDL Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması...	77
6.2.2.	Serum Ox-LDL Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karşılaştırılması	78
6.2.3.	Serum Ox-LDL Hiperlipidemik ve LDL Grupların Karşılaştırılması	79
6.3.	Karaciğer Homojenatında Ox-LDL Sonuçları	80
6.3.1.	Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması	80
6.3.2.	Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karşılaştırılması.....	81
6.3.3.	Hiperlipidemik ve LDL Grupların Karşılaştırılması.....	82
6.4.	Karaciğer Homojenatında Total Protein Sonuçları	83
6.4.1.	Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması	83
6.4.2.	Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karşılaştırılması.....	84
6.4.3.	Hiperlipidemik ve LDL Grupların Karşılaştırılması.....	85
6.5.	Karaciğer Homojenatında Glutasyon (GSH) ve Lipid Peroksidasyon (LPO) Sonuçları	86
6.5.1.	Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması	86
6.5.2.	Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karşılaştırılması.....	87
6.5.3.	Hiperlipidemik ve LDL Grupların Karşılaştırılması.....	88
6.6.	Karaciğer Homojenatında Sialik Asid Sonuçları	89
6.6.1.	Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması	89
6.6.2.	Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karşılaştırılması.....	90
6.6.3.	Hiperlipidemik ve LDL Grupların Karşılaştırılması.....	91
7.	TARTIŞMA ve SONUÇ	92
8.	KAYNAKLAR	106
9.	ETİK KURUL ONAYI.....	117
10.	ÖZGEÇMİŞ.....	118

V. KISALTMALAR

Apo B	Apolipoprotein B
ASMC	Arteriyel Düz Kas Hücreleri
AT III	Antitrombin III
CVH	Kardiyo Vasküler Hastalıklar
CETP	Kolesterol ester transfer proteini
CRP	C- Reaktif Protein
CyA	Siklosporin A
ECM	Ekstra Sellüler Matriks
EDRF	Endotelden Türeyen Reaktif Faktör
GSH	Glutasyon
HDL	Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HSP	Isı Şok Proteini
ICAM	Hücre içi Adhezyon Molekül
IL	İnterlökin
INF	İnterferon
KO	Knock out
LCAT	Lesitin kolesterol açıl transferaz
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LFA	Lenfosit Fonksiyonu Antijeni
LPL	Lipo Protein Lipaz
LPO	Lipid Peroksidasyon
MCP	Makrofaj Kemoatraktan Protein
MI	Miyokard İnfarktüsü
MT	Mikobakterium Tüberkülozis

NAD	Nikotinamid adenin dinukleotid
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik Oksid Sentaz
O ₂ ⁻	Superoksid
Ox-LDL	Oksidlenmiş Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
PDGF	Trombosit Bağımlı Büyüme Faktörü
PGI ₂	Prostosiklin
PG	Proteoglikan
SA	Stabil Angina
SMC	Düz Kas Hücreleri
SOD	Süper Oksid Dismutaz
TNF	Tümör Nekroz Faktör
TXA ₂	Trombaksan A ₂
UA	Unstabil Angina
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
VCAM	Vasküler Hücre Adhezyon Molekülü

VI. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 4.1: Sitokinler ve adezyon moleküllerinin etkisi ile enflamasyon hücrelerinin damar dışına göçü

Şekil 4.4.1: Apoproteinlerin değişik lipoproteinlerdeki dağılımı

Şekil 4.4.5: Kolesterol gerksinimi olan hücreler veya karaciğere lipid dağılımında HDL'nin rolü. Ters kolesterol yolu koyu oklarla gösterilmiştir.

Şekil 4.4.6: Lipoprotein (a)'nın genel yapısı

Şekil 4.5 (a): Kolesterolün moleküler yapısı

Şekil 4.5 (b): Kolesterolün hücre membranında duruş şekli

Şekil 4.5 (c): LDL partikülünün şematik görünümü

Şekil 4.5.1: LDL'nin hücreye alımı ve yıkımı

Şekil 4.6: LDL içindeki doymamış yağ asidlerinin oksidasyonu, MDA'nin meydana gelişi ve Apo-B oksidasyonu

Şekil 4.6.1: (a) LDL Molekülünün Modifikasyonu

Şekil 4.6.1 (b): LDL'nin intimaya geçişi ve meydana gelen kimyasal reaksiyonlar

Şekil 4.6.2: Çeşitli glukozaminoglikan molekülleri

Şekil 4.8.2: Oksijen molekülünün elektron sayısı ve oluşan oksidan moleküller

Şekil 4.10.4: Damar endotelinden salınan bazı moleküller

Şekil 4.14 (a): Tip I Aterosklerotik lezyonun progresyonu

Şekil 4.14 (b): Tip II aterosklerotik lezyonların progresyonu

Şekil 4.14 (c): Tip IV atrosklerotik lezyonların progresyonu

Şekil 4.14 (d): Tip VI aterosklerotik lezyonların progresyonu

Şekil 4.15: Plazmada ox-LDL ölçümü için dört farklı prosedür.

Şekil 5.8.1: Total lipid standart eğrisi

Şekil 5.8.4 (a): Elisa yönteminde takip edilen yol şematik olarak yukarıdaki gibidir

Şekil 5.8.4 (b): Ox-LDL standardı

Şekil 6.1.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Lipid Parametrelerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.1.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Lipid Parametrelerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.1.3: Hiperlipidemik ve LDL Gruplarında Lipid Parametrelerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.2.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Serum Ox-LDL Değerlerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.2.2: Serum Ox-LDL Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması

Şekil 6.2.3: Serum Ox-LDL Hiperlipidemik ve LDL Gruplarının Karşılaştırılması

Şekil 6.3.1: Karaciğer Homojenatında Kontrol ve Hiperlipidemik Gruplarının Ox-LDL Karşılaştırılması

Şekil 6.3.2: Karaciğer Homojenatında Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Ox-LDL Karşılaştırılması

Şekil 6.3.3: Karaciğer Homojenatında Hiperlipidemik ve LDL Gruplarının Ox-LDL Karşılaştırılması

Şekil 6.4.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Total Protein Değerlerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.4.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Total Protein Değerlerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.4.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları Total Protein Değerlerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.5.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları GSH ve LPO Değerlerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.5.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları GSH ve LPO Değerlerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.5.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları GSH ve LPO Değerlerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.6.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları Sialik Asid Değerlerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.6.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Sialik Asid Değerlerinin Karşılaştırılması

Şekil 6.6.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları Sialik Asid Değerlerinin Karşılaştırılması

VII. TABLO LİSTESİ

Tablo 4.4: Major lipoproteinlerin içerikleri

Tablo 4.4.1: Apoproteinlerin sınıflanması ve bazı özellikleri

Tablo 4.10.5: Normal ve fonksiyonları bozulmuş damar endotelinin özellikleri

Tablo 5.4: Laboratuvar şartlarında hazırlanan yemlerin içeriği

Tablo 6.1: Serumda Lipid Göstergelerinin Sonuçları

Tablo 6.1.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Lipid Parametrelerinin Değerleri

Tablo 6.1.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Lipid Değerleri

Tablo 6.1.3: Hiperlipidemik ve LDL Gruplarının Lipid Değerleri

Tablo 6.2.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları Serum Ox-LDL Değerleri

Tablo 6.2.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Serum Ox-LDL Değerleri

Tablo 6.2.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları Serum Ox-LDL Değerleri

Tablo 6.3.1: Karaciğer Homojenatında Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları Ox-LDL Değerleri

Tablo 6.3.2: Karaciğer Homojenatında Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Ox-LDL Değerleri

Tablo 6.3.3: Karaciğer Homojenatında Hiperlipidemik ve LDL Grupları Ox-LDL Değerleri

Tablo 6.4.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları Total Protein Değerleri

Tablo 6.4.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Total Protein Değerleri

Tablo 6.4.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları Total Protein Değerleri

Tablo 6.5.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları GSH ve LPO Değerleri

Tablo 6.5.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları GSH ve LPO Değerleri

Tablo 6.5.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları GSH ve LPO Değerleri

Tablo 6.6.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları Sialik Asid Değerleri

Tablo 6.6.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Sialik Asid Değerleri

Tablo 6.6.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları Sialik Asid Değerleri

1. ÖZET

Aterosklerotik olayların gelişiminde hiperlipidemi önemli bir yer tutar. İçinde köpük hücreleri bulunduran aterosklerotik plakta bulunan başlıca lipid türü düşük dansiteli lipoproteinlerdir (LDL). Bu nedenle LDL oksidasyonunun ateroskleroz gelişiminde önemli olduğu kabul edilir. Köpük hücrelerinin öncüsü olan makrofajlar doğal LDL'yi toplamaz. Modifiye olmuş LDL'nin incelenmesi aterosklerozun anlaşılmasında önem taşır. Bu çalışmada deneysel hiperlipidemi yapılmış hayvanlarda, oksidlenmiş LDL (ox-LDL), lipid peroksidasyonu ve sialik asid değerleri incelendi. Ayrıca Apo B ve LDL konjugatı ilave edilen hiperlipidemi modelinin nasıl değiştiğine bakıldı.

Çalışmada 32 tane C57BL/6 türü fare kullanıldı. Deney hayvanları her biri 8 adet olmak üzere 4 gruba ayrıldı. 1-Kontrol grubu (n=8), 2-Hiperlipidemik grup (n=8), 3-Hiperlipidemik+Apo-B grubu (n=8), 4-Hiperlipidemik+LDL grubu (n=8). 2 ay sonunda sakrifiye edilen hayvanlardan rutin lipid parametreleri, ox-LDL, LPO, GSH ve sialik asid analizlerini yapmak için kan ve karaciğer örnekleri alındı.

Total lipid, kolesterol, LDL-C hiperlipidemik grupta kontrol gruba göre anlamlı olarak yükseldi ($p<0,001$). LDL-C hem Apo-B hem de LDL konjugatı verilen hiperlipidemik grupta anlamlı olarak azalmıştı ($p<0,002, p<0,001$). Kısa süreli deneysel hiperlipidemide ox-LDL değerleri hem serumda hem de karaciğer homojenatında artmıştı, verilen konjugatların bu artışa etkileri beklenen düzeyde olmadı. Karaciğer homojenatında lipid peroksidasyon ürünleri artmıştı ($p<0,001$). Apo-B ve LDL konjugatlarının bu artışa etkileri farklı oldu. Sialik asid de kısa süreli deneysel hiperlipidemide arttı fakat Apo-B ve LDL konjugatı bu artışı etkilemedi.

Sonuç olarak; Kısa süreli deneysel hiperlipidemide oksidlenmiş LDL kanda ve karaciğer homojenatında arttı. Bu artışa lipid peroksidasyon ürünleri ve sialik asid de iştirak etti. Hiperlipideminin erken safhalarında oksidasyonun başlaması tedavi stratejisi yönünden dikkate alınması gereken bir durumdur.

Anahtar kelimeler: Apolipoprotein B, Düşük dansiteli lipoprotein, Lipid peroksidasyonu, Oksidlenmiş düşük dansiteli lipoprotein, Sialik asid.

2. SUMMARY

Investigation of Oxidized Low-Density Lipoproteins and Lipid Peroxidation in Experimentally Hyperlipidemia Induced Mice.

Hyperlipidemia is a major risk factor in atherosclerotic events. Low density lipoproteins (LDLs) are the main source of lipids in atherosclerotic plaques within foam cells. Oxidation of LDL is believed to play an important role in the development of atherosclerosis. Macrophages are considered to be precursors of foam cells, but they can not take up native LDL. Thus, measurement of oxidized LDL is essential for investigating its relevance to atherosclerotic diseases. In this study; oxidized LDL (ox-LDL), lipid peroxidation (LPO) and sialic acid values were investigated in experimental hyperlipidemia induced mice and the effect of apolipoprotein B-100 (Apo-B) and LDL conjugate on this values were examined.

Thirty two C57BL/6 mice were enrolled into the study. Mice were divided into four groups. Control group (n=8), hyperlipidemic group (n=8), hyperlipidemic + Apo-B group and hyperlipidemic+LDL group. Mice were sacrificed at the end of two months. Blood samples and liver tissues were taken for routine lipid parameters, ox-LDL, LPO, glutathione (GSH) and sialic acid analysis.

Serum levels of total lipid, cholesterol, LDL-C significantly increased in hyperlipidemic group with respect to control group ($p < 0,001$). LDL-C significantly decreased in both Apo-B and LDL conjugate given hyperlipidemic groups respectively ($p < 0,002$, $p < 0,001$). Serum ox-LDL and liver ox-LDL increased significantly in short term hyperlipidemia, the effects of Apo-B and LDL conjugates on ox-LDL levels was not in expected values. Lipid peroxidation in short term hyperlipidemia significantly increased in liver homogenates ($p < 0,001$). Apo-B and LDL conjugates affected this increased differently. Sialic acid values also increased in short term induced hyperlipidemia, there was no effect of Apo-B and LDL conjugates on sialic acid values.

In conclusion; in short term experimental hyperlipidemia ox-LDL, lipid peroxidation and sialic acid values increased. Oxidation of LDL in the early stages of hyperlipidemia should be taken into consideration for the therapeutic strategies.

Anahtar Kelimeler: Apolipoprotein B, Lipid peroxidation, Low density lipoprotein, Oxidized low density lipoprotein, Sialic acid.

PROJE NO: SAG-YLP-270109-0009

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde ateroskleroz ve arteriyel tromboembolizm sonucu gelişen hastalıklar toplumlarda başlıca ölüm nedenlerini oluşturduğu için bu hastalığı oluşturan risk faktörleri üzerinde yoğun biyokimyasal çalışmalar devam etmektedir (23,35,60,69). Ateroskleroz günümüzün hastalığı olarak kabul edilmesine rağmen, Mısır ve Peru mumyalarında bu hastalığa ait izler bulunmuştur (99). Ancak kesin olan, bu hastalığın günümüzde epidemi boyutlarına ulaştığı ve özellikle gelişmiş ülkelerde ölüm nedenlerinin başında geldiğidir. ABD de yılda 1.5 milyon insan miyokard infarktüsü olmakta, bunun yaklaşık 500.000’ni ölümle sonuçlanmaktadır. Bu ölümlerin büyük bir kısmı ise hastaneye yetişmeden gerçekleşmektedir (94). LDL aracılığı ile taşınan ve okside olan (ox-LDL) kolesterol, koroner arter hastalıkları için en önemli risk olarak kabul edilmektedir. LDL’nin oksidatif modifikasyonu aterogenezin patogenezinde önemli bir yer tutar.

Aterosklerotik lezyonlarda en tipik bulgu lipid yüklü köpük hücreleridir. Bu hücrelerin oluşmasında başlıca sorumlu LDL’nin oksidatif modifikasyonu olduğu günümüzde üzerinde en çok durulan konulardan biridir (38,90). Monosit/makrofajlardaki skavenger (çöpcü) reseptör aracılığı ile ox LDL’nin toplandığı in vitro olarak da gösterilmiştir. Skavenger reseptörler modifiye olmuş LDL’yi tanıma özelliğine sahiptir. Bu reseptörlerle doğal LDL ile bağlanamaz. Günümüzde tanımlanan ve klonlanan çöpçü reseptörlerin sayısı 10 taneden fazladır (30,90) In vitro deneylerde olduğu gibi, in vivo çalışmalarda da ox-LDL’nin çöpçü reseptörlerin ligandı olduğu gösterilmiştir (86). LDL oksidasyonunun azlığı ya da çokluğu da aterojenite açısından önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir.

Bu bilgiler dikkate alınarak yüksek kolesterol düzeylerinin ateroskleroz için önemli bir risk faktörü olduğuna dikkat çekilmektedir. Aterom plaklarında LDL kolesterol vardır. Ancak LDL’nin oksidasyonu aterosklerozun gelişimi için en fazla önem taşıdığı düşünülmektedir.

Hücrede metabolizma sırasında meydana gelen superoksit ($-O_2$) ve nitrik oksit (NO) gibi serbest radikaller LDL’nin doğal durumunun değişerek

oksidlenmesine neden olur. NO'nun, LDL'nin major proteini olan, apo B oksidasyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Lipooksijenazlar ve diğer oksidanların da LDL'nin lipid kısmını okside ettiği bildirilmiştir (33,38).

Doğal olan LDL değil de, oksidlenmiş LDL'ler; monositler, düz kas hücreleri ve makrofajlar üzerindeki çöpcü reseptörler tarafından toplanabilmektedir. Oksidlenen LDL'nin makrofajlar üzerindeki asetil grubu içeren reseptörlere afinitesi artmıştır. Okside LDL alımının regülasyonu bozulduğunda, kan damarlarında aterosklerozun ilk belirteci olan lipid yüklü makrofajlar görülmeye başlar. Lökositlerden çıkan enflamasyon molekülleri aterojenezi hızlandırır. Kanda ox-LDL ölçümünün aterosklerozun erken teşhisi anlamına geldiği savunulmaktadır

Lipid peroksidasyonu hücre gelişmesi esnasında olan doğal bir süreçtir. Ancak oksidatif stres arttığında ve de hücrenin antioksidatif savunma sistemindeki denge olumsuz yönde arttığında istenmeyen lipid peroksidasyon ürünleri ve protein modifikasyonu meydana gelir (1). Bu ürünler ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynar. Çünkü peroksidasyon ürünlerinin neden olduğu serbest radikaller doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girer. Bu etki en fazla kolesterol taşıyan LDL de en belirgin bir şekilde meydana gelir. Bu şekilde modifikasyona uğramış LDL'ler makrofajlardaki çöpcü reseptörler tarafından tanınır ve kontrolsüz bir şekilde toplanır. Subendotelde yer alan makrofajlar lipid yüklü köpük hücrelerine dönüşür. Bu durum hücre proliferasyonunu, ekstraselüler komponentlerin açığa çıkmasına, damar duvarında inflamatuvar cevabın gerçekleşmesine neden olur. Bütün bu süreçler de aterosklerozun başlamasına ve gelişmesine neden olur. Subendotelde kolesterol yüklü makrofajların görülmesi ile endotel hasarı başlar. Bu nedenle kolesterol yüklü makrofajların görülmesi aterosklerozun en erken belirteci (yağlı çizgi) olarak kabul edilir. Daha ileri safhalarda stenoz başlar, kan akımı yavaşlar ve bu tabloya tromboz ilave olunca myokard infarktüsü kaçınılmaz olur (11,60,83).

Plazmadaki kolesterolun major taşıyıcısı LDL içindeki lipidlerin peroksidasyonu ile oluşan ox-LDL, aterosklerozda inflamasyon reaksiyonlarının başlamasına neden olur. LDL içindeki yağ asitlerinin oksidasyonu ile reaktif aldehidler meydana gelir. Bu reaktif moleküller proteinlerin de modifiye olmasına neden olur. Oksidasyonu yapan iki önemli aldehitten biri malondialdehid (MDA)

diğeri 4-hidroksinonenal'dir. Bunlar proteinlerle kovalent bağ oluşturur. Hayvan modellerinde T hücrelerinin de MDA tarafından aktifleştigi gösterilmiştir (5,27). Bu bilgilerden T hücre aracılığı ile meydana gelen inflamasyon reaksiyonları için antijenin oksidasyonla meydana gelen aldehidler olduğu anlaşılmaktadır

MDA'nın oluşturduğu antijenle aktiveleşen T hücreleri, endotel hücreleri, monositler aterosklerotik lezyonda enflamasyona cevap olacak şekilde aktiveleşir. Monositler makrofajlara diferansiye olur (91). Makrofajlar çöpcü reseptörleri ile ox-LDL'yi içine alarak köpük hücrelerini oluşturur. Aktiveleşen makrofajlar bir taraftan da T lenfositlerini aktive ederek sitokinlerin salınmasını sağlar (42,50). Bir kısım araştırmacılar ox-LDL'nin de doğrudan T lenfositlerini aktiveleştirdiğini bildirmişlerdir (84,97). Fakat bu reaksiyonların hangi mekanizma ile yapıldığı henüz açık değildir.

Yapılan çalışmalar ox-LDL'nin CVH için iyi bir belirteç olduğunu söylemektedir (2,40). Aterosklerotik lezyonlarda makrofajlardan türeyen köpük hücrelerinde immunohistokimyasal çalışmalarda anti ox-LDL monoklonal antikolar kullanılarak ox-LDL'nin biriktiği gösterilmiştir (50). Bu kanıtlara dayanılarak ox-LDL'nin ateroskleroz patogeneğinde önemli olduğu savunulmaktadır. Buna rağmen ox-LDL'nin kan düzeyleri ile ilgili olarak anlaşılması gereken pek çok nokta vardır.

Aterosklerozda gelişim süresinin uzun zaman alması ve belirsizliğin nedeni ile araştırmacılar ateroskleroz çalışmalarında patogeneze için kesin bir şey söylemekte zorlanmaktadır.

Özetle; yapılan çalışmalardan LDL'nin oksidasyonunun koroner arter hastalıkları için önemli bir risk faktörü olduğu anlaşılmaktadır. Fakat bu oksidasyonun hastalığın hangi döneminde başladığı hakkında kesin bilgiler yoktur. Biz bu noktadan hareketle deneysel olarak hiperkolesterolemi yapılan ateroskleroza yatkın olduğu kabul edilen C57BL/6 tipi farelerin kanlarında kısa sürede LDL oksidasyonunun gelişip gelişmediğini araştırmak istedik. Ayrıca hayvanlara yukarıda sözünü ettiğimiz LDL ve içindeki en önemli protein olan Apo B konjugatları enjekte ederek lipid profilinin ve lipid peroksidasyonunun kanda ve karaciğer homojenatında nasıl bir değişim göstereceğini incelemek istedik. Son yıllarda CVH'lı olgularda önemi olduğu bildirilen siyalik asidin bu süreçte nasıl etkili olacağını da, çalışmamızın kapsamına alarak bu konuda da literatüre ışık tutmayı amaçladık.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Ateroskleroz Patogenezi

Aterosklerozun patogenezi anlamak için çok uzun zamandır pek çok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. Deney hayvanları normal yem ile beslendiklerinde ateroskleroz olmadıkları halde kanda lipid ve kolesterol oranını yükseltecek hiperlipidemik yem ile beslendiklerinde aterosklerotik damarların başladığı gösterilmiştir (55,58,94).

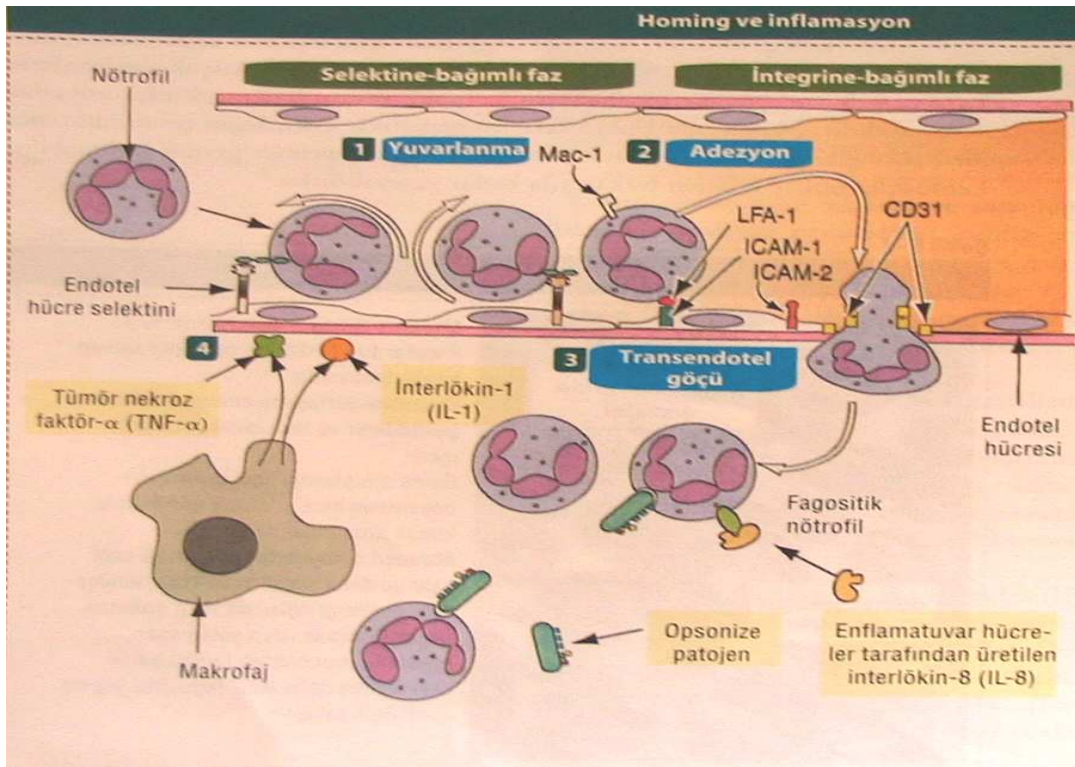
Diğer taraftan Ross ve ark (79) damarda herhangi bir hasar oluştuğunda aterosklerozun geliştiğini öne sürmüşlerdir. Yani ateroskleroz enflamasyona yanıt olarak düşünülmüştür.

Enflamasyon; enfeksiyon ya da başka bir nedenle meydana gelmiş doku hasarına karşı hücrel ve humoral cevaptır. Burada amaç hasarlanmış dokunun tamiri ve yenilenmesini sağlamaktır. Bu hipoteze göre ateroskleroz; damar duvarında gelişen bir yaranın iyileşme sürecinde karşılaşılan olayların tümüdür. Ateroskleroza karşı ilk korunma damarın iç yüzeyini kaplayan epitelyum hücresi olan endotel hücreleri tarafından yapılır. Bu nedenle endotel bütünlüğü aterosklerozun patogenezinde büyük önem taşır (57,59).

Endotel disfonksiyonunda damarın permeabilitesi arttığı için, LDL'nin damar duvarından geçişi kolaylaşır. Bu esnada LDL modifikasyonunun meydana geldiği bildirilmiştir (56,104). Bu noktada en önemli modifikasyon ox-LDL'nin meydana gelişidir. Ox-LDL endotel için toksiktir ve ayrıca ox-LDL düz kas hücreleri ve makrofajlar için de aktivatördür. Ox-LDL'nin bu hücrelerdeki doku faktörü sentezini de uyardığı bildirilmiştir (94). Buradan endotel disfonksiyonu ile birlikte koagülasyonun da uyarıldığı görülür.

Endotel disfonksiyonu ile beraber proinflamatuvar moleküllerin üretimi artar. Lökosit adezyon molekülleri ve lökosit kemoatraktanları bunlar arasındadır (65,77). Bu noktada olay; fagositik nötrofillerin enflamasyon bölgelerine göç mekanizmasına benzer. Özel bir uyarana cevap olarak lökositler kan dolaşımından enflamasyonun meydana geldiği bölgeye yerleşmeye yönelirler. Burada birinci basamakta

lökositlerin yuvarlanması ve bağlanması gerçekleşir. Lökositlerin yüzeyinde bulunan karbohidrat ligandları ile endotel hücre yüzeyinde bulunan selektinler geri dönüşümlü bir bağlanma oluştururlar. Bu bağlanmayı adezyon takip eder. Burada ICAM-1, ICAM-2 gibi adezyon molekülleri önemli rol oynar. ICAM inflamasyon bölgesinde aktifleşmiş makrofajlardan sitokinlerin salınımını artırır. Monosit gibi lökositlerin konsantrasyonlarındaki artış T hücrelerinin endoteli aşarak dokuya girmelerine yardımcı olur. T hücrelerinin dokuya geçmesi CD31 tarafından kolaylaştırılır. Bu esnada aktifleşmiş makrofajlar endotel hücrelerinden lektin grubu adezyon moleküllerinin salgılanmasını uyaran sitokinleri salgırlar. TNF- α ve IL-1 bu sitokinler arasındadır. Sitokinler ve adezyon moleküllerinin etkisi ile lökositlerin damar lümeninden çıkışı aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (51,54).



Şekil 4.1 : Sitokinler ve adezyon moleküllerinin etkisi ile enflamasyon hücrelerinin damar dışına göçü (53).

Yukarıdaki şekilde inflamasyona inflamatuvar hücrelerin cevabı görülmektedir. Aterosklerozun patogeneğinde de ox-LDL'ye karşı benzer cevaplar

oluştugu için inflamasyona cevabı hatırlamak amacıyla bu şekil konmuş ve şekildeki numaraların anlamı kısaca şöyle özetlenmiştir. 1-Yuvarlanma ve bağlanma: Yukardaki şekilde görüldüğü gibi nötrofil tipi Lökositler endotel hücre yüzeyinde bulunan selektinler ve nötrofil yüzeyinde bulunan karbonhidrat ligandları ile geri dönüşümlü bir bağlanma meydana getirirler bu bağlanma güçlü değildir ve hücre yuvarlanmaya devam eder. 2- Adezyon: Nötrofil ve endotel hücre arasında güçlü bir etkileşim meydana gelir. Bu etkileşim endotel üzerindeki interselüler adezyon molekülleri ICAM -1 ve ICAM -2 ile Mac-1 ve LFA-1 integrinleri aracılığı ile olur. ICAM-1 inflamasyon varlığında salınır. 3-Transendotel göçü: T hücresi enflamatuar hücreleri tarafından üretilen IL-8 konsantrasyonunun artışı ile endotelden göç eder. CD31 diyapedesi kolaylaştırır. 4-Aktifleşmiş makrofajlar endotel hücrelerden selektinlerin salınmasını uyaran TNF alfa ve IL-1 'i salgırlar (53,54).

Yukarıdaki mekanizma göz önünü alındığında, lökositlerdeki adezyon moleküllerinin eksikliğinde immun sistemin çalışması olumsuz yönde işlediğinden yara iyileşmesinde gecikmeler ve tekrarlayan enfeksiyonlar görülür. Ox-LDL yönünden endotel altına geçişi gösteren yukarıdaki mekanizma ile benzerlik vardır.

Endotel hasarı da diyebileceğimiz endotel disfonksiyonunu takiben adezyon molekülleri arter duvarına göç etmeye başlar. Bu esnada düz kas hücreleri (SMC) de hareketlenmiştir. Lipid yüklü köpük hücrelerinin şekillenmeye başladığı an bu hareketlik sırasındadır (93).

Aterosklerozun safhaları olan tip II de bu oluşumlara bağlı olarak yağlı çizgiler meydana gelmiştir. Bu oluşumlar aterosklerotik lezyonların başlangıcı olarak kabul edilir. Bu esnada makrofajlara dönüşen monositlerden; sitokinler, büyüme faktörleri, metalloproteinazlar ve çeşitli prokoagulant moleküller salınmaya başlar. Sitokinler arasında bulunan MCP-1 gibi kemoatraktanlar hasarlı bölgeye daha çok lökositlerin göç etmesini sağlar. Bu esnada ortama salınan PDGF gibi büyüme faktörleri, SMC'lerin proliferasyonunu ve migrasyonunu arttırırlar. Bu gelişmeler Tip I, II safhasında yer alan yağlı çizgilerin büyümesine ve Tip III, IV gibi safhalar ulaşılmasına neden olur. Damar duvarındaki lezyon büyümeye başlar. Aterosklerotik lezyonun merkezini oluşturan lipidin yanı sıra fazlaca doku faktörü içerdiği gösterilmiştir (24,88).

4.2. Koroner Arter Hastalığı ve Ateroskleroz

Günümüzde ve geçmişte arter duvarının olumsuz gelişmelere karşı göstermiş olduğu inflamatuvar ve proliferatif cevap olarak kabul edilen aterosklerozun en önemli belirtisi koroner arter hastalıklarıdır. Serebrovasküler ve periferik damar hastalıkları da aterosklerozun sonuçlarıdır (16,39).

Koroner arter hastalıklarının risk faktörlerini anlamak için literatürde pek çok çalışma yapılmıştır ve yapılmaya devam edilmektedir. 1948 yılında başlatılan “Framingham Heart Study” nin sonuçlarına göre o yıllarda bu çalışmaya katılanların % 75’inin ölüm nedeni koroner arter hastalığıdır (16). Koroner arter hastalıklarının en önemli belirtisi; miyokardın geçici (reversibl) iskemisi olarak kabul edilen ve göğüs ağrısı olarak kendini gösteren angina pectorisdir. 65 yaşın üstünde olan erkeklerin % 20’sinde, kadınların ise % 13’ünde rastlanan bir bulgudur (16,71). Bu ağrının altında yatan başlıca sebep bir veya daha fazla koroner arterlerde görülen daralmadır. Stabil (SA) veya unstabil angina (UA) olarak değerlendirilen angina pectorisde hekim tarafından tedbir alınmaz ise, karşılaşılabilecek durum miyokard infarktüsüdür (MI). MI; koroner arter tıkanması nedeni ile görülen irreversibl iske mi, yani kalp kasının ölümüdür. Sık rastlanan ani ölümlerin başlıca nedenlerinden biridir. Bunun altında yatan sebep ise yavaş yavaş gelişen aterosklerozdur (71,75).

4.3. Koroner Arter Hastalıklarında Risk Faktörleri

Genetik faktörler tarafından belirlendiği genellikle kabul edilen koroner arter hastalıklarının risk faktörleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir (94).

- Yüksek LDL
- Düşük HDL kolesterol
- Yüksek trigliserid
- Artmış beden kitle indeksi
- Hipertansiyon (sistolik basınç>140 mmHg, diastolik basınç >90 mmHg)

- Artmış lipoprotein (a)
- Artmış homosistein
- Tip 2 diabetes mellitus
- Yükselmiş fibrinojen
- Trombosit agregasyonunun artması
- Artmış C-reaktif protein
- Artmış doku faktörü
- Cinsiyetin erkek olması
- Yaş
- Koroner arter hastalığının ailesel hikayesi
- Sigara içimi
- Diyet
- Egzersiz
- Enfeksiyon
- Hava kirliliği (partiküller)

4.4. Lipoproteinler

Lipidler suda çözünmedikleri için plazmada dolanımları lipoprotein adı verilen özel yapılı partiküllerle gerçekleşir. Lipoproteinler suda çözünen lipid-protein kompleksleridir. Bu kompleksin iç kısmında trigliserid ve kolesterol esterleri, çevresinde polar yapılı fosfolipidler ve apoprotein adı verilen proteinler bulunur. Lipoprotein partikülleri içinde 4 ana lipid grubu bulunur. Bunlar; triacigliseroller, fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleridir (33).

Tablo 4.4: Major lipoproteinlerin içerikleri

LP	Kaynak	Yoğunluk	% PR	% TG	% PL	% CE	% C	% FFA
Şilo	Bağırsak	< 0.95	1-2	85-88	8	3	1	0
VLDL	KC	0.95-1.006	7-10	50-55	18-20	12-15	8-10	1
IDL	VLDL	1.006-1.019	10-12	25-30	25-27	32-35	8-10	1
LDL	VLDL	1.019-10.63	20-22	10-5	20-28	37-48	8-10	1
*HDL ₂	Bağırsakta KC Şilo VLDL	1.063-1.25	33-35	5-15	32-43	20-30	5-10	0
*HDL ₃	Bağırsakta KC Şilo VLDL	1.125	55-57	3-13	26-46	15-30	2-6	6
Albümin FFA	Yağ Dokusu	>1.281	99	0	0	0	0	100

Pr: Protein, TG: Triaçilgliserol, Pl: Fosfolipid, LP: Lipoprotein, CE: Kolesterol ester, C: Serbest Kolesterol, FFA: Serbest yağ asitleri, Şilo: Şilomikron

Lipoproteinler yukarıdaki tabloda görüldüğü gibi içeriklerindeki lipid ve protein oranlarına göre yoğunluk değişimi gösterirler ve başlıca; şilomikronlar, çok düşük dansiteli lipitler (VLDL), düşük dansiteli lipidler (LDL) ve yüksek dansiteli lipitler olmak üzere gruplandırılırlar

4.4.1. Apolipoproteinler

Lipoproteinlerin protein kısmı apolipoprotein veya apoprotein olarak bilinir. Aşağıdaki tabloda görüldüğü gibi lipoproteinlerin yapısında bulunan apoproteinler farklı yapı gösterir. Her bir lipoproteinin yapısında bir veya daha fazla apoprotein vardır. Bu apoproteinler ABC nomenklaturüne göre isimlendirilirler. Her bir lipoproteinin apoproteinini kendine özgü olarak fazlaca bulunur. HDL'nin major apoproteinini A'dır. LDL ve VLDL'ninki ise B'dir. Şilomikronlardaki apoprotein Apo B-48 olarak bilinir. Apo B-100 olarak bilinen LDL ve VLDL de bulunanın %48'i kadar küçüktür. Bu nedenle bu isim verilmiştir. Apo B-48 barsaklarda, Apo B-100

karaciğerde sentez edilir. Apo B, apoproteinler içinde en uzun polipeptid zincirine sahip olanıdır. 4536 aminoasit içerir. Apo B-48 ile aynı mRNA'dan sentezlenir. Apo B'nin karbonhidrat kısmı molekülün %5'ni oluşturur. Bu yapı içinde mannoz, galaktoz, fukoz, glukoz, glukozamine ve sialik asid vardır (81,100).

Apo-C çeşitli altgruplar içerir. Molekül yapısı olarak Apo B'ye göre daha küçüktür. Lipoproteinler arasında serbestçe dolanabilir.

Apoproteinlerin görevleri şöyle sıralanabilir:

- Enzim kofaktörleridir.
- Lipoproteinlerin yapısının bir parçasıdır. Yani yapısal görev yapar.
- Dokulardaki lipoprotein reseptörlerine ligand görevi yapar. Yani doku reseptörleri lipoproteinleri ilgili apoproteinden tanır ve böylece lipoprotein içeriği dokuya girmiş olur. Apo B-100 ve Apo E, LDL reseptörü için ligandır. Apo A-1 ise HDL reseptörü için ligandır. Apoproteinlerin bilinen bazı özellikleri aşağıdaki gibidir:

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

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

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

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

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

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

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

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

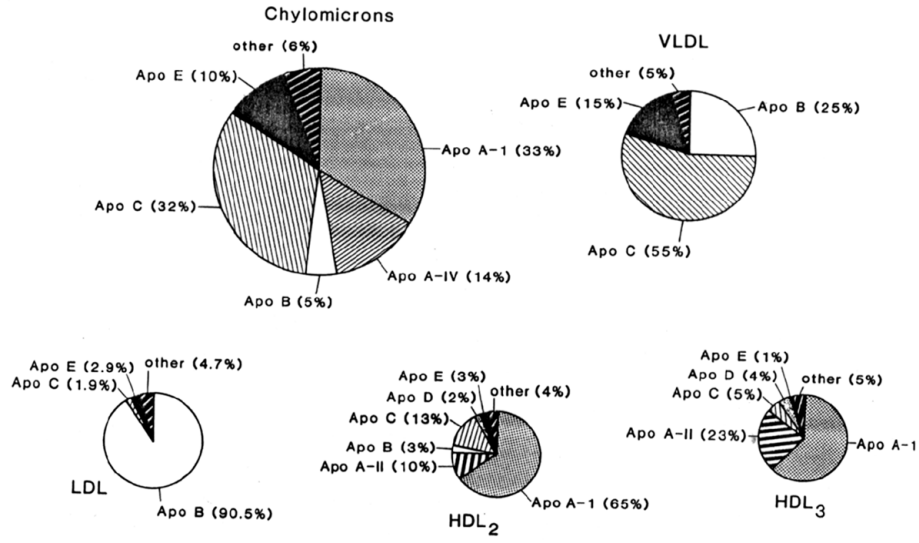
Apo D: Molekül ağırlığı 33.000'dir. HDL'de bulunur. LCAT ile ilgili olduğu sanılmaktadır.

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

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

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

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



Şekil 4.4.1: Apoproteinlerin değişik lipoproteinlerdeki dağılımı (48)

Tablo 4.4.1: Apoproteinlerin sınıflanması ve bazı özellikleri

Molekül Ağırlığı	Lipoprotein İlişkisi	Bilinen Bazı Görevleri
Apo A-1 29.016	Şilomikron HDL	HDL'nin major proteinidir. LCAT'nin aktivatörüdür.
Apo A-II 17.400	Şilomikron, HDL	HDL de bulunur. Hepatik lipazı uyarır.
Apo A-IV 46.000	Şilomikron, HDL	TG ile ilgilidir.
Apo B-48 241.000	Şilomikron	Şilomikronlarda bulunur. Apo B-100 geninden türer.
Apo B-100 513.000	VLDL, IDL, LDL	LDL'nin major proteinidir. LDL reseptörüne bağlanır. İnsanda bilinen en uzun proteindir.
Apo C-1 7.600	Şilomikron, VLDL, IDL, HDL	LCAT'ı aktive eder.
Apo C-II 8.916	Şilomikron, VLDL, IDL, HDL	Lipoprotein Lipazı aktive eder.
Apo C-III 8.750	Şilomikron, VLDL, IDL, HDL	Lipoprotein Lipazı inhibe eder.
Apo D 33.000	HDL	LCAT'la ilgilidir.

Kolesterol ester transfer protein (CETP)	HDL	HDL ile ilgilidir. Kolesterol esteri transfer eder.
Apo E 34.000 çeşitli izoformları var.	Şilomikron kalıntısı, VLDL, IDL, HDL	LDL reseptörüne bağlanır. Alzheimer ile ilgilidir.
Apo H 50.000 Glikoprotein I olarak da bilinir.	Şilomikron	TG metabolizması ile ilişkilidir.
Apo (a) 19 farklı alleli var 300.000-800.000	LDL	Apo B-100'e disülfid bağı ile bağlanır ve LDL ile kompleks yapar. Lp(a) olarak isimlendirilir. Plazminojen çok benzer. Arter hastalıkları için risk faktörüdür.

4.4.2. Şilomikronlar

Şilomikronlara eksojen lipidlerin temsilcisi diyebiliriz. Çünkü diyetle alınan lipidler sindirildikten sonra barsak hücrelerine geçer ve şilomikronlar içinde paketlenerek lenf yolu ile dolaşıma salınır. Tablo 4.1'de görüldüğü gibi şilomikronların başlıca yağ içeriği trigliseridlerdir. Şilomikronların içinde bulunan apoproteinler Apo B-48 başta olmak üzere apo A-1, A-II ve A-IV'dür. Şilomikronlar lenfotik sistem aracılığı ile sol subklavia veni hizasından büyük dolaşıma boşalır. Kana geçtikten sonra şilomikronlara HDL'den Apo C-II ve Apo-E transferi yapılır, Kas ve yağ dokusu kapillerlerinde triaçilgliserollerdeki yağ asidleri, lipoprotein lipaz etkisi ile koparılır. Lipoprotein lipaz kapillerlerin endotel hücrelerinden salgılanır. Şilomikrona HDL'den geçen apo C-II fosfolipidlerin varlığında LPL'yi aktif hale geçirir. Serbestleşen yağ asidleri dokular tarafından alınır. Gliserol ise kan yolu ile böbrek ve karaciğere taşınır. Şilomikron kalıntıları karaciğerdeki hepatik şilomikron kalıntı reseptörleri aracılığı ile toplanır. Bu reseptörlerin şilomikron kalıntılarını tanımaları için apo-E gereklidir (9,62).

4.4.3. Çok düşük dansiteli lipitler (VLDL)

Çok düşük dansiteli lipidler şilomikronların aksine endojen olarak sentez edilen yağları karaciğerden, karaciğer dışı dokulara taşıyan partiküllerdir. Diyetle alınan yağ ve karbonhidratlardan ihtiyaç fazlası olanlar karaciğerde trigliseridlere dönüşür. Bu trigliseridler karaciğerde VLDL olarak paketlenir ve dolaşıma salınır. Dolaşımda; başlıca trigliseri yüklü olan bu paketler içeriğini öncelikle kas ve yağ dokusu olmak üzere diğer dokulara aktartılırlar. Bu trigliseridler bu dokularda enerji üretimi için kullanılır ya da depo olarak saklanır. VLDL partikülleri trigliseridlerin yanında; kolesterol, kolesterol esterleri ve bazı apoproteinleri içerir. VLDL’de bulunan aproteinler Apo B-100, Apo C-1, Apo C-II, Apo A-III ve Apo E’dir. VLDL’ler de şilomikronlar gibi dolaşıma geçtikten sonra HDL’den Apo C ve Apo E transferi yapar. VLDL bünyesindeki trigliseridlerde bulunan yağ asitleri aynen şilomikronlarda olduğu gibi, lipoprotein lipaz aracılığı ile yağ ve kas dokusuna geçerler. Lipoprotein lipaz aynı zamanda VLDL bünyesinde bulunan Apo C’lerin tekrar HDL’ye geçmesini sağlar. Sonuçta apoprotein C ve Trigliseridleri eksilmiş VLDL kalır. Bunlar VLDL kalıntısı veya IDL olarak bilinir. IDL yapısındaki triacilleri kaybederek LDL’ye dönüşür (13).

4.4.4. Düşük Dansiteli lipoproteinler (LDL)

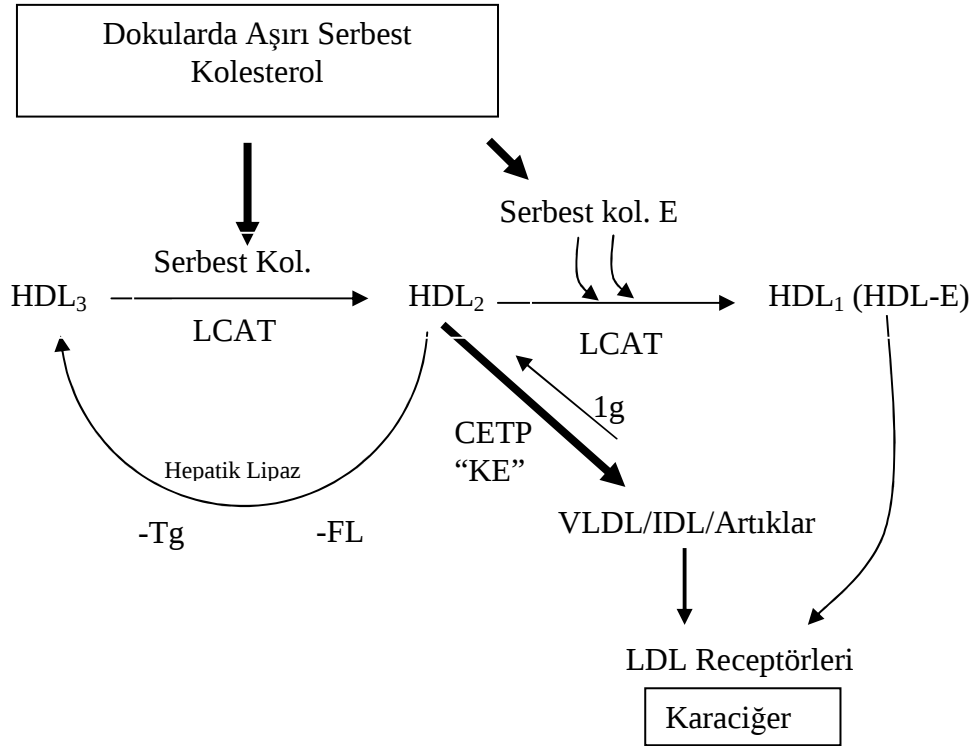
LDL dokulara kolesterol taşıyan başlıca partiküldür. Kolesterol bütün hücrelerin membranında bulunur. Dolayısıyla her hücrenin membran yapısı için kolesterole ihtiyaç vardır. Kolesterol hücre dışı kaynaklardan elde edebilir. LDL’nin dokulara taşınmasında en büyük rolü, dokudaki reseptörle etkileşen Apo B-100 oynar. LDL dokulara endositozla reseptör aracılığı ile alınır. LDL’yi alan başlıca dokular; karaciğer, adrenal dokular ve yağ dokularıdır. Endositoza uğramış hücre membranındaki LDL reseptörleri LDL partiküllerini hücre içine alır Lizozomlardan gelen asid karakterle lipazlarla LDL parçalanır ve içinde bulunan kolesterol serbestleşir. Bu kolesterolün kısmı membran yapısını yenilemek üzere membran yapısına inkorpore olur. Kolesterolün fazlası acil Koa kolesterol aciltransferaz

(ACAT) aracılığı ile tekrar esterleşerek hücrede depo edilir. Bu arada LDL içinde bulunan apoproteinler de hidroliz olur ve serbestleşen amino asitler hücre içindeki amino asit havuzuna girer. İnsülin ve tiroid hormonları LDL'nin karaciğer hücrelerine girişini arttırır. Aksine glukokortikoidler LDL'nin karaciğere girişini azaltır (13).

4.4.5. Yüksek Dansiteli Lipoproteinler (HDL)

HDL'nin başlıca sentez yeri karaciğerdir. Proteinden zengin moleküllerdir. HDL ayrıca ince barsaklarda da sentez edilir. HDL'nin başlıca proteinleri Apo A-I, C-I, C-II, ve E'dir. HDL'nin başlıca göreve bu proteinleri ile kanda dolanmak ve diğer lipoproteinlere bu proteinleri transfer etmektir. HDL karaciğerde sentez edildiğinde disk şeklinde iken, dolaşıma geçtiğinde kolesterol esterlerini içine toplar ve tombullaşarak karaciğere döner. Kolesterol esterlerinin birikimi olgunlaşmamış HDL'yi HDL₂ ve HDL₃ pozisyonuna getirir (10).

HDL küçük (70-120 Å çaplı) partiküllerdir (d=1.063-1.21 g/mL) . HDL'in başlıca iki alt grubu vardır: HDL₂ (d=1.063-1.123 g/mL) ve HDL₃ (d=1.125-1.121 g/mL). Yüksek yoğunluklu lipoproteinler yaklaşık %50 lipid (%25 fosfolipid, %15 kolesterol esterleri, %5 serbest kolesterol ve %5 trigliserid) ve %50 proteinden oluşur. Major apolipoproteinleri apo-AI(%65), apo AII (%25 ve daha az miktarda apo-C ve apo-E'dir. Apo-E, HDL'nin diğer bir alt sınıfı olan HDL₁ de az miktarda bulunan apoliproteindir. Ancak plazmadaki apo-E'nin yaklaşık %50'si HDL₁ fraksiyonunda bulunmaktadır. HDL'nin diğer alt sınıfları apo E içermez ve böylece LDL reseptörü ile etkileşmez. HDL, diğer lipoproteinlere (örneğin şilomikronlar ve VLDL) vermek üzere apo E ve apo-C için bir depo görevi görür. HDL alt grupları sadece apo-AI veya apo -AI ve apo-AII içerir. HDL α-elektroforetik mobilitate gösterir ve bu nedenle önceleri α-lipoprotein adıyla anılmıştır.(7,72)



Şekil 4.4.5: Kolesterol gereksinimi olan hücreler veya karaciğere lipid dağılımında HDL’nin rolü. Ters kolesterol yolu koyu oklarla gösterilmiştir.

HDL başlıca üç ana kaynaktan gelişir: Birincisi; karaciğerdir. Karaciğer olgunlaşmamış “HDL” adı verilen bir yapı – AI- fosfolipid disk salgılar. İkincisi, bağırsaktır. Bağırsak direkt olarak küçük bir apo – AI “HDL” partikülü sentez edebilir ve üçüncüsü, şilomikronlar ve VLDL’dir. HDL şilomikronlar ve VLDL ‘den gelen yüzey maddesinden türetilir. LPL’nin etkisi ile şilomikronlar ve VLDL, trigliseridlerden zengin çekirdeği hidrolize olur. Bu şekilde ortaya çıkan fosfolipid ve serbest kolesterolden oluşan yüzey maddesi apo- AI ile birlikte küçük HDL diskini şekillendirir (19).

HDL diskleri diğer lipoproteinlerden veya aşırı kolesterolü olan hücre membranlarından serbest kolesterol alıcılarıdır. Bu durum serbest kolesterol bakımından zenginleştirilmiş apo-AI fosfolipid disklerini meydana getirir. Lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT) kolesterolü esterleştirir. Bunun sonucunda HDL’nin çekirdeğini oluşturmaya başlayan kolesterol esterleri meydana gelir. Daha fazla kolesterol esterleştirildikçe disk HDL₃ adı verilen küçük bir partikül haline dönüşür.

HDL₃ serbest kolesterolün mükemmel alıcısıdır. Alınan ve esterleştirilen serbest kolesterol miktarı arttıkça, partikülün boytu artar ve HDL₂ meydana gelir (13,19)

HDL, özellikle HDL₃ ve olgun HDL prekürsörleri, iki farklı mekanizma ile hücrelerden kolesterolü alırlar: 1) HDL aşırı kolesterol içeren hücrelerle temasa geçer ve hücre yüzeyinden serbest kolesterolü alır. Serbest kolesterol, hücreden HDL parikülüne doğru bir fizikokimyasal konsantrasyon gradiyenti izler (aşırı kolesterol içeren hücrelerin membranında fazla olan serbest kolesterol konsantrasyonundan HDL yüzeyindeki düşük konsatrasyona). 2) HDL partikülleri hücre membranlarındaki spesifik bir proteine (HDL reseptörü) bağlandığı düşünülür. Bu olay özellikle artmış kolesterol içeriği olan hücreler için geçerlidir (13).

Yüksek yoğunluklu lipoproteinler, lipidlerin lipoproteinler ve hücreler arasında dağılımını sağlar ve ters yönlü kolesterol transportu adı verilen bir olayda yer alırlar. HDL hücrelerden kolesterolü alır ve karaciğere veya gereksinim duyan diğer hücrelere kolesterolü taşır. HDL₃, HDL₂'ye çevrilir ve daha sonra apo-E içeren minör fakat metabolik olarak aktif HDL₁'e dönüşür. HDL₁ ile ilişkili olan apo-E bu minör alt grubunu LDL reseptörleri içeren hücrelere hedefler. Bu yolla kolesterol fazlası olan hücrelerden ihtiyaç duyanlara dağıtırlar. Bu apo-E bağlantılı yol kolesterolü salgılanma için direkt olarak karaciğere verebilir. Kolesterol dağılımı için ikinci bir yol kolesterol ester transfer proteini (CETP) etkisiyle ortaya çıkar. CETP, HDL₂'den VLDL, IDL ve artıklarına kolesterol esterleri taşır. Böylece kolesterol VLDL ve şilomikron artık yolları aracılığı ile karaciğere iletilir. VLDL, IDL ve artıklara giden kolesterol ester karşılığında CETP HDL₂'ye trigliserid taşır ve böylece HDL₂ trigliseridden zengin hale gelir. CETP lipid metabolizmasında önemli bir rol oynar ve CETP etkinliğinin ateroskleroz gelişimine karşı uygunluğu veya direnci etkileyebileceğini düşündüren çok ilginç tür farklılıkları bulunmaktadır. Örneğin, insanların maymunların ve tavşanların plazmarında önemli miktarda CETP etkinliği vardır. Bunun sonucu olarak bunlar yalnızca düşük düzeylerde apo-E içeren HDL oluşturur ve dolayısıyla HDL kolesterol esterlerinin büyük kısmını düşük dansiteli lipoproteinlere vererek elden çıkarır. Sonuçta kolesterol esterlerin büyük bölümü plazmayı LDL yolu ile terk eder. Bu türler aterskleroza karşı duyarlıdır. Ve daha yüksek düzeylerde LDL içirme eğilimi gösteriler. Diğer yandan sıçanlarda, farelerde ve köpeklerde CETP etkinliği yoktur. Bunlar apo-E içeren HDL (HDL₁) oluştururlar

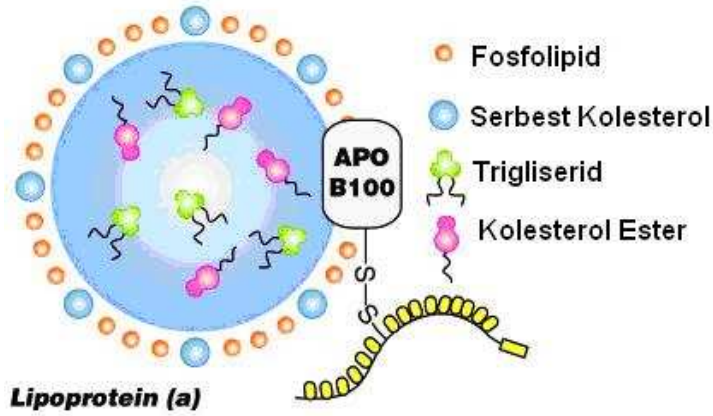
ve kolesterolü apo-E'nin aracılık ettiği yol ile doğrudan karaciğere gütürebilirler. Bu hayvanlarda LDL düzeyleri çok düşüktür ve ateroskleroz gelişimine karşı dirençlidirler (13,19).

Hepatik lipaz trigliseridleri (muhtemelen aşırı fosfolipidleri) hidroliz etmek için trigliseridden zengin HDL₂ üzerinde etki gösterir. HDL₂'yi serbest kolesterol için alıcı işlevi gören HDL₃'e dönüştürür. Böylece HDL₂-HDL₃ siklusu devam eder. HDL₂ düzeyleri koroner ateroskleroz görülme sıklığı ile ters ilişkilidir, çünkü onlar dokulardan kolesterolün temizlenme etkinliğini yansıtır. Sadece apoA-I içeren HDL ateroskleroza karşı koruyucudur, oysa apo A-II ve apo A-I içeren HDL etkili değildir. HDL₁ diyetle uyarılmış hiperkolesterolemik hayvanların kanında bulunur. HDL₁ kolesterolden zengindir ve tek apolipoproteini apo E'dir.(13,19)

HDL katabolizması tam olarak anlaşılmamıştır ve kompleks olduğu düşünülmektedir. HDL'nin spesifik lipid parçaları bütün HDL molekülü bozulmaksızın hücreler tarafından alınabilir. Örneğin; kolesterol esterleri partikülden "selektif uptake" ile ve karaciğer, adrenal bezler ve overler gibi çeşitli dokulara taşınır. Hepatik lipazın partiküllerdeki fosfolipidleri hidroliz ederek ve partikülden hücreye kolesterol transferini sağlayan kimyasal bir gradyan yaratarak HDL'den selektif kolesterol alımı yaptığı düşünülmektedir.(13)

4.4.6. Lipoprotein (a)

Lipoprotein (a) LP(a); LDL kolesterol gibi kolesterol esterlerinden zengin bir lipoproteindir. Fakat farklı genetik özelliklere sahiptir. 1963 yılında keşfedilen bu lipoproteinin koroner arter hastalıkları ve serebrovasküler ateroskleroz ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (28).

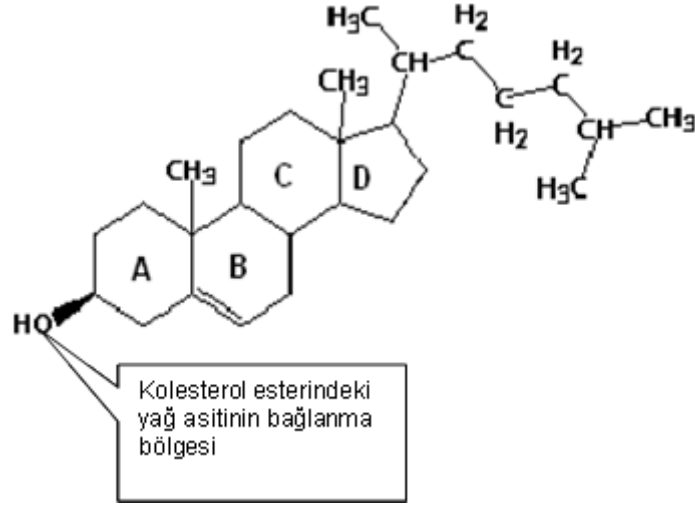


Şekil 4.4.6: Lipoprotein (a)'nın genel yapısı (13)

LP(a) şekilde görüldüğü gibi, iki komponentten oluşur. Bunlardan biri LDL partikülü diğeri ise, LDL'ye bağlanmış hidrofilik bir glikoproteindir. Lp(a)'nın yapısında bulunan Apo (a), LDL yapısında bulunan apo B-100'e tek bir disülfid bağı ile bağlanmıştır. Lp(a)'nın dansitesi 1.027–1.100 arasında oldukça yüksektir. Kütlesi $4.6-5.6 \times 10^6$ daltondur. Lp(a)'nın lipid kompozisyonu LDL'ye benzer fakat karbonhidrat içeriği LDL'den 4 kat daha fazladır (28).

4.5. Kolesterol ve LDL kolesterol

Kolesterol sırasıyla A, B, C, D olarak numaralanmış 3 tane kondanse olmuş 6'lı halkaya, bir tane 5 karbonlu halka ilave olmuştur. Siklopentanoperhidrofenantren halkası olarak bu yapının 5 ve 6. pozisyonunda bir çift bağ, 3. pozisyonunda bir hidroksil grubu, 17. karbondan 8 zincirli bir yan yol bulunmuştur. Toplam 27 karbonu vardır. Kolesteroldeki hidroksil grubu bir yağ asidi ile esterleşmişse “esterkolesterol”, esterleşmemişse “serbest kolesterol” adını alır. Bu her iki kolesterol de daima serumdaki proteinlere (lipoproteinlere) bağlı olarak bulunur (98).



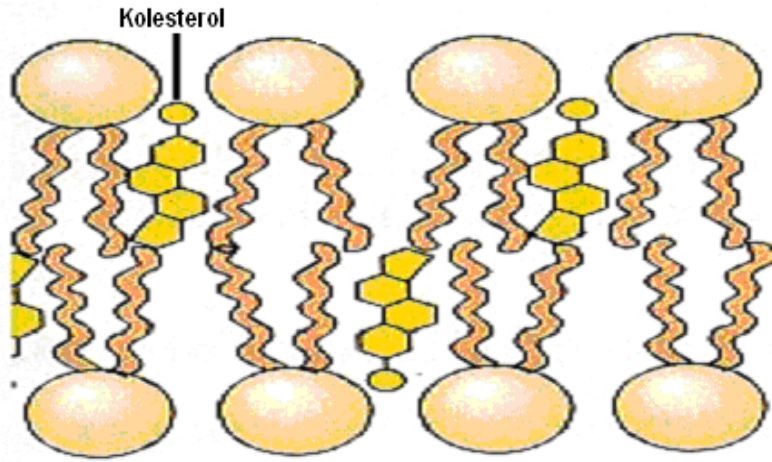
Şekil 4.5 (a): Kolesterolün moleküler yapısı

Kolesterol organizmanın en önemli biyolojik moleküllerinden olup, birçok yapısal ve fonksiyonel görevleri vardır :

- Hücre membranlarının yapısında önemli yer tutar.
- Steroid yapıli hormonların ve D vitamininin ön maddesidir.
- Membranların erime noktasını azaltır, akışkanlığını artırır.
- Yıkım ürünü olan safra asitleri, yağların sindirimi için gereklidir.
- Kolesterol hem dışardan diyetle alınır, hem de organizmada de novo sentez edilir.
- Kanda lipoprotein partikülleri ile taşınır.
- Hücrelerde saklanım şekli kolesterol esterleri şeklindedir.
- Eritrosit ve trombosit gibi çekirdeği olmayan hücrelerin dışında bütün hücrelerde, özellikle karaciğer hücrelerinde fazlaca sentezlenir.

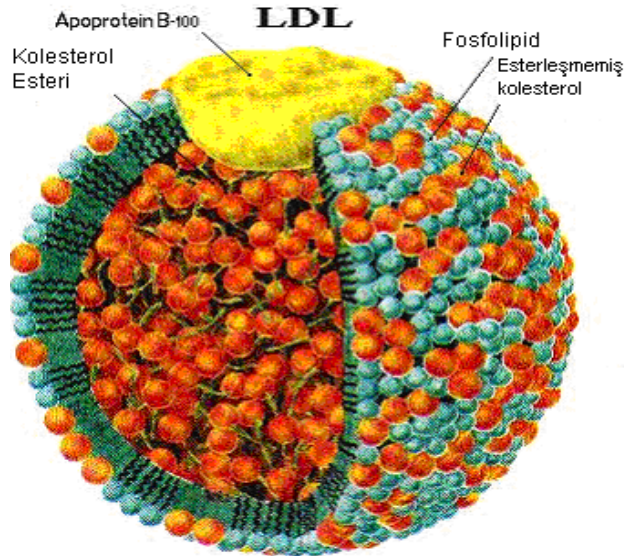
Kolesterol dengesini anlamak için hiperkolesterolemi gerekli bir ortamdır. Suda çözünmediği için uzun süre kanda yüksek olarak kalan kolesterol damar duvarında birikir. Bu birikimler dengelenmez ise, damar duvarında aterosklerotik plak gelişimine ve buna bağlı olarak bazen tıkanan bu damarlar infarktüs, inme gibi hastalıklara neden olur. Ailesel hiperkolesterolemiye sahip kişilerde, erken yaşta

ateroskleroz geliştiği ve genellikle 20 yaşından önce kalp hastalığı nedeni ile hayatlarını kaybettiği bilinir (92).



Şekil 4.5 (b): Kolesterolün hücre membranında duruş şekli (37)

Kolesterol, LDL aracılığıyla plazmadan dokulara taşınır. HDL aracılığıyla ters transportla kandan kolesterol alınıp karaciğere taşınır. LDL ve HDL kandaki ve hücre içindeki kolesterol ayarlanması için gerekli olan lipoproteinlerdir.



Şekil 4.5 (c): LDL partikülünün şematik görünümü (31)

LDL partikülü kolesterolün kandaki en büyük taşıyıcısından biridir. Şekil 4.5 (c)'de görüldüğü gibi LDL'nin orta bölgesinde kolesterol esterleri ve trigliseridlerden oluşan bir lipid bölümü ve etrafında fosfolipid, serbest kolesterol ve apolipoprotein

B-100 vardır. LDL içeriği şöyledir; kolesterol esterleri “%40-44”, fosfolipidler “%20-24” (başlıca fosfatidilkolin ve sfingomyelin), protein “%21-26”, serbest kolesterol “%10” ve trigliserid “%3-5”den oluşur(37,92).

4.5.1. LDL ve Kolesterol metabolizması

LDL partiküllerinin birinci görevi periferik dokulara kolesterol sağlamaktır. Bunu hücre yüzeyinde apolipoprotein B-100’ü tanıyan reseptörlere bağlanarak gerçekleştirirler. LDL partiküllerinin hücre içine alımı ve yıkımı aşağıdaki şekilde gösterilmiştir (37). [Not: Parantez içerisindeki belirtilen numaralar şekildeki numaralara karşılık gelmektedir.]

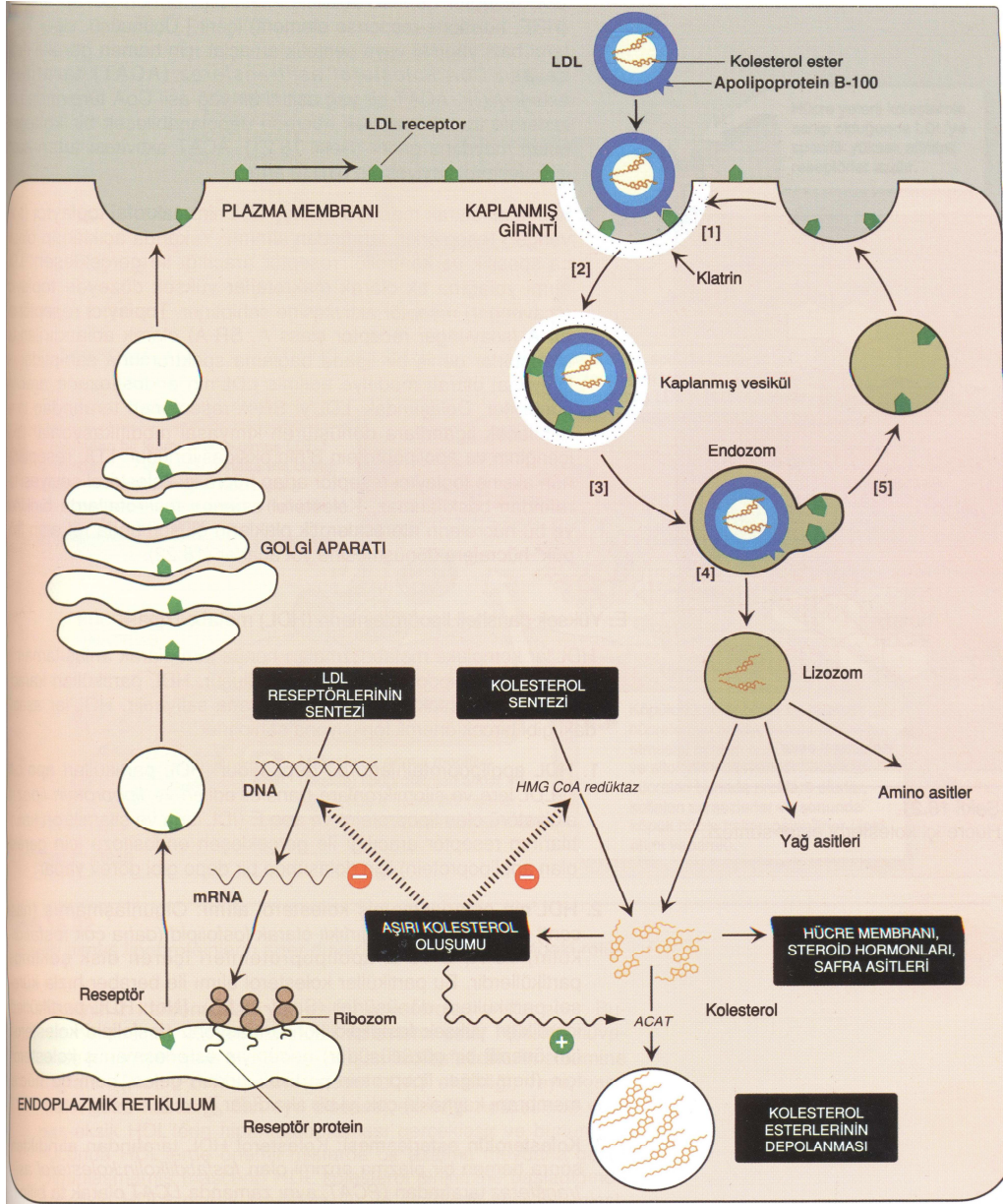
[1] LDL reseptörleri hücre membranı üzerindeki girintilerde kümelenmiş negatif yüklü glikoproteinlerdir. Bu girintinin hücre içine bakan tarafı girintinin şeklini muhafaza eden klatrin proteini ile kaplıdır.

[2] Bağlanma sonrasında LDL-reseptör kompleksi endositoz ile hücre içersine alınır. LDL reseptörlerinde herhangi bir bozukluk olması halinde plazmadaki kolesterol seviyesinde önemli bir artış görülür. Bu tür bozukluğa sahip hastalarda tip II hiperlipidemi (ailesel hiperkolesterolemi) ve prematüre ateroskleroz görülür.

[3] LDL içeren vezikül hızla klatrin kaplamasını kaybeder ve endozom adı verilen daha büyük vezikülleri oluşturmak üzere diğer veziküllerle birleşir.

[4] Endozomun pH’sının düşmesi neticesinde (endozomal ATPaz’ın proton pompası aktivitesinden dolayı) LDL reseptöründen ayrılır. Reseptör daha sonra endozomun bir kenarına doğru hareketlenirken LDL’ler vezikül lümeninde serbest olarak kalırlar.

[5] Reseptörler geri dönüşüm yoluyla yeniden kullanılabilirler, oysa veziküldeki lioprotein kalıntıları lizozomlara transfer edilirler ve lizozomal (hidrolitik) enzimler tarafından yıkılırlar. Bu yıkılım neticesinde serbest kolesterol, amino asitler, yağ asitleri ve fosfolipidler salınırlar. (Not: Lizozomlardaki kolesteronun hidrolizinde (Wolman Hastalığı) veya esterleşmemiş kolesterolün lizozomun dışına taşınmasında (Niemann-Pick hastalığı, tip C) eksikliğe neden olan otozomal çekinik bozukluklar belirlenmiştir.



Şekil 4.5.1: LDL'nin hücreye alımı ve yıkımı. ACAT= asil CoA kolesterol asiltransferaz (37)

Kolesterolün, karaciğer dışı dokular, kan ve karaciğer arasında dolanımı ile hem kandaki hem de hücre içindeki kolesterol miktarı düzenlenmiş olmaktadır. Bu regülasyonda rol oynayan başlıca etkenler HDL, LDL gibi lipoprotein partikülleri ve bu partiküller arasındaki değişimi sağlayan enzimlerdir. Ayrıca bu enzimler için aktivatör rolü oynayan ve de hücrelerdeki reseptörlere bağlanmak için gerekli olan

apoproteinler de kolesterol düzenlenmesi için gereklidir. Lipoproteinler, enzimler, apoproteinler ve bunlarla ilgili dokularda yapısal bir bozukluk yok ise, sözü edilen bu parametreler arasındaki ilişkiler dengeli ise, kandaki kolesterolün de dengeli olduğu ve arterlerde aterosklerotik lezyonların olmadığı görülür.

Kan ve dokulardaki kolesterol metabolizması ateroskleroz gelişmesinde önemli bir yere sahiptir. Şimdiye kadar yapılan bazı çalışmaların sonuçları göz önüne alınarak, LDL ile taşınan kolesterolün ateroskleroz gelişiminde ve damarı tıkayan fibröz plak oluşumunda büyük öneme sahip olduğu gösterilmiştir. Kandaki yüksek LDL miktarları ateroskleroz oluşumunu hızlandırmaktadır.

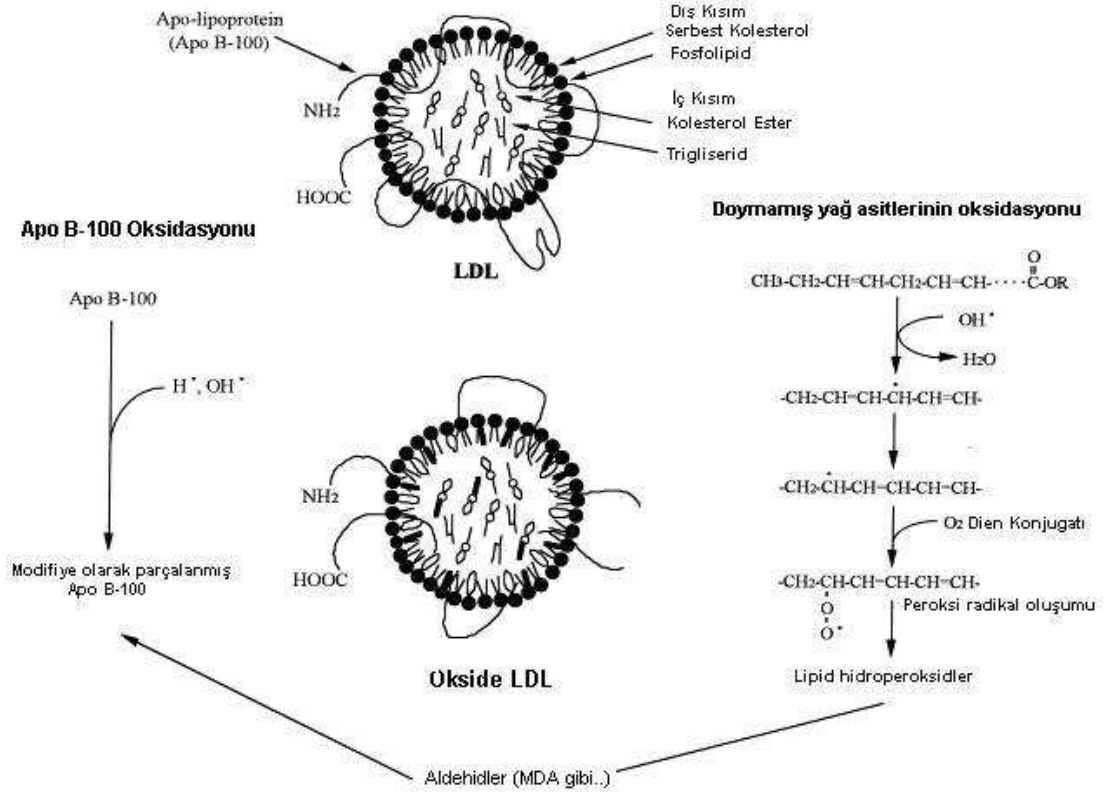
LDL'ler normal olması gereken miktarlarda LDL reseptörleri tarafından alındığında kolesterolün fazlası birikmez. Ancak aterosklerozda makrofajlara giren LDL reseptör aracılığı ile kontrollü girmedikleri için böyle bir feed-back etkisi yoktur ve sınırsız birikim hücreyi köpük görünümüne çevirir (37,92).

4.6. LDL Kolesterolün Ateroskleroz Patogenezindeki Rolü

Ateroskleroz oluşumunda pek çok etken vardır. LDL kolestereol bu etkenler arasında önemli bir yer tutar. LDL belirli bir konsantrasyona bağlı olarak plazmadan subendotel boşluğun içine düfüze olur. LDL oksidatif strese maruz kalarak modifiye olur ve aterosklerozun patogenezini için kesin olduğuna inanılan yeni özellikler kazanır.

Oksidlenmiş LDL ateroskleroz ve ateroskleroz ile ilgili hastalıklara maruz kalmış kişilerin kanlarında görüldüğü için bu yapının ateroskleroz patogenezinde önemli olduğu düşünülmüş ve araştırmaların kaynağı olmuştur.

Lipoprotein modifikasyonunun mekanizması henüz net anlaşılmamakla beraber; LDL partikülü içinde bulunan lipidlerden özellikle fosfolipidler ve içinde poliansature yağ asitlerini (PUFA) barındıran kolesterol esterlerinin peroksidasyonu, lipoprotein modifikasyonunda önemli bir ipucudur.



Şekil 4.6. LDL içindeki doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu, MDA'nin meydana gelişi ve Apo-B oksidasyonu (102)

Yukarıdaki şekilde (şekil 4.6) görüldüğü gibi moleküler değişim ve hidrojen girişi sonucu dien grubu meydana gelince oksijen varlığında peroksi radikali ortaya çıkar. Bu reaksiyonu otokatalitik reaksiyonlar takip eder ve hidroperoksitler meydana gelir. LDL partikülünün lipidlerinde meydana gelen bu değişimden LDL'nin major proteini Apo-B oksidasyon nedeniyle parçalanmaya başlar. Metal katalizli reaksiyonlarda yağ asidi hidroperoksitleri aldehidlere dönüştür. Malondialdehid bunlardan biridir. Bu aldehidler proteinlerdeki lizinin epsilon amino grubu ile reaksiyona girerek Schiff bazlarını oluşturur. Böylece LDL partikülünde negatif yükler oluştuğu için modifiyakasyon meydana gelmiş olur. Bu nedenle ortamda serbest radikallerin oluşu, süperoksit anyonu gibi reaktif oksijen türleri, lipooksijenaz enzimleri, myeloperoksitaz, glukozun fazlası LDL modifikasyonu için ortam hazırlar. Ayrıca Fe, Cu gibi metal iyonlarının da LDL modifikasyonu için ortam sağladığı bilinmektedir. Prostanoid metabolizması sonucunda da ortaya çıkan MDA da lipid modifikasyonuna neden olabilir.

Bütün bu reaksiyonların sonucunda modifiye olmuş LDL normalden farklı davranış gösterir. Dokudaki LDL reseptörleri tarafından tanınmadığı için makrofajlar tarafından toplanır ve aterosklerotik plağı oluşturan köpük hücrelerine döner. Bu mekanizmalar ateroskleroz patogenezinin lipit yönünden temelini teşkil etmektedir. (40,43,96)

4.6.1. LDL Modifikasyonu ve İntimaya Geçiş

LDL modifikasyonunun mekanizması ve yeri hakkında bilgiler de çok çeşitlidir. Modifikasyonun çeşidi ve başlaması damar lümeninde olduğu gibi lümeninden intimaya geçişte de olabilmektedir. İntimaya geçişin nedeni okside olan LDL mi? Endotelde başka nedenlerle meydana gelen hasar mı? Yoksa intimada GAG'ların LDL'ye olan afinitesinden doğan yaklaşımı mı? Sebebi bilinen veya bilinmeyen çeşitli nedenlerle kandaki hemodinamik Güçlerin değişmesi ile ön plana çıkan çeşitli enflamasyon, hemostaz ve adhezyon molekülleri mi? Bu karmaşık mekanizmalar günümüzde net çözüm bekleyen konulardır (70).

Oksidatif stres veya başka nedenlerle endoteldeki hemodinamik güçlerin değişmesi, modifiye veya normalden farklı yapıda okside LDL arter lümeninde birikir ve endoteilin LDL'ye karşı geçirgenliğini artıran bir dizi olaylar serisi başlar.

LDL arter duvarının 3 ana hücresinde okside olabilir. Bunlar; Endotel hücreleri, monosit-makrofajlar ve arteriyal düz kas hücreleridir. Vitamin C gibi suda ve probucol, vitamin E gibi lipide çözünen antioksidanlar LDL'nin oksidatif modifikasyondan korunmasını sağlarlar.

Kanda dolaşan LDL partikülleri, endotel hasarını takiben endotelden intimaya geçme fırsatını bulur. Endotel hasarı bu geçişi hızlandırır. Çünkü normalde lipoproteinlerin endoteli geçmesini önleyen bir bariyer vardır.

Buna rağmen endoteli aşarak intimaya giren LDL partikülleri özellikle GAG tarafından tutulur. Çünkü GAG'ların LDL, IDL ve VLDL'nin yapısında bulunan Apo B-100'e afinitesi vardır. Şilomikron da Apo B içerir fakat şilomikronlar lipoprotein lipazın etkisi ile normal şartlarda yağ asitlerine dönüşmektedir.

hücrelerinin büyük bir kısmı makrofajlardan oluşmaktadır. Az bir kısmı da düz kas hücrelerinden oluşabilir (79).

LDL'ler normal olması gereken şartlarda yani dokular, LDL reseptörleri tarafından alındığında, LDL'den salınan kolesterol molekülleri yeni LDL reseptörlerin oluşumunu inhibe ederler ve kolesterolün fazlası hücrede birikmez.

Hâlbuki makrofajlara giren LDL reseptör aracılığı ile kontrollü girmedikleri için böyle bir feedback etkisi yoktur. Ve sınırsız birikim devam eder. Bu kontrolsüz birikim hücreyi köpük görünümüne çevirir. Bu görünüme köpük hücre denmesinin nedeni budur.

Ateroskleroz gelişiminde ikinci önemli basamak enflamasyon hücrelerinin arter endoteline bağlanması ve bu hücrelerin intimaya göç etmesidir. Lipoprotein depolanmasının enflamatuvar hücre toplanması için gerekli olduğu düşünülmektedir. Doğal formlarındaki lipoproteinler enflamatuvar reaksiyonu başlatmazlar.

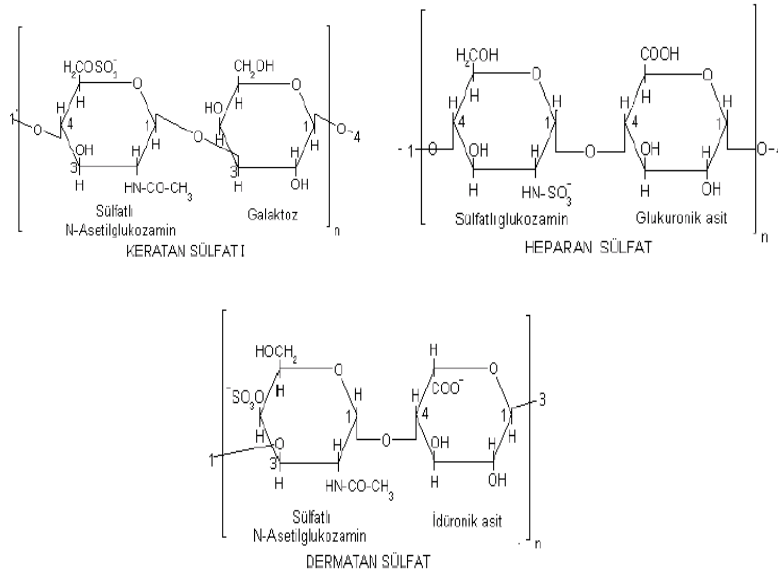
Bu nedenle Ox-LDL oluşumunu takip eden ikinci önemli nokta, enflamasyon hücrelerinin arter endoteline bağlanması ve bu hücrelerin intimaya göç etmesidir. Burada VCAM (vasküler hücre adhezyon molekülü), enflamasyon hücrelerini endotel lümeninden intimaya geçmesini sağlar. Bu adhezyon moleküllerinin yapısı immunglobuline benzer yapı içerdiği için immunglobulin superfamily adhezyon reseptörleri diye de anılmaktadır.

İntimaya geçen monositler makrofajlara dönüşür ve Ox-LDL'leri toplayarak köpük hücrelerin dönüşür. Bu arada arteriyel düz kas hücrelerinden (ASMC) ve makrofajlardan çeşitli sitokinler ve büyüme faktörleri salgılanmaya başlar.

Damar endoteli bir taraftan makrofaj, bir taraftan trombosit diğer taraftan düz kas hücrelerinin ve kendisinin bizzat salgıladığı çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerle karşı karşıyadır. Bu arada aktifleşmiş T lenfositlerinin hücre proliferasyonunu inhibe eden interferonu salgıladığı gösterilmiştir. Diğer etkileri de göz önüne alındığında interferonun aterogenezi lokal olarak inhibe ettiği düşünülmektedir. ICAM-1 aterosklerotik lezyonlarda immunohistokimyasal yöntemlerle tespit edilmiştir (68,82,86,93).

VCAM–1 endotel hücrelerinde sentez edilir. VCAM–1 hem Watanbe heritable hiperlipidemisinde hem de, kolesterol ile beslenmiş insan ve tavşanların arteryal endotelinde imminohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Kolesterol ile beslenen tavşanlarda arteryal intimadaki VCAM–1 ekspresyonunun, mononükleer enflamasyon hücrelerinin intimaya ulaşmasından önce yapıldığı gösterilmiştir. Bu durum plazma kolesterolünün yükselmesi ile birlikte, mononükleer enflamasyon hücrelerinin intimaya geçmesinin hızlanması hipotezi ile paralellik göstermektedir. Son yıllarda LDL oksidasyonunun erken ürünü olan lizofosfatidil kolinin endotel hücrelerinde VCAM-1'in sentezini hızlandırdığı da gösterilmiştir. LDL ve aterosklerotik plak oluşum safhalarını şöyle sıralayabiliriz:

- LDL'nın arter duvarına infiltrasyonu
- LDL'nin arter duvarında tutunması
- LDL'nin modifikasyonu
- Modifiye olmuş LDL'nin makrofajlar tarafından alınması
- Köpük hücrelerinin meydana gelmesi
- Yağlı çizgilerin oluşumu
- Yağlı çizgilerin fibröz plaklara dönüşmesi
- Damar lümeninin daralması ve kan akımının zorlanması
- Fiziki nedenlerden dolayı hemostazın tetiklenmesi ve trombus oluşumu.



Şekil 4.6.2: Çeşitli glukozaminoglikan molekülleri

Son yıllarda ateroskleroz patogeneğinde üzerinde durulan konulardan biride endotel hasarından sonra yeniden teşekkül eden intimada Kondroitin sülfat (KS) ve LDL miktarında görülen artıştır. Düz kas hücrelerinin (SMC) proliferasyonunu inhibe eden heparin sülfat (HS) miktarı lezyonlu bölgede azalma göstermiştir.

Endotel hasarını takiben arter duvarında LDL'nin birikmesi düz kas hücrelerinin proliferasyonu ile KS artışına, bu artış da dolaylı olarak arter duvarında GAG-LDL kompleksi oluşumna neden olacaktır. Proliferasyona uğrayan düz kas hücreleri çok sayıda KS ürettiği için, aterosklerozda meydana gelen lezyonlarda LDL-KS kompleksinin olduğu bildirilmektedir.

Makrofaj kültürlerinde LDL-PG kompleksinin fagositozda kolayca makrofajlara girebildiği gösterilmiştir. Buradan LDL'nin kondroitin sülfata bağlanmasının makrofaj tarafından lipoprotein alımını kolaylaştırdığı düşünülmektedir (23).

Arter yapısında heparan sülfat proteoglikanların (HS-PG) önemi üzerinde pek çok çalışmalar yapılmıştır ve günümüzde bunların çoğu anlaşılmış ve uygulama safhasına da girmiştir. Heparan sülfat proteoglikanının damar yapısındaki biyolojik özellikleri şöyle özetlenebilir:

Endotelin luminal yüzeyindeki heparan sülfat dolaşan kandaki lipoproteinlerin yapısında buluna trigliseridleri hidroliz eden lipoprotein lipaza (LPL) bağlanır.

LPL diğer taraftan hücre yüzeyindeki heparan sülfata bağlanarak LDL ve LP(a)'nın alınmasını sağlar.

Heparan sülfat hücrelerin migrasyonunu inhibe eder. Heparan sülfat Antitrombin III (AT III)'e bağlanıp onu aktiveştirerek hemostazda önemli bir görev yapar. Çünkü AT III'ün aktivasyonu ile trombin ve buna bağlı olarak fibrin oluşumu yavaşlar veya olmaz. Hemostazda önemi olan trombopondin gibi çeşitli moleküllere HS'nin etkili olduğu görülmüştür. Bazal membranda bulunan HS buradaki büyüme faktörlerinde etkilidir.

Lipazlar, proteaz inhibitörleri, ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin transkripsiyon faktörlerindeki GAG ile bağlanan yerdeki amino asid dizileri benzer yapıdadır. Bu bağlanma yerlerindeki amino asidlerde dizilim defekt olduğunda ilgili proteinde fonksiyon bozukluğu görülür. Bugün artık GAG ve PG'ların hücresel işlevlerinin özellikle büyüme ve farklılaşma üzerine etkili olduğu kabul edilmektedir. Ancak bu görevi nasıl sürdürdüğü hakkında bilgiler yeterli değildir (20,23, 45,87).

4.7. Sialik Asid ve LDL

Son yıllarda yapılan çalışmalar serumdaki total sialik asid ölçümlerinin koroner arter hastalıkları için risk faktörü olduğunu bildirmektedir. Sialik asid nöraminik asidin asetilenmiş türevidir. Sialik asid glikoprotein ve glikolipidlerin indirgenmeyen uçlarında terminal komponent olarak bulunur. LDL kolesterolun desializasyonunun ateroskleroz gelişiminde önemli olduğu ileri sürülmüştür. Kimi araştırmacılara göre sialik asid endotel hücreleri için koruyucu bir role sahiptir. Sialik asid birçok fizyolojik olaylarda etkindir. Hücrelerin birbiri ile interaksyonu, hücre proliferasyonunda sialik asidin önemli fonksiyonu vardır. Bu özelliklerine dayanılarak sialik asid akut faz reaktanı olarak da kabul edilmektedir. Özetle, çeşitli araştırmacılar sialik asidin kardiovasküler mortaliti ile ciddi bir ilişkisi olduğunu, aterosklerozda belirleyici olduğunu bildirmişlerdir (14,76).

4.8. Lipid Peroksidasyonu ve Ateroskleroz

LDL'in modifikasyona uğramasında lipid peroksidasyonu önem taşır. Pek çok hastalığın gelişmesinde rol oynayan lipid peroksidasyonu çok doymamış yağ asitleri içeren yağların, serbest oksijen radikalleri tarafından oksidatif olarak bozulmasıdır. Hücre membranlarında bulunan çeşitli çok doymamış yağ asitleri böyle bir bozulma reaksiyonu ile peroksidlere, aldehidlere, alkollere, hidroksi yağ asitlerine dönüşürler. Yani serbest oksijen radikallerinin bulunduğu ortamlarda hücredeki moleküller ve hücrenin çeşitli organelleri zarar görür bazılarını şöyle sıralayabiliriz: Membran hasarı görülür, DNA hasarı görülür, hücre içi organların membranları zarar görür, mitokondri organelleri zarar görür, enzimler ve enzim olmayan çeşitli proteinler zarar görür (33,67).

4.8.1. Serbest Radikaller

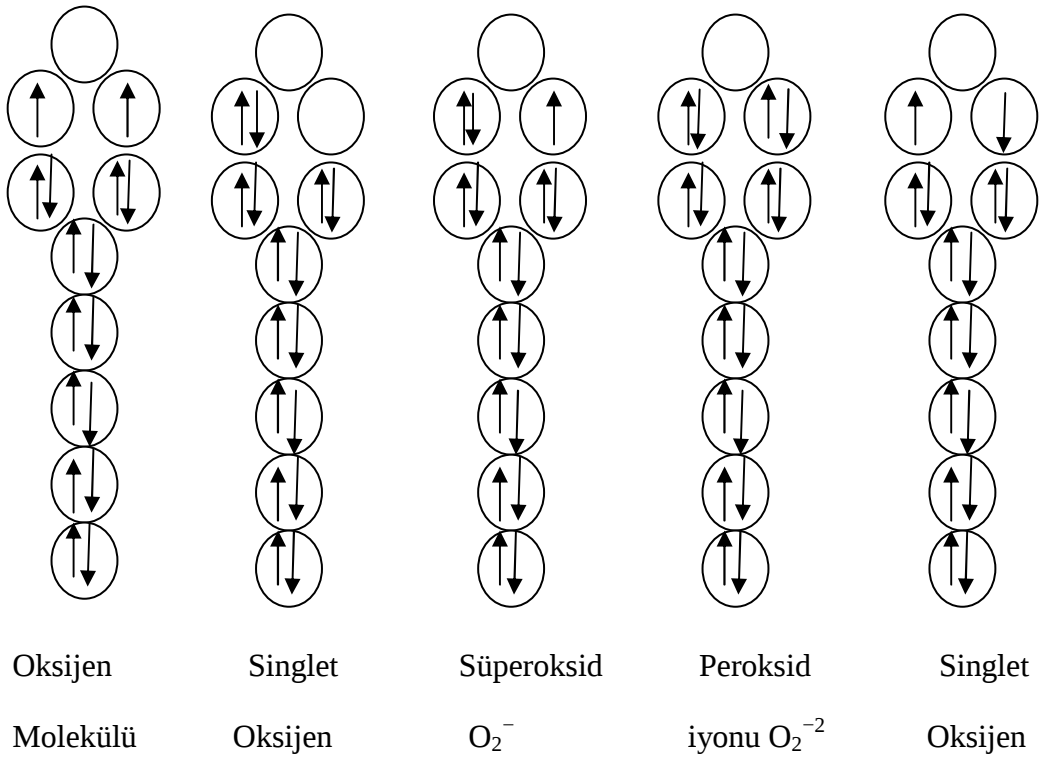
Serbest radikaller elektron düzenleri bozulduğu için kararlılıklarını kaybetmiş ve bu yüzden reaktif hal almış atom veya molekül formlarıdır. Stabil bir molekülde elektronlar, dış orbitalde çift olarak bulunmakta, böylece her bir elektronun zıt spine sahip bir eşinin olması sağlanarak kararlı bir yapı oluşturmaktadır. Eğer son yörüngedeki orbital elektron alırsa veya kaybederse yani atom veya molekül bir veya daha çok sayıda çiftlenmemiş elektron taşır hale gelirse, yapı artık bir serbest radikal halini almakta ve manyetik momentum göstermektedir. Serbest radikaller pozitif veya negatif yüklü veya yüksüz olarak bulunabilmekte, hem oksidan hem de redüktan olarak görev yapabilmektedirler. Serbest radikallerin olumsuz etkilerinin yanında fizyolojik görevleri de vardır. Enerji üretiminde, ovulasyonda ve fagositozda, intrasellüler sinyallerle düzenlenen hücre fonksiyonlarında serbest radikallerin gerekli olduğu bildirilmiştir (8,52).

4.8.2. Oksijenin Radikal Biyokimyasındaki Yeri

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

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

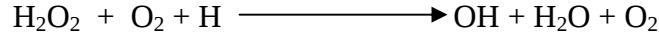
Atom numarası 8 olan oksijen atomunda 8 elektron bulunmaktadır. (Bir oksijen molekülünde $2 \times 8 = 16$ oksijen bulunur). Oksijen molekülünde aynı yönde dönen iki elektrona sahip 2P son orbitali önemlidir. Bu orbitallerdeki elektron değişimleri veya farklı yönlerde dönmeler singlet oksijen adı verilen şekilde görüleceği gibi normalden farklı olması ile oksijen radikalleri oluşur. Oksijenin 2P orbitalinde eşleşmemiş elektronlar veya ters dönüşlü elektronlar oksidan molekülleri oluşturur (23).



Şekil 4.8.2: Oksijen molekülünün elektron sayısı ve oluşan oksidan moleküller (23).

Yukarıda söylendiği gibi oksijen soluyan canlılarda oksijene bağlı olarak meydana gelen reaksiyonlar nedeni ile oksidan moleküllerinden kaçmak mümkün değildir. En reaktif ve toksik etkili oksijen radikali hidroksil radikaldır. Doğal olarak

organizmada meydana gelen hidrojen peroksit ile reaktif oksijen arasında meydana gelir.



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

4.8.3. Nitrik Oksit (NO)

Hücrede metabolizma sırasında meydana gelen serbest radikallerden biri de NO'dur. Nitrik oksidin LDL oksidasyonunda etkin olduğu bildirilmiştir (38) . Nitrik oksidin metabolizmada çeşitli diğer özellikleri aşağıda özetlenmiştir.

NO oldukça reaktif bir özelliğe sahip olan gaz yapılı özelliği ile hem güçlü vazodilatör, hem de trombosit agregasyonu inhibitörüdür. NO endotel hücrelerinin vazodilatasyonuna sebep olur, ayrıca trombosit fonksiyonlarını inhibe edici etkisi vardır. Nitrik oksit renksiz bir gazdır. Suda az çözünür. Oksijene afinitesi fazladır, nitrojen dioksit meydana getirir. Yarılma ömrü 6 saniyedir. Stabil bir katyona, (NO⁺) dönüşür. NO hücre içi mesaj veren ve gaz özelliğinde olan yegâne bileşiktir. Nitrik Oksit ilk keşfedildiği zaman endotelden türeyen relaktif faktör (EDRF) olarak isimlendirilmiştir. Çünkü gerçekten endotel hücrelerinde vazodilatasyona neden olur ve damar tonusünü ayarlar, bu esnada da trombosit agregasyonunu inhibe eder.

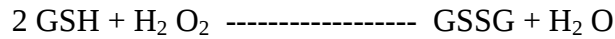
NO'nun meydana gelişini sağlayan enzim olan NOS'un da iki formu olduğu görülmüştür. Bunlardan biri devamlı olarak sentez edilir. Ca⁺⁺ iyonları ve kalmodulin ile düzenlendiği bilinir. İkinci NOS ise sitokinle uyarılır ve posttranskripsiyonal olarak düzenlenir. Trombin uyarısı ile meydana gelen trombosit agregasyonu ve serotonin sekresyonu endotelden salınan NO ile bloke olur. NO'nun bu etkisi aspirin ile ortadan kalkmaz. Çünkü bu etki prostanoidler aracılığı ile gerçekleşmez. NO'nin trombosit sekresyonuna inhibisyon etkisi P selektin ile ayarlanır. NO aynı zamanda lökositlerin endotel hücre yüzeyine adezyonunu inhibe eder. Düz kas hücre migrasyonu da NO tarafından inhibe edilir. Böylece düz kas hücre proliferasyonunda azalma görülür. Bu özellikleri ile NO damar yaralanmasına cevap veren endotelin major komponentlerinden biri olarak kabul edilir (38,66).

4.8.4. Antioksidan Sistemler

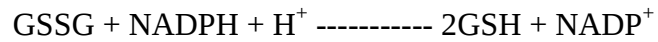
Hücre hasarının önlenmesinde antioksidanların önemli görevi vardır. Antioksidanlar superoksidler, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerinin oluşturdukları hasara karşı koruyucudurlar. Antioksidanlar reaktif oksijen türlerini temizlemek veya okside bileşikleri indirgemek yoluyla işlev yaparlar. Antioksidan moleküller serbest radikaller ile etkileşime girerek zincir reaksiyonunu sonra erdirirler, kendi elektronlarını vermek suretiyle serbest radikalleri nötralize ederler ve hayati molekülleri hasardan korurlar. Doğal antioksidanlar; enzimatik olanlar ve enzimatik olmayanlar olmak üzere gruplandırılırlar. Superoksid dismutaz (SOD), katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon s transferaz mitokondiral sitokrom oksidaz enzim özelliği gösteren önemli antioksidanlardır. E vitamini, karotenoidler ve retinol, ubikinon, C vitamini, melatonin enzim olmayan antioksidanlardır. Katabolik son ürün olan bilirubin albumine bağlı yağ asitlerini lipid peroksidasyona karşı koruyan önemli antioksidan moleküllerden biridir. Ayrıca; ürik asid, seruloplazmin, transferin, ferritin, albumin, heptoglobulin-hemopeksin plazmada bulunan antioksidanlar arasında yer alır (1.18).

Glutatyon (GSH)

Glutatyon; glutamik asid, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptiddir. Glutatyonun serbest tiol grubu hücrelerin oksidatif strese karşı korunmasını sağlar.



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



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

4.9. Oksidlenmiş LDL ve Sitokin ilişkisi

OxLDL'nin arter intimasına infiltrasyonu, bu bölgede inflamatuvar cevabı uyarmaktadır. OxLDL olarak bilinen oksidatif ve enzimatik reaksiyonlar sonucu değişime uğrayan lipidler, yüksek derecede immunojenik olup proinflamatuvar kemotaktik faktör gibi davranarak endotel hücrelerinde lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonunu uyarır, böylece aktivasyon bölgesine kan hücrelerinin göçü ve sitokin salgılanması artar. Özellikle stabil olmamış aterosklerotik plaklarda immün sistem hücreleriyle (makrofaj ve T hücreleri) birlikte proinflamatuvar sitokinlerin (interlokin-6= IL-6, tümör nekrozis faktör- α =TNF- α), kemokinlerin (monosit kemotaktik peptid-I=MCP-I), adezyon moleküllerinin (vasküler hücre adezyon molekülü-I= VCAM-I), C-reaktif protein (CRP), CD40 ve CD40 ligandının saptanması, immün cevabın aterogenez mekanizmasında rol oynadığının önemli kanıtlarıdır (44,85).

Aterosklerotik hastalığın aktivitesinde ve ilerlemesinde T hücreleri, antikorlar ve koruyucu rol oynayan immunregulator sitokinler (interlokin-10=IL-10, “transforming growth factor- β = TGF- β) önemli görev almaktadırlar. Aterom plağında ekstrasellüler lipid, birbirinden ayrılmış intimal düz kas hücreleri, OxLDL içeren makrofajlar (köpük hücreleri), T lenfosit, mast hücresi ve plazma hücresi gözlenir. Makrofajlar tarafından üretilen matriks metalloproteinazlar plak rüptürüne, doku faktörü ise trombus oluşumuna yol acar. Rüptür olmuş bir aterom plağında bozulmuş endotel, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, hemoraji/ hematoma ve trombus bulunur.

Genel olarak inflamasyonun ateroskleroz patogeneğinde önemli rol oynadığının anlaşılması ile birlikte inflamatuvar belirteçler önem kazanmıştır. Bunlar arasında akut faz proteini olan C-reaktif proteinin (CRP) , kardiyovasküler hastalık riski için güçlü bir serolojik işaret olduğu saptanmıştır. CRP'nin, koroner arter düz kas hücrelerinde ve hastalıklı periferik damarlarda sentezlendiği gösterilmiştir. CRP proaterojenik olup, damar duvarında adezyon molekül ekspresyonunu artırır, arter duvarına monosit adezyonunu ve endotel kemokin sekresyonunu artırır, LDL

oksidasyonunu tetikler, makrofajların LDL alımını artırır ve kompleman aktivasyonunu uyarır.

OxLDL, transkripsiyon faktörleri (NFκB’inde dahil olduğu) yoluyla endoteli aktif eder. Bu transkripsiyon faktörleride adhezyon moleküllerinin (E-Selectin, VCAM–1 ve ICAM–1) artmasına neden olur(44,46). Hemodinamik gerilme basıncı endotelial hücrelerde NFκB sinyal bağımlı adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu indükler. Monositler ve T-Lenfositleri damar çeperi boyunca ilerler ve adhezyon moleküllerine bağlanır. Bu adhezyon molekülleri, monositler ve T Lenfositleri endotelden göç ederek intimada birikir. Kanın damar dışına çıkışı kemokinler tarafından (örneğin MCP–1) başlatılır ve ilerletilir. Monositler intimada M-CSF aracılığıyla değişime uğrayarak makrofajlara dönüşür. İntimal OxLDL scavenger reseptörleriyle makrofajların içine alınır ve makrofajlar kolesterol yüklü köpük hücrelerine dönüşür. OxLDL’nin reseptör aracılığıyla alınmasının önemi aterosklerozun gelişimi açısından son zamanlarda araştırılmıştır. Çöpcü –A eksikliği olan veya CD36 ve apolipoprotein E eksikliği olan farelerde ateroskleroz lezyonları azalmıştır (22,25,44).

4.10. Damar Sistemi

Kan damarları endotel adı verilen hücrelerden oluşmuştur. Endotel hücreleri; kan ve damar hücreleri arasındaki yüzeyde yerleşmiş tek katlı, yassı, oval çekirdekli hücrelerden oluşan narin bir katmandır. Kapiler lümenini tek bir endotel hücresi kuşatır. Şekil 4.10’da arter ve venlerdeki damar yapısı ve endotelin bulunuş şekli görülmektedir (47).

Kan damarları üç katmandan (tunika) oluşmuştur: intima, media ve adventisya.

4.10.1. İntima

Damarın iç yüzeyini döşeyen endotel hücrelerinin oluşturduğu kattır, hücreler bazal lamina üzerinde bulunurlar. Bu hücrelerin her gün %1’i yenilenir. Endotelin altında seyrek düz kas hücreleri içeren gevşek bağ dokusunun oluşturduğu

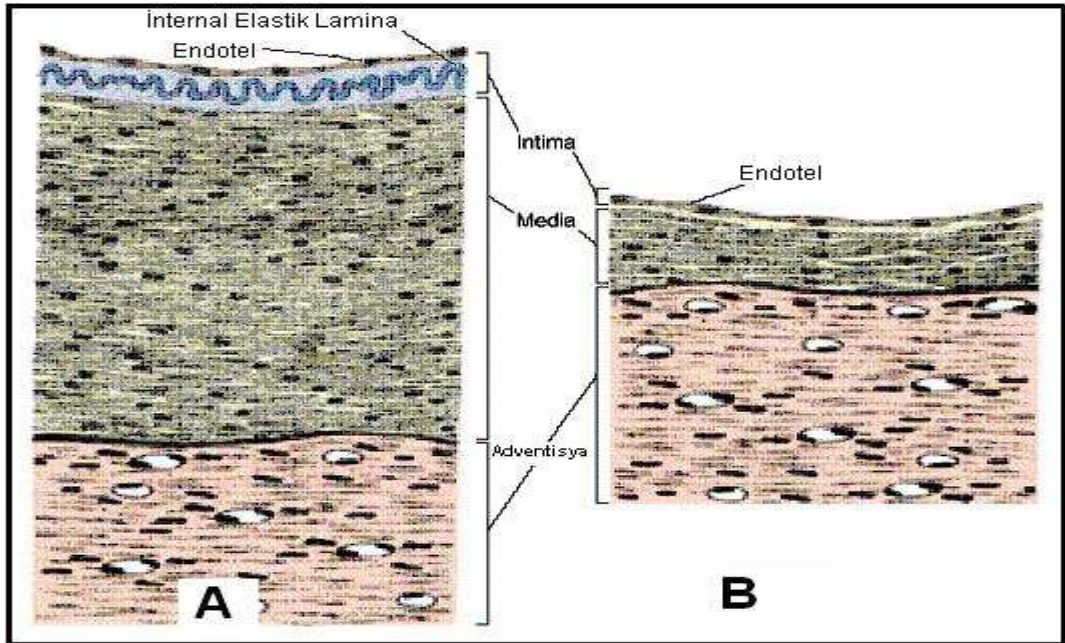
subendotel tabakası bulunur. Arterlerde intima, mediadan elastik lamina interna ile ayrılmıştır. Bu kısım üzerinde madde geçişine izin veren ve hücrelerin beslenmesini sağlayan pencereler (fenestralar) bulunur.

4.10.2. Media

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

4.10.3. Adventisya

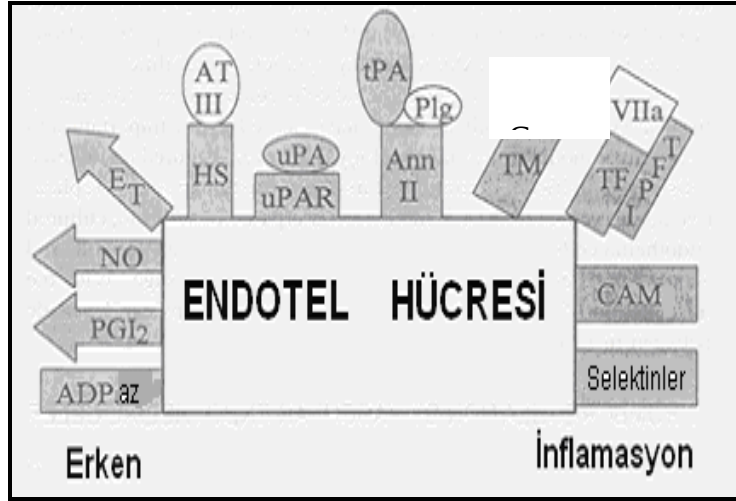
Kollajen ve elastik liflerden oluşur. Adventisyadaki kollajen, tip I kollajendir. Adventisya tabakası, genellikle içinden geçtiği organın etrafını saran bağ dokusu ile kaynaşır.



Şekil 4.10: (A) arter, (B) ven kesitindeki damar katmanlarının şematik görünümü (47)

4.10.4. Damar Endoteli ve Özellikleri

Endotel hücrelerinden çeşitli reaksiyonlar için farklı zamanlarda çeşitli ürünler sentezlenir. Bu ürünler kanın tromboregülasyonunu sağlar (34).



Şekil 4.10.4: Damar endotelinden salınan bazı moleküller (91)

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

Şekil 4.10.4’de görüldüğü gibi endotel hücreleri birçok madde sentezleme kabiliyetinde olduğundan aşağıdaki özelliklere sahiptir.

- Non trombojeniktir. Plazma ve kanın hücresel elementleri ile reaksiyona girmez.
- Subendotel için gerekli besin maddelerini sağlar.
- Makromoleküller için bir barier oluşturur ve endotelin altına geçmesini önler.
- Endotel hücreleri PGI₂, çeşitli interlökinleri, IL-1, çeşitli büyüme faktörlerini, çeşitli vazodilatörleri salgırlar.

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

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

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

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

Endotel hücreleri trombaksan A_2 (TXA_2)'nin aksine güçlü bir antiagregan ve vazodilatör olan prostasiklini (PGI_2)'yi sentez eder. Bazı ilaçlar endotelden PGI_2 sentezini artırırlar. Endotelden PGI_2 'nin salınımının azalması ateroskleroz ve tromboembolizm gelişimini hızlandırır. Aterosklerozda PGI_2 azalırken, TXA_2 de artış göstermektedir. Endotelden sentezlenen trombomodulin protein C aktivasyonu için gereklidir.

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

Ayrıca, endotel hücreleri damar tonüsünün, koagülasyonun, fibrinolizisin, inflamasyonda lökosit adezyonunun ve damar düz kas hücresinin çoğalmasının kontrolünde önemli rol oynamaktadır (34).

4.10.5. Normal ve Aterosklerotik Endotel

Endotel fonksiyonunun bozulması ateroskleroz gelişiminde ilk basamaklardan biridir. Çünkü endotel disfonksiyonunda geçirgenlik artar. LDL'nin bu geçirgenlikten yararlanarak endoteli geçmesine neden olan endotel disfonksiyonudur. Tablo 4.10.5'de normal ve fonksiyonu bozulmuş endotelin özellikleri görülmektedir (34,56).

Tablo 4.10.5: Normal ve fonksiyonları bozulmuş damar endotelinin özellikleri (34)

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

4.11. Lipid Metabolizmasında Dokular

4.11.1. Karaciğer ve Yağ Dokusu

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

içerikleri oldukça farklı yollar izler: 1) Yağ asitleri karaciğer lipidlerine dönüştürülür. 2) Birçok koşulda yağ asitleri karaciğerde majör oksidatif yakıt olarak iş görür. Yağ asitleri asetil-koA ve nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) sağlamak için aktive ve okside edilebilir. Asetil-koA oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP elde etmek için sitrik asit siklusu aracılığıyla okside edilir. 3) Yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu aşırı miktarda asetil-koA açığa çıkar ve gerekli olmayanlar karaciğer tarafından keton cisimlerine dönüştürülür. Bu keton cisimleri bazı periferel dokularda örneğin kalp, beyin veya uzun süreli açlıkta enerji kaynağı olarak iş görebilir. 4) Yağ asitleri ve glukozdan türetilen bazı asetil-koA'lar membran biyosentezi için gerekli olan kolesterol biyosentezinde kullanılır. Kolestereol aynı zamanda steroid hormonların ve lipidlerin sindirim emiliminde esansiyel olan safra tuzlarının da prekürsörüdür. 5) Yağ asitleri plazma lipoprotein bünyesindeki fosfolipidler ve trigliseridlere dönüştürülür. Kolesterol ve kolesterol esterleri de aynı zamanda lipoproteinler şeklinde taşınırlar. 6) Bazı serbest yağ asitleri kanda albumine bağlanarak taşınır ve bu sayede kalp ve iskelet kası için majör yakıt olarak iş görürler. Bu yüzden karaciğer vücudun dağıtım merkezi olarak hizmet eder. Bununla birlikte karaciğer yabancı organik bileşikler örneğin; ilaçlar, yiyecek katkı maddeleri ve koruyucularının da enzimatik detoksifikasyonunda aktiftir.(3)

Yağ dokusu deri altında, kan damarlarının etrafında ve abdominal kavitede geniş ölçüde bütün vücutta dağılmıştır. Yağ dokusu yetişkin bir insanın vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur. Bu ağırlığın yaklaşık %65'ini de trigliseridler oluşturmaktadır. Yağ dokusu metabolik olarak çok aktiftir. Vücuttaki diğer hücre tiplerine benzer şekilde yağ hücreleri piruvat ve yağ asitlerini okside etmek için sitrik asit siklusunu kullanan ve mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu yapan aktif glikolitik metabolizmaya sahiptir. Fazla miktarda karbonhidrat alımı esnasında, yağ dokusu glukozu piruvat ve asetil-koA aracılığıyla yağ asitlerine dönüştürülebilir. Bununla birlikte insanlarda çoğu yağ asidi sentezi karaciğer hücrelerinde meydana gelir, yağ hücrelerinde meydana gelmez. Özellikle yağdan zengin bir diyetten sonra, yağ hücreleri karaciğer ve intestinal kanaldan gelen trigliseridleri depolar. Yakıt ihtiyacı gerektiğinde, yağ dokusunda depolanan trigliseridler yağ hücreleri içindeki lipazlar tarafından serbest yağ asitlerinin oluşturmak üzere parçalanırlar. Daha sonra bu serbest yağ asitleri kan akımı aracılığıyla iskelet kası ve kalbe gönderilebilir.(3)

4.11.2. Diğer Dokular

Kalp yakıt olarak kandan gelen glukoz, serbest yağ asitleri ve keton cisimlerini kullanır. Bu yakıtlar ATP oluşturmak için sitrik asit siklusu yolu ile okside edilirler. İskelet kası gibi kalp kası da fazla miktarda lipid ya da glikojen depolamaz. Enerjinin az bir miktarı fosfokreatin şeklinde depolanır. Kalp aerobik olduğu ve oksidatif fosforilasyondan enerji sağladığı için, kan damarları lipid depoları (ateroskleroz) veya pıhtı (tromboz) tarafından bloke edildiğinde kalp kasının bu bölgesinde ölüm meydana gelebilir ve bu süreç miyokard enfarktüsü ya da kalp krizi olarak bilinir.

Yetişkin bir memelinin beyni normalde yakıt olarak sadece glukozu kullanır. Beyin yakıt olarak doğrudan serbest yağ asitlerinin ya da lipidleri kullanamamasına rağmen, gerekli olduğunda karaciğerden yağ asitlerinden oluşan ve bir keton cismi olan β -hidroksibutirat'ı kullanır.

Diyetle alınan trigliserid yapısındaki uzun zincirli çoklu doymamış yağ asitlerinin dalak lenfosit proliferasyonu üzerinde güçlü etkileri olduğu belirtilmiştir. Diyetle alınan lipidlerin özellikle tekli doymamış yağ asidi içeriğinin aortta aterosklerotik lezyonların gelişimini önlediği belirtilmiştir. Bunun yanı sıra kanda artmış serbest yağ asidi düzeyi karaciğer, iskelet kası ve pankreas β -hücrelerinde depolanır. Bu uygunsuz depo insulün direnciyle sonuçlanır (3).

4.12. Hiperlipidemi

Hiperlipidemi; plazma trigliserid veya kolesterol düzeylerinin veya her ikisininde yükselmesidir. Trigliserid ve kolesterol plazmada lipoproteinler halinde taşırlar. Bu nedenle hiperlipidemi plazma lipoprotein düzeylerindeki artışa da bağlıdır. Artmış yapım veya dolaşıma salınım ya da azalmış klirens veya dolaşımdan uzaklaştırılma nedeniyle bir veya daha fazla lipoprotein sınıfı kanda birikebilir; bazı vakalarda her iki durum birlikte bulunabilir. Hiperlipidemi; primer ve sekonder hiperlipidemi olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır (3).

4.12.1. Primer Hiperlipidemi

Primer hiperlipidemi; beslenmeye ve sıklıkla lipoprotein metabolizması ile ilgili proteinlerdeki (apolipoproteinler, reseptörler, enzimler veya kofaktörler) değişikliklere bağlıdır. Genetik defektlere bağlı olarak ortaya çıkan bu tarz değişiklikler lipid metabolizmasının primer bozuklukları; Ailesel Hiperkolesterolemi, Ailesel Defektif Apolipoprotein B100, Ailesel Kombine Hiperlipidemi, Ailesel disbetalipoproteinemi, Lipoprotein Lipaz Eksikliği, Apolipoprotein CII Eksikliği, Ailesel Hipertrigliseridemi ve Ailesel Hipoalfalipoproteinemi olarak sınıflandırılır (3).

4.12.2. Sekonder Hiperlipidemi

Diabetes mellitus veya hipotiroidizm gibi lipoprotein metabolizmasını değiştiren diğer faktörler de plazma lipoprotein düzeylerini artırırlar; bu faktörler lipid metabolizmasının sekonder bozuklukları olarak sınıflandırılır. Sekonder hiperlipidemiler nispeten daha az görülür ve tüm hiperlipidernilerin yaklaşık %40'ım oluşturur (3).

4.12.3. Deneysel Hiperlipidemi

Hayvanlar üzerinde yapılan deneyler, diyetteki yağ ve kolesterol ile ateroskleroz ve plazma kolesterol düzeyleri arasındaki ilişki ile ilgili daha geniş fikir sahibi olmamızı sağlamıştır. Aterosklerozu incelemek için mümkün olan her hayvan kullanılmış, bu hayvanların hemen hemen hepsi, doymuş yağ ve kolesterol açısından zengin diyetlerle beslendiklerinde hiperkolesterolemi gelişmiş ve lipid birikimi ile karakterize olan arter lezyonları oluşmuştur. Bununla birlikte aterosklerotik lezyonlar meydana geldikten sonra, plazmadaki kolesterol düzeyi düşürüldüğü takdirde, bu hayvan modellerinde lezyonlar gerilemiştir. Kandaki kolesterol düzeyleri ya doymuş yağ ve kolesterolün diyetten çıkarılması ya da hayvana aterojenik diyet uygulamakla birlikte kolesterol düşürücü bir ilaç verilmek suretiyle de düşürülmüştür (3).

Yang ve arkadaşları (106) %1.5 g kolesterol, % 0.25 g kolik asit, % 7.5 g domuz yağı ve % 75 g esansiyel diyet ihtiva eden pellet yem ile 7 günde hiperlipidemi oluşturmuşlardır.

Wojcicki ve arkadaşları (102) sıçanlarda kokonut oil (1 Og/kg/gün), kolesterol (4g/kg/gün) ve kolik asit (0.2 g/kg/gün) ihtiva eden diyet uygulamasında 14 gün sonunda hiperlipidemi oluşturmuştur.

Horvath ve arkadaşları (41) sıçanlarda günlük %2 gram kolesterol, % 0.5 g kolik asit ve % 20 g ayçiçek yağı ihtiva eden diyet ile 9 günde hiperlipidemi oluşturmuşlardır.

Yarat ve arkadaşları(17) % 0,49 (0.5) g kolik asit, % 1,63g kolesterol, % 16,3 g ayçiçek yağı ihtiva eden diyetle 10 günde hiperlipidemi oluşturmuşlardır.

4.13. Koroner Arter Hastalıkları ve Hemostaz

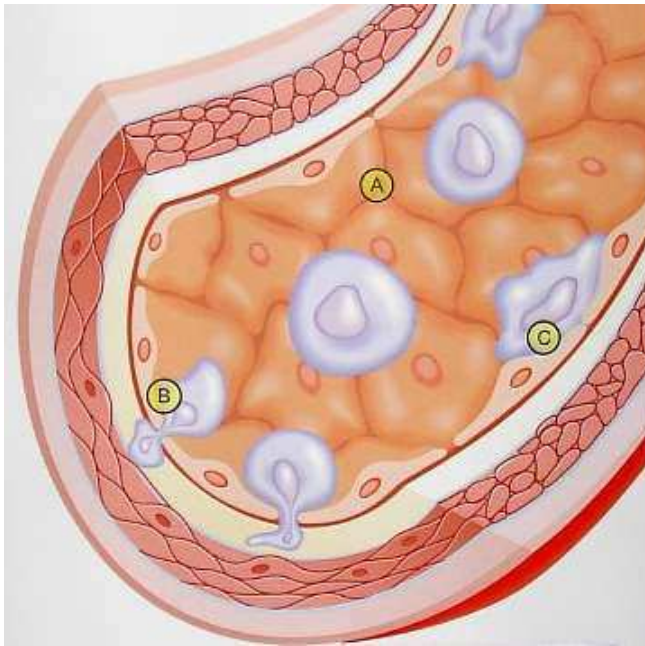
Ateroskleroz yukarıda özetlenen çeşitli etkenlerin sonunda meydana gelen inflamatuvar ve proliferativ bir damar hastalığıdır. Bu hastalığın son safhasında hemostazın çeşitli kademeleri özellikle koagulasyon sistemi aktifleşir ve trombus kaçınılmaz olur. Koroner arterlerin tıkanması anlamına da gelen akut koroner sendromu adı verilen bu tabloda tedavi planlamasında hekimler, aspirin, trombolitik ilaçlar, trombosit aktivasyonunun inhibisyonu gibi ilaçlar kullanarak trombus olaylarına karşı tedbir almaktadır (24).

4.14. Bu Mekanizmalara Bağlı Olarak Aterosklerozun Safhaları

Koroner arter hastalığının (KAH) birinci nedeni olan ateroskleroz birçok farklı hücre tipini ve organı etkileyerek, çeşitli fizyolojik süreçlere katılmaktadır. Bu nedenle kompleks bir patofizyolojisi vardır. Yapılan çeşitli genetik çalışmalar da bunu desteklemektedir. Örneğin; transgenik hayvanlarda yapılan çalışmaya göre; ateroskleroz gelişimini etkileyebilecek 100'den fazla gen saptanmıştır.

American Heart Association plak tiplerini gelişimine göre şöyle sınıflamayı önermektedir;

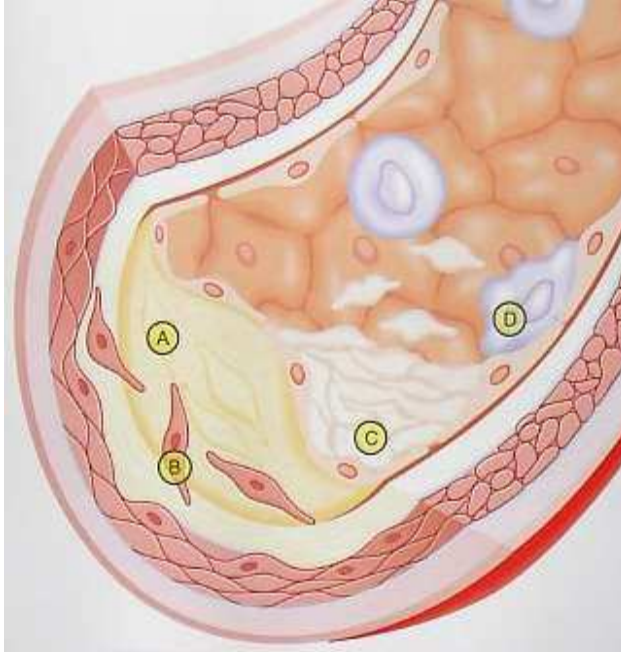
Tip I, minor lipid birikimi ve monositlerin endotel yüzeyine yapışıp arter lümeninden intimaya geçmeleriyle oluşan seyrek makrofaj köpük hücrelerinden oluşur. LDL'nin fazlası endotelin altına intimaya geçerek burada kimyasal değişime uğrar. LDL'ler endotelden geçerken geçerken endotel aktifleşmeye ve adezyon molekülleri nedeni ile de savunmaya hazırlanmaya başlamıştır. Modifiye olmuş LDL'ler endoteldeki adezyon moleküllerini dolayısıyla monositleri harekete geçirirler. Böylece inflamasyon reaksiyonunun birinci kademesinde rol oynamaya başlar. Endotel hücreleri kemokinleri salmaya başlar ve T hücreleri de olaya karışır.



- A endotel geçirgenliği,
- B lokosit göçü,
- C lökosit adezyonu

Şekil 4.14 (a): Tip I Aterosklerotik lezyonun progresyonu (49)

Tip II lezyon, çoğunluğu monosit kökenli olan lipid yüklü köpük hücrelerinin, sağlam endotel altında bölgesel kümelenmesiyle oluşan yağlı çizgilerdir. Bu lezyonlarda az miktarda T lenfositleri, mast hücreleri ve lipidle dolu düz kas hücreleri de vardır.



- A- köpük hücre gelişimi,
- B- Kas hücresi göçü,
- C- Trombosit adezyon ve agregasyonu,
- D- Lökosit adezyonu ve girişi.

Şekil 4.14 (b): Tip II aterosklerotik lezyonların progresyonu (49)

Tip III lezyon, ek olarak az miktarda ekstrasellüler lipid kümeleri içerir. Reaksiyon bundan sonra intimada daha yoğun bir şekilde devam etmeye başlar. Monositler olgunlaşır ve makrofajlara dönüşür. Makrofajlar ve T hücreler pek çok sitokini ve büyüme faktörlerini de içine alan inflamatuvar mediatörleri salmaya başlar. Çöpçü reseptör adı ile de anılan makrofajlar modifiye olmuş LDL'leri içine alarak köpük hücrelerini oluşturur. Tip I-III lezyonlar daha sonraki lezyonların öncüleri olmasına karşılık klinik semptomaya yol açmazlar.

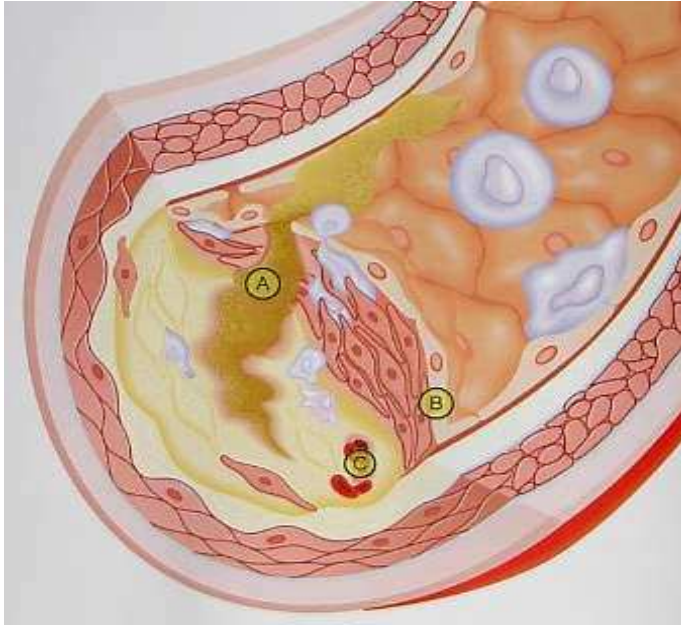
Tip IV lezyonda ekstrasellüler lipid kümeleri biraraya gelerek bir lipid çekirdek oluşturur. Bu lipid çekirdek inflamatuvar hücreler tarafından çevrelenmiş ve ince bir düz kas hücre tabakası ve bağ dokusu tarafından kaplanmıştır (Şekil 4.14 (c)). Tip IV lezyon genellikle yarım ay şeklindedir ve damar duvarı kalınlığını artırır. Bu evrede orijinal lümen çapını korumak için arterde yeniden yapılanma oluşur.



- A- Makrofaj birikimi,
- B- Nekrotik çekirdek oluşumu,
- C- Fibroz tabaka oluşumu.

Şekil 4.14 (c): Tip IV atrosklerotik lezyonların progresyonu (49)

Tip V lezyonda yoğun bağ doku depolanması vardır ve lipid çekirdeği çevreleyen fibroz bir kapsül oluşur. Çekirdeği lümeninden ayıran kapsül kısmı plak başlığıdır. Bu lezyonlar çoğunlukla çok büyüktür ve bu nedenle arter duvarında yeniden yapılanma (remodeling) ile kompensasyon gelişemediğinden lümen daralır (36-15).



- A- Plak rüptürü,
- B- Fibroz plak kalınlaşması,
- C- Plak kanaması.

Şekil 4.14 (d): Tip VI aterosklerotik lezyonların progresyonu (49)

Tip VI plaklar çoğunlukla tip V plaklarda gelişen trombozun veya kanamanın komplike ettiği plaklardır. Bu lezyonun gelişmesinin nedeni plak yırtılmasıdır ve subendotelyal fibroz dokuda fissürler, erozyonlar ve ülserasyonlar sık olarak gözlenir (Şekil 4.14 d.). Akut myokard infarktüsü ve kararsız angina gibi klinik olaylar bir kaç istisna dışında tip VI lezyona bağlıdır (15).

Tip VII plaklarda yoğun kalsifikasyon vardır.

Tip VIII plaklar ise neredeyse tümüyle kollajen ve düz kas hücrelerinden oluşur. Bu lezyonlar tip V ve VI lezyonlara göre daha stabildir. Bu nedenle tip V ve VI lezyonlar tip VIII lezyona dönüştürülebilirse klinik açıdan büyük bir kazanç elde edilmiş olur. Son zamanlarda statinlerin bu şekilde plak stabilizasyonu sağladığını gösteren çalışmalar vardır (15,36).

4.15. Eliza Yöntemi Hakkında Bilgi

Ox-LDL ölçümünün ateroskleroz patogenezinde önemli olduğunu gören araştırmacılar hızla LDL modifiyasyonunu ölçen yöntem geliştirmeye başladılar. Kromatografik metodlar ile ox-LDL içindeki partiküllerin cinsine göre modifikasyonu indirekt ölçen metodlar da vardır. Burada prensip; LDL alt fraksiyonları, LDL'nin partikül boyutu, apoprotein B içindeki oksidlenmiş amino asitler, LDL içindeki lipid hidroperoksidleri dikkate almaktır. Modifiye LDL'yi direkt ölçen kromatografik yöntemlerin başında anyon değiştirme kromatografisi gelir. Modifiye olmuş LDL'yi ölçen diğer metodlar elektro migrasyon prensibine dayanır. Agaroz jel, poliakrilamid gradient jel, kapiler elektroforez bunlar arasındadır.

MDA'yi veya ox-LDL'yi esas alarak enzime bağlı immunolojik yöntemler (enzim-linked immunosorbent assay:ELISA) son yıllarda en çok kullanılan yöntemler arasındadır. Bizim ox-LDL ölçmek için kullandığımız yöntem de bu yöntemdir.

MDA-LDL, ox-LDL oluşumunda önemli olduğu için anti-MDA-LDL antikorları kullanıldığı gibi, LDL'nin başlıca proteini antiApo-B antikorları kullanılarak da ELISA ile ox-LDL ölçümü yapılabilmektedir.

Aterosklerotik lezyonlarda ox-LDL'ye karşı otoantikorlar bulunduğu içinkoroner arter hastalıklı kişilerin kanlarında da ox-LDL 'ye karşı otoantikor bulunmuştur. Bu otoantikorlar küçük ve büyük çaplı LDL için farklı olabilmektedir. Çalışmalar küçük çaplı LDL'nin büyüklere göre daha kolay okside olduğunu göstermiştir. Ayrıca esansiyel hipertansiyonlu hastalarda yüksek miktarda ox-LDL otoantikorlarının bulunduğu da bildirilmiştir (27). Ox-LDL otoantikorları ile yapılan ölçümlerde ox-LDL antijeni kuyucuklara kaplanır. Daha sonra sulandırılmış serum ile enkübe edilerek bağlanma sağlanır. Enzimlerle muamele edilerek oluşturulan rengin şiddeti standartla mukayeseli olarak değerlendirilir (102)

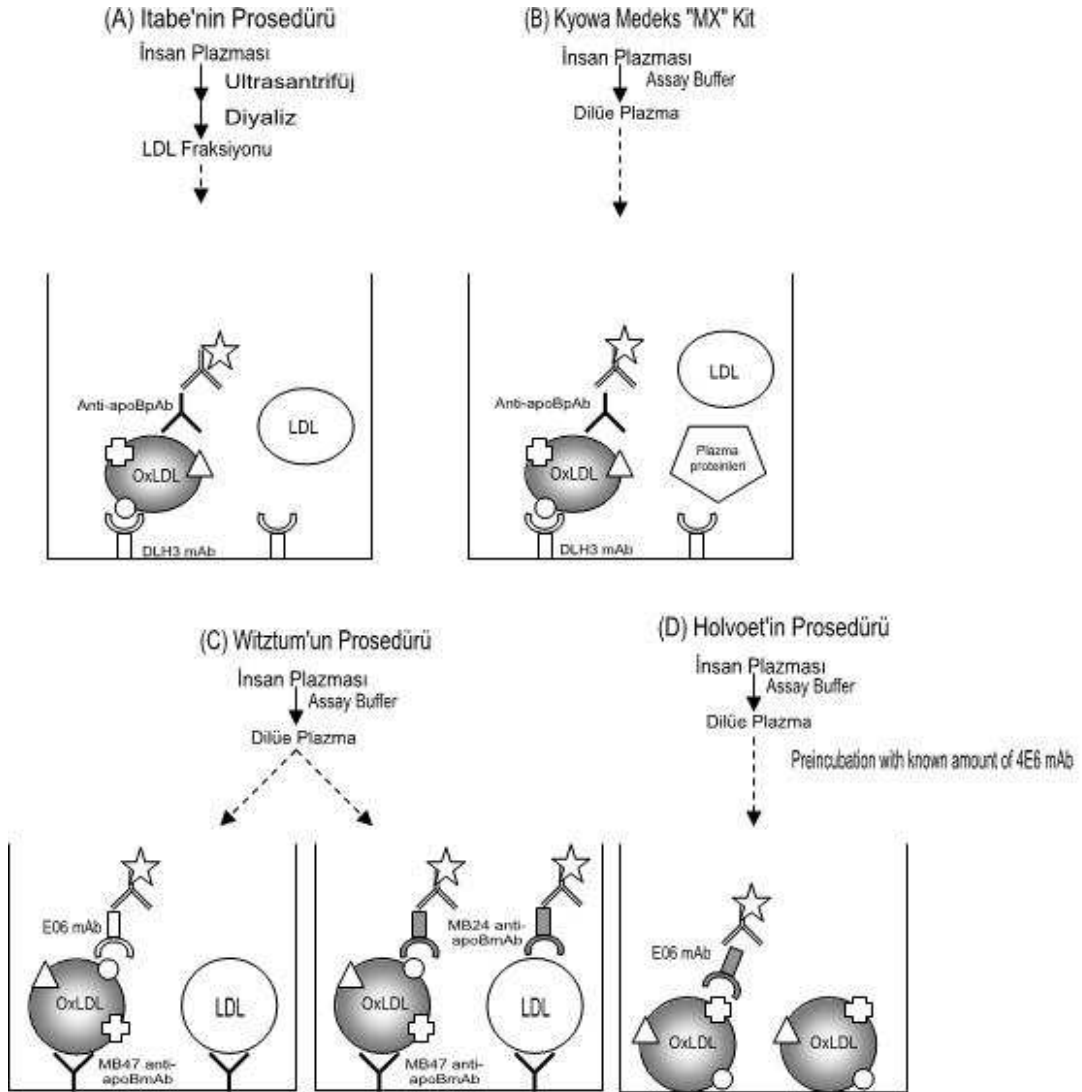
LDL'nin oksidasyonu nonenzimatik olarak postranslasyon reaksiyonları ile gerçekleştiğinden genetik olarak incelenmesi mümkün değildir. İmmunolojik teknikler ox LDL'yi ölçmede büyük fayda sağlamıştır. Ölçüm ELISA tekniği ile yapılmaktadır. Ancak okside LDL heterojen olarak modifiye olabilen bir partikül karışımı olduğu için bu partiküllere bağlanan spesifik antikorlara bağlı olarak ölçümde bazı farklılıklar olabilmektedir. İn vivo olarak da okside LDL'nin oksidasyonu için tek bir model söz konusu değildir, heterojen partikül içinde olabilecek oksidasyonlar söz konusudur.

Okside LDL ölçümü immunolojik yöntemlerle yapılmaktadır. Okside LDL'nin koroner arter hastalıkları ile ilişkili olduğu bilinmekte fakat bu molekülün kandaki değerleri hakkında bilgiler ve ölçümlerin limitleri henüz kesinleşmemiştir. OxLDL ölçümleri farklılık göstermektedir. Immunolojik yöntemlerde aşağıdaki şekillerde ve tabloda görüldüğü prensip aynıdır. Ancak küçük farklar vardır. Bu farkların plazmadaki sınırları belirlemek için önemi büyüktür. Bu nedenle bu konu ile çalışmalar hızla devam etmektedir.

Itabe yönteminde, Kyowa Medex (MX) kitinde olduğu gibi DLH3 mAb monoklonal antikor kullanılmıştır. DLH3, oxLDL'ye karşı hazırlanmış monoklonal antikordur. DLH3 normal LDL, asetilenmiş LDL ve glikozillenmiş LDL'ye bağlanmaz iken, oksidlenmiş LDL ile güçlü bir bağlanma yapmaktadır (38.58).

DLH3 mAb aynı zamanda oksidlenmiş HDL'yi de bağladığı için apo B'ye özel bir antikor değildir. Bu monoklonal antikoron özelliği oksidatif lipid ürünlerini bağlamasıdır. mAb DLH3'ün oksidlenmiş fosfatidil kolinleri (PCs) tanıdığı gösterilmiştir. Bunlar arasında aldehid içeren fosfatidil kolinler de vardır (43,105).

Aşağıda bu yöntemler hakkında kısa bilgi verilecektir.



Şekil 4.15: İnsan dolaşımındaki plazmada ox-LDL ölçümü için dört farklı prosedür. Bunların tümü anti ox-LDL mAb kullanılan Elisa prosedürleridir; fakat şekilde gösterildiği gibi çoğu farklı durumdadır.

5. METOD ve MATERİYAL

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

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

5.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

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

5.3. Kullanılan Deney hayvanları ve oluşturulan gruplar

Çalışmamızda Tübitak'dan temin edilen C57BL/6 tip 18-22gr ağılığında değişen 32 adet 2 aylık dişi fare kullanıldı. Deney hayvanları 4 gruba ayrıldı.

ApoB Konjugatı verilen grup

LDL Konjugatı verilen grup

Hiperlipidemik grup

Kontrol grup

5.4. Deney Hayvanlarının Beslenmeleri

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

Yemlerin hazırlanması: Normal pellet yem ile beslenen Kontrol grupları hariç diğer grupların yemlerinin hazırlanması için toz halindeki normal yem Tablo 5.4'de belirtilen oranlarda gerekli ilaveler yapıldı. Distile su eklenerek hamur haline getirildi ve silindir şekli verilerek etüvde kurutuldu.

Tablo 5.4: Laboratuvar şartlarında hazırlanan yemlerin içeriği

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

5.5. Hiperlipidemi oluşturulması. Apo B ve LDL Konj. verilmesi

Hiperlipidemik grupta yer alan deney hayvanlarında, Tablo 5.4’de gösterilen %1.63 gr kolesterol, %0.41gr kolik asit ve %16.3 gr ayçiçek yağı içeren hiperlipidemik yem ile hiperlipidemi oluşturuldu. Gruptan oluşan deney hayvanları 3 ay boyunca Tablo 5.4’de içerikleri belirtilen yemlerle beslendi. Deney gruplarından Apo B grubuna deneyin başında ve 1.haftada apo-B konjugatı verildi. Aynı şekilde LDL grubunada deneyin başında ve 1. haftada LDL konjugatı verildi.

5.6. Deney hayvanlarından kan örneklerinin alınması

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

5.7. Deney hayvanlarından doku örneklerinin hazırlanması

Deney sonunda tayinlerde kullanılmak üzere alınan doku; karaciğer çıkartılarak serum fizyolojikte yıkandı. Zar ve yağ kısımları temizlenerek, buz içerisinde küçük parçalara ayrıldı. Bu küçük parçalar daha sonra cerrahi makasla kesilmek suretiyle kıyma haline getirildi ve tartıldı. Karaciğer dokusu için ağırlığı kadar serum fizyolojik (mL) ilavesi ile homojenize edilerek %100’lük doku homojenatları hazırlandı. Hazırlanan doku homojenatları tüplere konarak derin dondurucuda -20C’de kullanılacağı tarihe kadar saklandı.

5.8. Kan ve doku örneklerinde incelenen parametreler ve yöntemleri

Alınan kanların rutin lipid profili; total lipid, total kolesterol ve LDL kolesterol tayini yapılarak incelendi. Kan ve dokuda ox-LDL yapıldı. Dokuda GSH, LPO ve Sialik asid ölçüldü.

5.8.1. Serumda Total lipid tayini

5.8.1.1. Deneyin prensibi

Serum lipidleri yüksek sıcaklıkta, derişik sülfürik asitle muamele edildiğinde, sülfürik asit yağların karbon- karbon bağlarına etki ederek, karbonyum iyonları oluşmasını sağlar. Oluşan karbonyum iyonları fosfovanilinin karboksil gruplarıyla reaksiyona girerek pembe renkli bir kromojen oluşturur. Oluşan kromojen 530 nm’de maksimum absorbands verir. (54)

5.8.1.2. Kullanılan çözeltiler

Derişik Sülfürik asit: Ticari ambalajdan direkt olarak kullanılır.

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

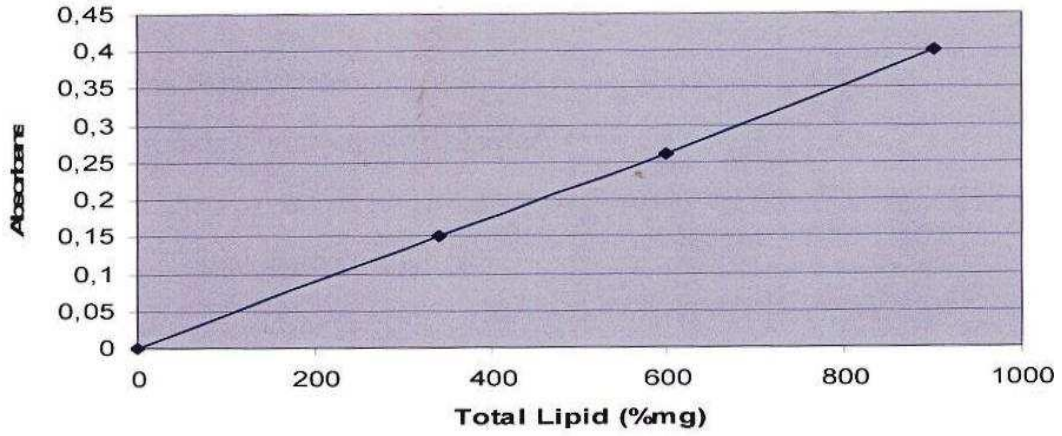
5.8.1.3. Deneyin yapılışı

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

Deney Tüpleri

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

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

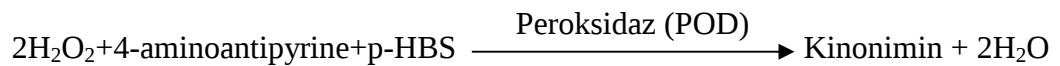
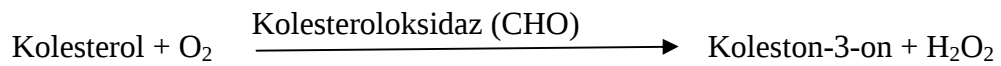


Şekil 5.8.1: Total lipid standart eğrisi

5.8.2. Serumda Total kolesterol tayini (Kat.no.C507-480)

5.8.2.1. Deneyin prensibi

Kolesterolün enzimatik hidrolizi ve oksidasyonundan sonra, H_2O_2 oluşur. H_2O_2 p-HBS (phydroxy benzene sulfonic acid) ve peroksidaz varlığında, 4-aminoantipyrine ile kinonimin kırmızı renkli kromoforunu oluşturur. Oluşan bileşin renk şiddeti kolesterol ile doğru orantılıdır.



5.8.2.2. KullanılanÇözeltiler

1- Kolesterol Reagent

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

2- Standart

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

5.8.2.3. DeneyinYapılışı

Deney Tüpleri

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

Kolesterol konsantrasyonunun hesaplanması:

Kolesterol konsantrasyonu (mg/dL): $200 \times \text{Serumun absorbansı} / \text{Standartın absorbansı}$

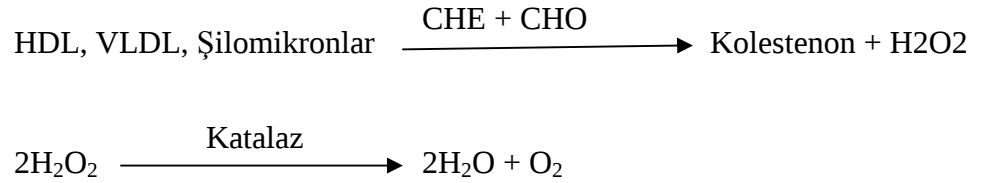
Kolesterol konsantrasyonu (mmol/L): $5.17 \times \text{Serumun absorbansı} / \text{Standartın absorbansı}$

5.8.3. Serumda LDL kolesterol tayini (Kat. No. L530-100)

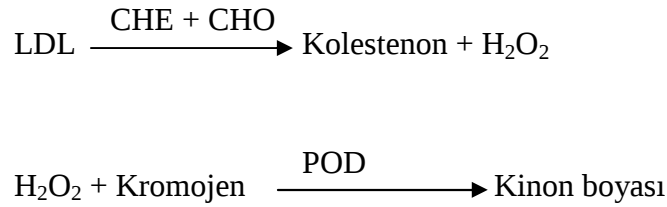
5.8.3.1. Deneyin prensibi

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

1.basamak:



2. basamak:



5.8.3.2. Kullanılan çözeltiler

1- Direct LDL Kolesterol Reagent-1

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

2- Direct LDL Kolesterol Reagent-2

5.8.3.3. Deneyin Yapılışı

Deney Tüpleri

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

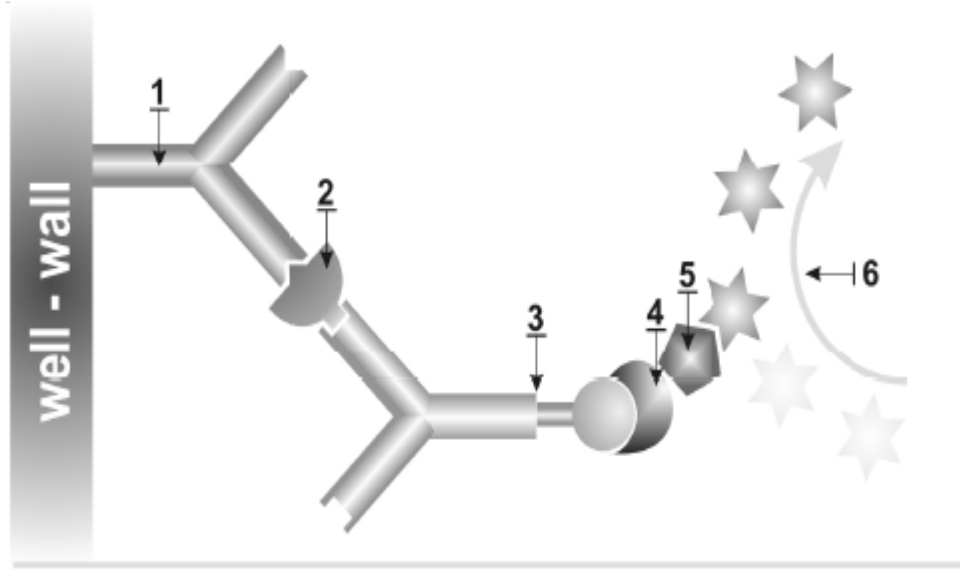
LDL – Kolesterol Konsantrasyonunun Hesaplanması:

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

5.8.4. Serumda ve Dokuda ox-LDL tayini (USCN-Kat.No. E0527Mu)

5.8.4.1. Deneyin prensibi

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



Şekil 5.8.4 (a): Elisa yönteminde takip edilen yol şematik olarak yukarıdaki gibidir:

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

5.8.4.2. Kullanılan Çözeltiler

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

5.8.4.3. Testin Yapılışı

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

—Tüm standart kuyucuklarına 100 µl numune sulandırıcısından ilave edildi.

—Birinci kuyucuğa 100 µl ox-LDL standardı ilave edildi. Diğer Standard kuyucuklarına 100 µl aktarılarak 30 ile 0.2 ng/ml konsantrasyonları arasında değişen Standard dilüsyonları yapıldı.

—Tüm kuyucuklara 50 µl numune sulandırıcı, kör kuyucuğuna 100 µl numune sulandırıcısı ilave edildi.

—Tüm kuyucuklara 50 µl deteksiyon antikoru ilave edildi.

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

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

—Tüm kuyucuklara 100 µl tavşan anti HRP ilave edildi.

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

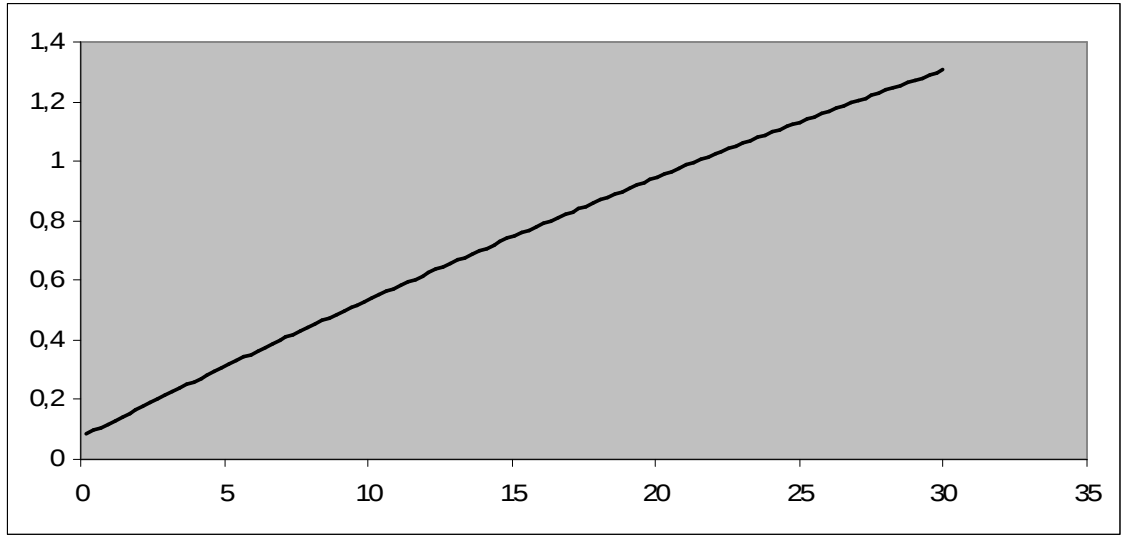
—İnkübasyon süresinin sonunda mikro kuyucuklar boşaltıldı. Tekrar 3 kere yıkama tamponu ile yıkandı.

—Kör dâhil tüm kuyucuklara 100 µl TMB substrat çözeltisi ilave edildi. TMB substrat çözeltisi kullanımdan hemen önce hazırlandı.

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

—20 dakika sonunda tüm uyucuklara 100 µl reaksiyon durdurma çözeltisi ilave edildi ve oluşan renklerin absorbansı 450 nm'de okundu.

-Standard eğrisinden serum ox-LDL miktarı hesaplandı.



Şekil 5.8.4 (b): Ox-LDL standardı

5.8.5. Karaciğer Homojenatında Total Protein Tayini

5.8.5.1. Deneyin prensibi

Bu metotta önce proteinler alkali ortamda bakır iyonları ile reaksiyona sokulur. Daha sonra fosfomolibdik - fosfotungstik asit reaktifi (folin reaktifi) ile indirgenir. Oluşan mavi rengin şiddeti spektrofotometrik olarak değerlendirilir. Oluşan mavi rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

5.8.5.2. Kullanılan çözeltiler

A çözeltisi: Sodyum karbonat çözeltisi (% 2 g, 0.1 N NaOH'teki); 0.4 g NaOH biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye dH₂O ile tamamlanır. 2 g sodyum karbonat hazırlanan 0.1 N NaOH çözeltisinde çözülür ve hacmi 100 ml'ye 0.1 N NaOH çözeltisi ile tamamlanır.

Bakır sülfat çözeltisi (% 1 g) : 1 g bakır sülfat biraz dH₂O ile çözülür ve hacmi dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanır.

Sodyum potasyum tartarat çözeltisi (% 2 g) : 2 g sodyum potasyum tartarat biraz dH₂O ile çözülür ve hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlanır.

B çözeltisi : %1 g lık Bakır sülfat çözeltisi ile % 2 g lık Sodyum potasyum tartarat çözeltisi eşit hacimde (1/1) karıştırılarak kullanılır (kullanılacağı zaman taze hazırlanır).

C çözeltisi : 50 ml A çözeltisi ve 1 ml B çözeltisi karıştırılarak kullanılır (kullanılacağı zaman taze hazırlanır).

Folin çözeltisi : 100 g sodyum tungstat, 25 g sodyum molibdat .2H₂O , 50 ml % 85 g lik fosforik asid, 100 ml derişik HCl ve 700 ml dH₂O bir balona konularak 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Soğutulur. Üzerine 150 g Li₂SO₄ ilave edilip, geri soğutucu altında 15 dk daha kaynatılır. Soğuduktan sonra, 5-6 damla Brom katılır. (çözelti bozuksa renk siyahlaşır, bu durumda çözelti tekrar hazırlanır, bozuk değilse renk sarı yeşil olur). Çözelti dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanır ve kullanılır. Koyu renkli şişede saklanır, uzun süre dayanır.

Serum fizyolojik (% 0.9 g NaCl) : 0.9 g NaCl biraz suda çözülür ve hacmi 100 ml'ye dH₂O ile tamamlanır.

Protein stok standart çözeltisi (% 100 mg lık albumin çözeltisi):100 mg albumin biraz serum fizyolojik de çözüldükten sonra hacmi 100 ml'ye serum fizyolojik ile tamamlanır. Hazırlanır.

Protein çalışma standart çözeltileri: Stok çözeltiden uygun hacimler alınarak % 5, 15, 25 mg albumin ihtiva edecek şekilde serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlanır (Deneyin yapılışına bakınız).

5.8.5.3. Deneyin yapılışı

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

5 deney tübü alınarak numune (N), standart 1 (St1), standart 2 (St2), standart 3 (St3) ve kör (K) olmak üzere işaretlenir ve aşağıdaki gibi çalışılır.

	Numune (N)	St1 % 5 mg Albumin	St2 % 10 mg Albumin	St3 % 15 mg Albumin	Kör (K)
Albumin (%100mg)	-	25 µl	50 µl	75 µl	-
Doku Homojenatı (veya süpernatant)	10 µl	-	-	-	-

Serum Fizyolojik	490 µl	475 µl	450 µl	425 µl	0.5 ml
Toplam Hacim	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml	0.5 ml
Vortekste karıştırılır.					
C Çözeltisi	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
Vortekste iyice karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dk bekletilir.					
Folin Ayırıcı	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml

Vortekste iyice karıştırılır, oda sıcaklığında 30 dk bekletilir. 30 dk sonunda 500 nm de köre karşı absorbanlar kaydedilir. Standart grafiği çizilir. Doku protein miktarı hesaplanır.

Standart grafiği yardımıyla protein miktarı Protein (mg)/ g nemli doku cinsinden hesaplanır.

5.8.6. Karaciğer Homojenatında Glutasyon(GSH) tayini

5.8.6.1. Deneyin prensibi

Elmann ayırıcı, 5-5' ditiyobis 1-2 nitro benzoik asit (DTNB) ile sülfidril gruplarının reaksiyonu sonucu oluşan renkli ürün spektrofotometrik olarak değerlendirilir (3).

5.8.6.2. Kullanılan çözeltiler

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

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

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

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

5.8.6.3. Deneyin yapılışı

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

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

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

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

5.8.6.4. Karaciğer Homojenatında Lipid Peroksidasyon (LPO) tayini

5.8.6.5. Deneyin prensibi

% 10 gramlık karaciğer homojenti 10 dak. 3000 rpm de santrifüj edilir. Süpernatant alınarak çalışılır (3).

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

5.8.6.6. Kullanılan çözeltiler

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

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

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

n-butanol: Orijinal şişesinden kullanılır.

5.8.6.7. Deneyin yapılışı

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

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

İlave edilir. Vortekslenir ve 10 dk. 3000 rpm’de santrifüj edilir. Butanol fazı alınarak 532 nm’de köre karşı absorpsanlar kaydedilir. MDA için saptanmış ekstinksiyon kat sayısı ($1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak (nmol MDA/ mg protein) cinsinden sonuçlar hesaplanır.

5.8.7. Karaciğer Homojenatında Total Siyalik Asit Tayini

5.8.7.1. Deneyin prensibi

Siyalik asit, periyodik asid oksidayonuna uğrayarak, β -formilpürivik asit oluşur. Bu bileşik 2 mol tiyobarbütirik asid ile reaksiyonlaşarak, 549 nm’de maksimum absorbands veren renkli bir bileşik oluşturur. Bu ürün stabil değildir, bu nedenle siklohegzanon fazına çekilir. Oluşan rengin şiddeti 549 nm’de maksimum absorbandsa sahiptir (102).

5.8.7.2. Kullanılan çözeltiler

1N H_2SO_4 : 1L’lik bir ölçü distile su ilave ettikten sonra üzerine 5.42 ml derişik kabına bir miktar sülfürik asid konur ve hacim distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır.

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

0.5M sodyum sülfat (0.1 N H_2SO_4 içerisinde) :500 ml’lik bir balon jojeye 35.51g sodyum sülfat bir miktar 0,1N sülfürik asid içinde çözüldükten sonra hacim 500 ml’ye 0.1N sülfürik asid ile tamamlanır.

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

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

Siklohegzanon: (Direk olarak orijinal şişesinden kullanılır)

5.8.7.3. Deneyin yapılışı

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

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

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

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

5.9. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızın biyoistatistiksel çözümlenmesinde SPSS (Sürüm: Pasw Statistics 18) paket programı kullanılmıştır. Değişkenler Ortalama, Standart Sapma ile tanımlanmıştır.

Çalışmamızdaki grupların ortalaması normal dağılım göstermediği için, grupların ortalamasının istatistiksel olarak karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

İstatistiksel yorumlamalarda anlamlılık sınırı p=0,05 alınmıştır.

6. BULGULAR

6.1. Çeşitli Gruplarda Serumdaki Lipid Göstergelerine Ait Bulgular

Kontrol ve Hiperlipidemi grubunda (A), Hiperlipidemili gruba Apo-B Konjugatı verilmesi halinde (B) ve Hiperlipidemili gruba LDL konjugatı verilmesi durumunda (C) serumdaki Total lipid, Kolesterol, LDL kolesterol ve Ox-LDL sonuçları toplu halde Tablo 6.1. 'de görülmektedir.

Tablo 6.1: Serumda Lipid Göstergelerinin Sonuçları

Parametreler	Kontrol (n=8) Ort±SD	Hiperlipidemik (n=8) Ort±SD	
Total Lipid (mg/dl)	193,85±15,23	551,85±52,2	A
Kolesterol (mg/dl)	65,18±6,52	138,99±10,1	
LDL Kolesterol (mg/dl)	3,67±0,95	18,5±1,81	
Ox-LDL (ng/ml)	2,64±0,53	3,87±0,8	
Parametreler	Hiperlipidemik (n=8) Ort±SD	Apo-B (n=8) Ort±SD	
Total Lipid (mg/dl)	551,85±52,2	671,63±84,49	B
Kolesterol (mg/dl)	138,99±10,1	207,74±44,27	
LDL Kolesterol (mg/dl)	18,5±1,81	13,86±2,05	
Ox-LDL (ng/ml)	3,87±0,8	5,1±1,37	
Parametreler	Hiperlipidemik (n=8) Ort±SD	LDL (n=8) Ort±SD	
Total Lipid (mg/dl)	551,85±52,2	650,81±46,08	C
Kolesterol (mg/dl)	138,99±10,1	219,34±23,02	
LDL Kolesterol (mg/dl)	18,5±1,81	13,94±1,97	
Ox-LDL (ng/ml)	3,87±0,8	6,11±1,28	

*Değerler ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, Ox-LDL: Oksidlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein

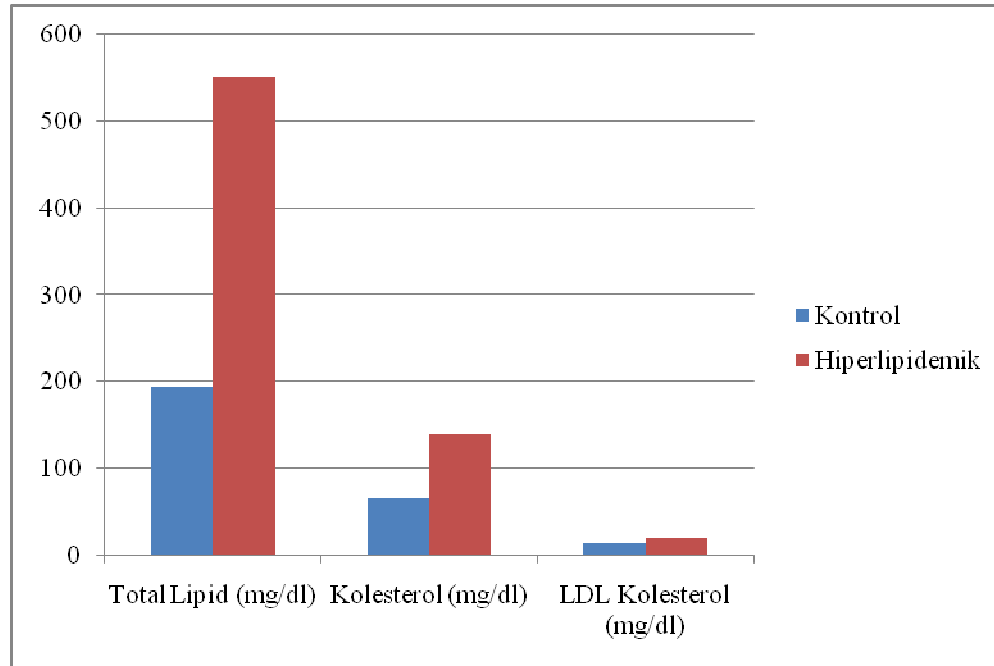
6.1.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması

Kontrol ve Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlardaki rutin serum lipid parametrelerinin istatistiksel değerlendirilmesi Tablo 6.1.1’de görülmektedir. Burada görüldüğü gibi Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlarda total lipid, total kolesterol, LDL kolesterol anlamlı derecede artmıştır. Şekil 6.1.1’de bu değerler görsel olarak gösterilmiştir.

Tablo 6.1.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Lipid Parametrelerinin Değerleri

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

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



Şekil 6.1.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Lipid Parametrelerinin Karşılaştırılması

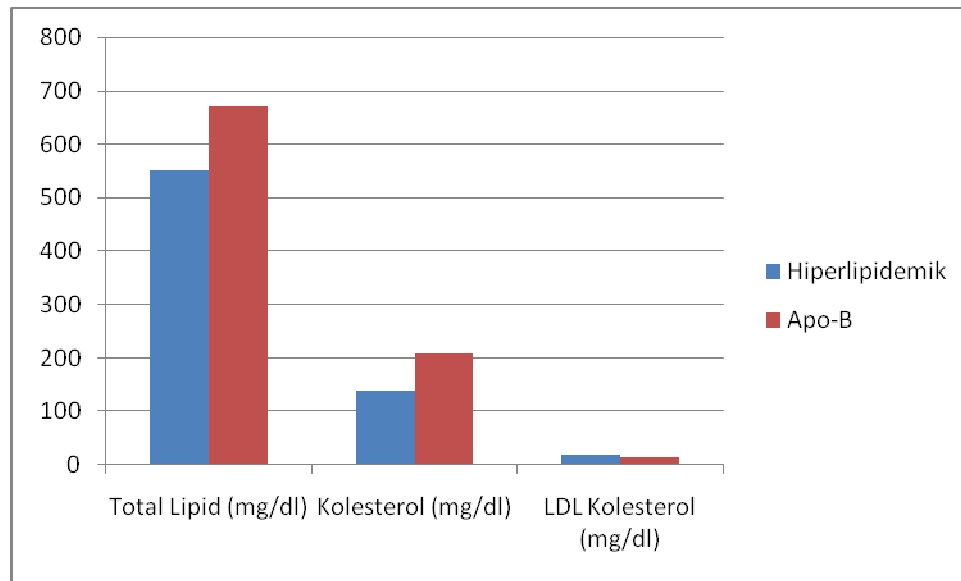
6.1.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması

Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlarda Apo-B konjugatı verildiğinde elde edilen rutin lipid parametrelerindeki değişimler istatistiksel olarak Tablo 6.1.2’de görülmektedir. Bu grupta total lipid, total kolesterol değerleri normal hiperlipidemik gruba göre daha da artış gösterirken LDL kolesterol değerinin düştüğü dikkati çekmiştir ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 6.1.2’ de bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.1.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Lipid Değerleri

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

*Değerler ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 6.1.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Lipid Parametrelerinin Karşılaştırılması

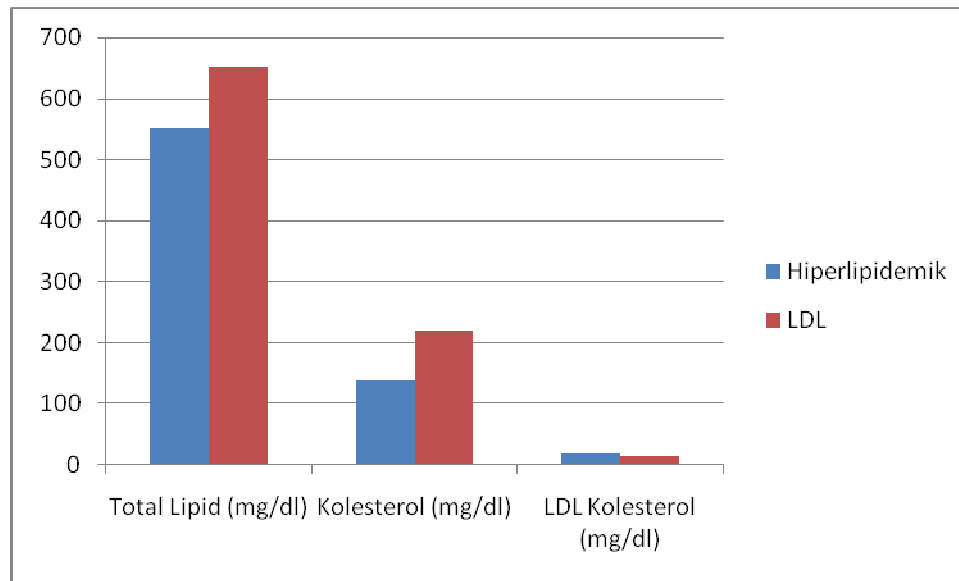
6.1.3. Hiperlipidemik ve LDL Gruplarının Karşılaştırılması

Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlara LDL konjugatı verildiğinde elde edilen rutin lipid parametrelerindeki değişimler istatistiksel olarak Tablo 6.1.3’de görülmektedir. Bu grupta total lipid ve Total kolesterol değerleri normal hiperlipidemik gruba göre daha da artış gösterirken LDL kolesterol değerlerinin düştüğü dikkati çekmiştir ($p<0.05$ anlamlı). Şekil 6.1.3’de bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.1.3: Hiperlipidemik ve LDL Gruplarının Lipid Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	LDL (n:8)	P
Total Lipid	551,85±52,2	650,81±46,08	0,005
Total Kolesterol	138,99±10,1	219,34±23,02	0,001
LDL Kolesterol	18,5±1,81	13,94±1,97	0,001

*Değerler ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 6.1.3: Hiperlipidemik ve LDL Gruplarında Lipid Parametrelerinin Karşılaştırılması

6.2. Serumda Ox-LDL Sonuçları

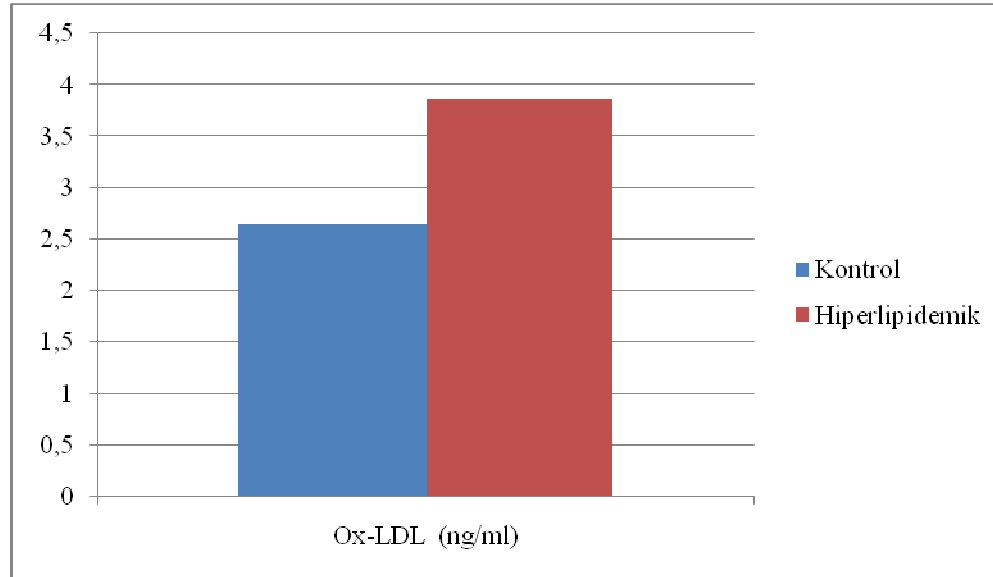
6.2.1. Serum Ox-LDL Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması

Kontrol ve Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlardaki ox-LDL değerleri istatistiksel olarak Tablo 6.2.1’de görülmektedir. Şekil 6.2.1’de de görsel olarak görüldüğü gibi hiperlipidemi ile birlikte ox-LDL değerleri anlamlı bir şekilde artmıştır.

Tablo 6.2.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Serum Ox-LDL Değerleri

	Kontrol (n:8)	Hiperlipidemik (n:8)	P
Ox-LDL	2,64±0,53	3,87±0,8	0,024

*Değerler ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 6.2.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Serum Ox-LDL Değerlerinin Karşılaştırılması

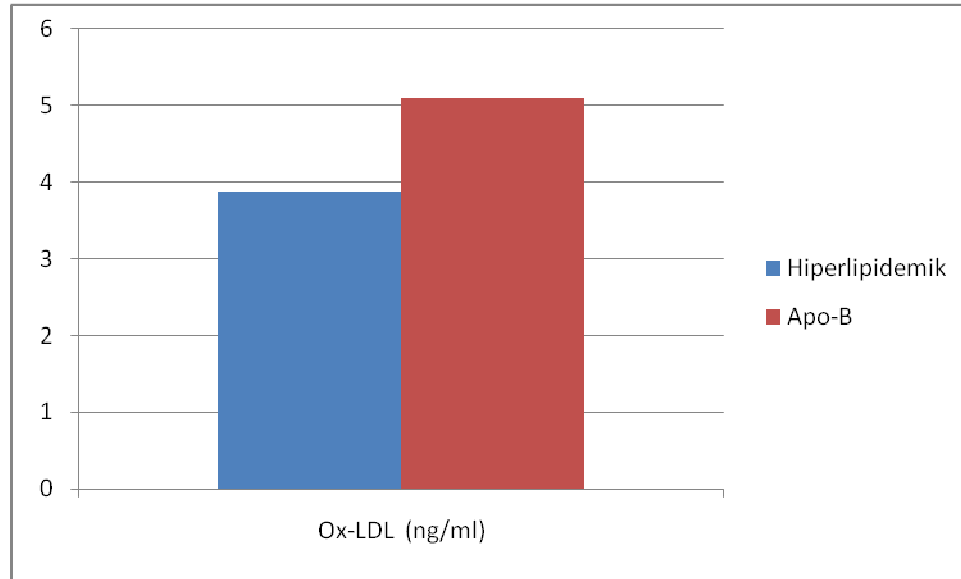
6.2.2. Serum Ox-LDL Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karşılaştırılması

Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlara Apo-B konjugatı verildiğinde elde edilen ox-LDL değeri istatistiksel olarak Tablo 6.2.2’de görülmektedir. Şekil 6.2.2’de görsel olarak da görüleceği gibi bu grupta ox-LDL değerinin azalması beklenirken artmıştır.

Tablo 6.2.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Serum Ox-LDL Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	Apo-B (n:8)	P
Ox-LDL	3,87±0,8	5,1±1,37	0,04

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



Şekil 6.2.2: Serum Ox-LDL Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Karşılaştırılması

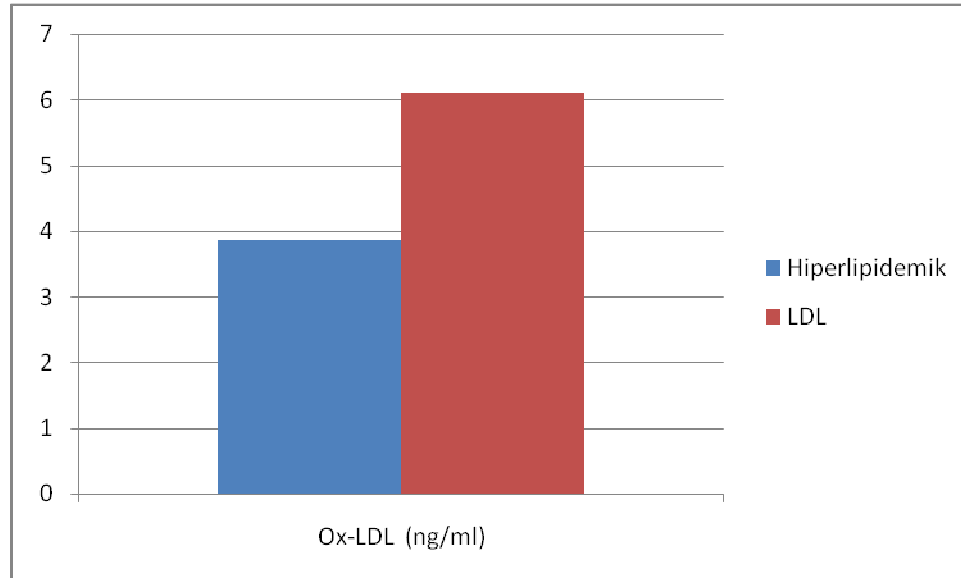
6.2.3. Serum Ox-LDL Hiperlipidemik ve LDL Grupların Karşılaştırılması

Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlara LDL konjugatı verildiğinde elde edilen ox-LDL değerlerinin değişimi istatistiksel olarak Tablo 6.2.3’de görülmektedir. Okside LDL değerleri LDL konjugatı verildikten sonra daha da artmıştır. Şekil 6.2.3’de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.2.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları Serum Ox-LDL Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	LDL (n:8)	P
Ox-LDL	3,87±0,8	6,11±1,28	0,002

*Değerler ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. P<0.05 anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 6.2.3: Serum Ox-LDL Hiperlipidemik ve LDL Gruplarının Karşılaştırılması

6.3. Karaciğer Homojenatında Ox-LDL Sonuçları

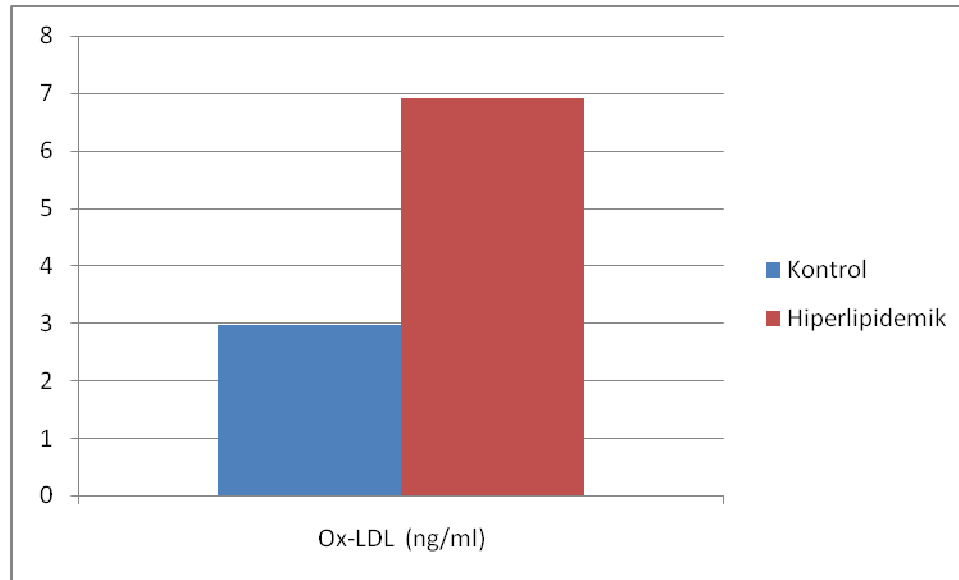
6.3.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında kontrol ve hiperlipidemik grupların ox-LDL sonuçları istatistiksel olarak Tablo 6.3.1’de görülmektedir. Karaciğer homojenatında ox-LDL değerleri kontrol grubuna göre hiperlipidemik grupta anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 6.3.1’de bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.3.1: Karaciğer Homojenatında Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları Ox-LDL Değerleri

	Kontrol (n:8)	Hiperlipidemik (n:8)	P
Ox-LDL	2,96±0,25	6,9±1,6	0,001

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



Şekil 6.3.1: Karaciğer Homojenatında Kontrol ve Hiperlipidemik Gruplarının Ox-LDL Karşılaştırılması

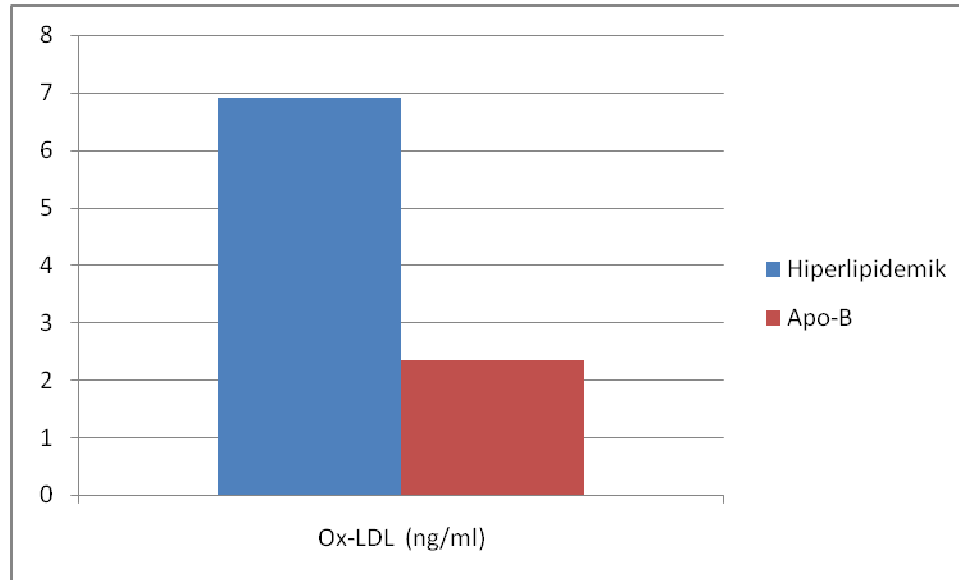
6.3.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karşılaştırılması

Apo-B konjugatı verilmiş hiperlipidemik grubun karaciğer homojenatında ox-LDL değerlerinin sonucu istatistiksel olarak Tablo 6.3.2’de görülmektedir. Apo-B konjugatı ilavesi ile hiperlipidemik grupta karaciğer homojenatında ox-LDL değerleri anlamlı olarak azalmıştır. Şekil 6.3.2’de bu tablodaki değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.3.2: Karaciğer Homojenatında Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Ox-LDL Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	Apo-B (n:8)	P
Ox-LDL	6,9±1,6	2,33±0,5	0,001

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



Şekil 6.3.2: Karaciğer Homojenatında Hiperlipidemik ve Apo-B Gruplarının Ox-LDL Karşılaştırılması

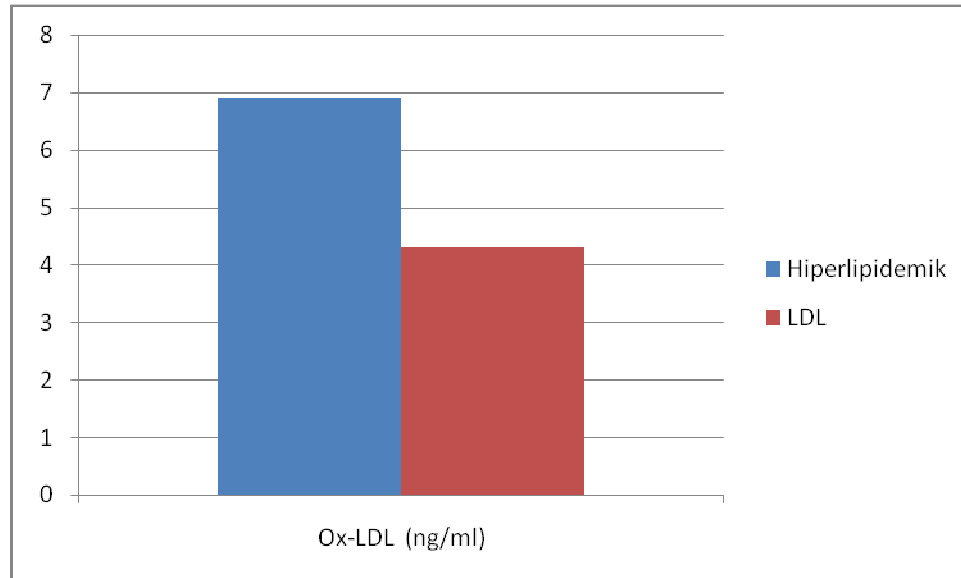
6.3.3. Hiperlipidemik ve LDL Grupların Karşılaştırılması

LDL konjugatı verilmiş hiperlipidemik grubun karaciğer homojenatında ox-LDL değerleri istatistiksel olarak Tablo 6.3.3’de görülmektedir. Karaciğer homojenatında da hiperlipidemik grubun ox-LDL değerleri LDL konjugatı ilavesiyle anlamlı derecede azalmıştır ($p<0,05$ anlamlı). Fakat bu azalma Apo-B konjugatı ilave edilmiş gruba göre daha azdır. Şekil 6.3.3’de bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.3.3: Karaciğer Homojenatında Hiperlipidemik ve LDL Grupları Ox-LDL Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	LDL (n:8)	P
Ox-LDL	6,9±1,6	4,29±1	0,003

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



Şekil 6.3.3: Karaciğer Homojenatında Hiperlipidemik ve LDL Gruplarının Ox-LDL Karşılaştırılması

6.4. Karaciğer Homojenatında Total Protein Sonuçları

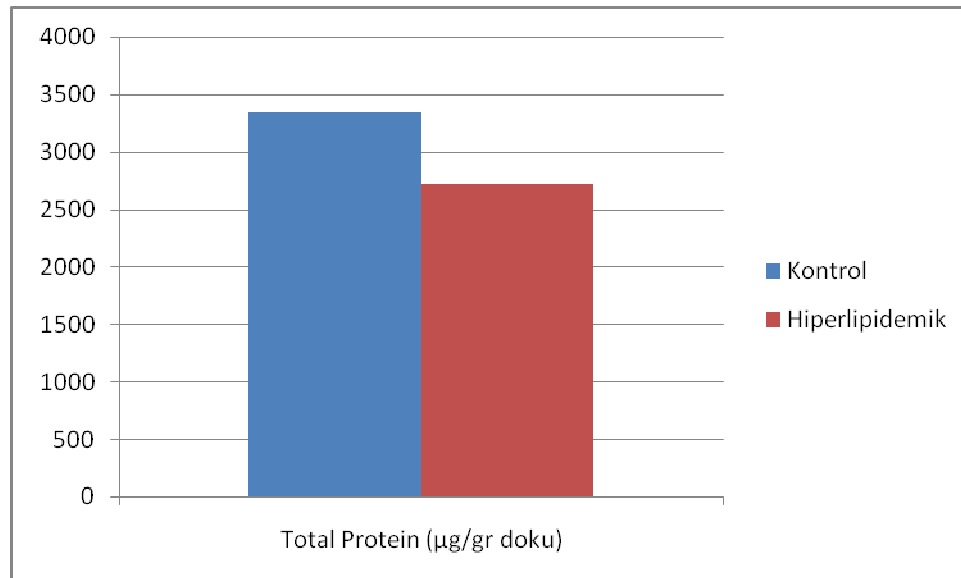
6.4.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında kontrol ve hiperlipidemik grupların total protein değerleri istatistiksel olarak Tablo 6.4.1’de görülmektedir. Total protein değeri hiperlipidemik grupta kontrol grubuna göre azalma göstermiştir ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 6.4.1’de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.4.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları Total Protein Değerleri

	Kontrol (n:8)	Hiperlipidemik (n:8)	P
Total Protein	3346,35±403,66	2716,14±525,15	0,023

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



Şekil 6.4.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları Total Protein Değerlerinin Karşılaştırılması

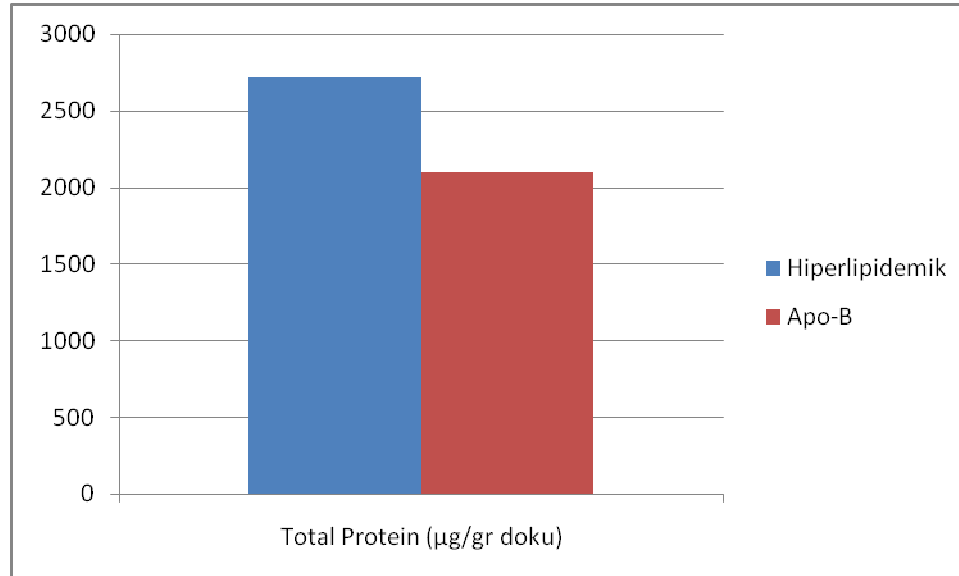
6.4.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında hiperlipidemik grubun total protein değerlerine Apo-B konjugatının etkisi istatistiksel olarak Tablo 6.4.2’de görülmektedir. Apo-B konjugatı ilavesiyle hiperlipidemik grubun total protein değeri daha azalmıştır ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 6.4.2’de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.4.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Total Protein Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	Apo-B (n:8)	P
Total Protein	2716,14±525,15	2098,95±222,09	0,001

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



Şekil 6.4.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Total Protein Değerlerinin Karşılaştırılması

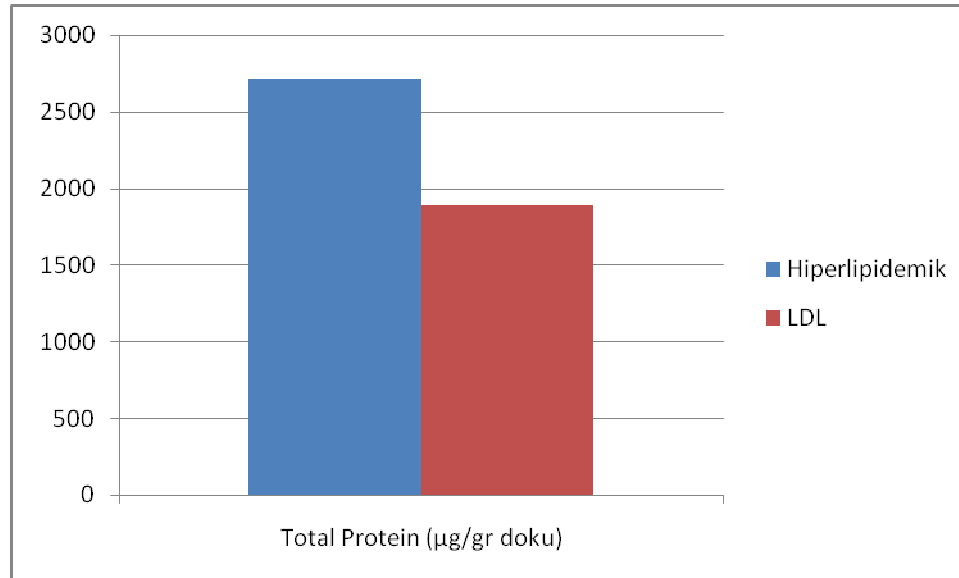
6.4.3. Hiperlipidemik ve LDL Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında hiperlipidemik grubun total protein değerlerine LDL konjugatının etkisi istatistiksel olarak Tablo 6.4.3’de görülmektedir. LDL konjugatı etkisi ile hiperlipidemik grubun total protein değeri Apo-B konjugatı ilavesine göre daha da azalmıştır ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 6.4.3’de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.4.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları Total Protein Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	LDL (n:8)	P
Total Protein	2716,14±525,15	1890,62±312,15	0,001

*Değerler ortalama±Standart sapma olarak verilmiştir. $P<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.



Şekil 6.4.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları Total Protein Değerlerinin Karşılaştırılması

6.5. Karaciğer Homojenatında Glutasyon (GSH) ve Lipid Peroksidasyon (LPO) Sonuçları

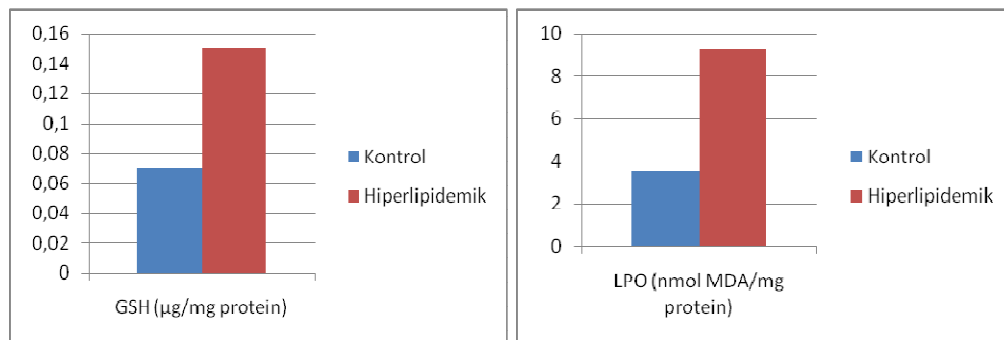
6.5.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında kontrol ve hiperlipidemik grupların glutasyon (GSH) ve lipid peroksidasyon (LPO) değerleri istatistiksel olarak Tablo 6.5.1’de görülmektedir. Hiperlipidemik grupta hem glutasyon hemde lipid peroksidasyon değerleri anlamlı bir şekilde artmıştır ($p < 0,05$ anlamlı). Şekil 6.5.1’de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.5.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları GSH ve LPO Değerleri

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

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



Şekil 6.5.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları GSH ve LPO Değerlerinin Karşılaştırılması

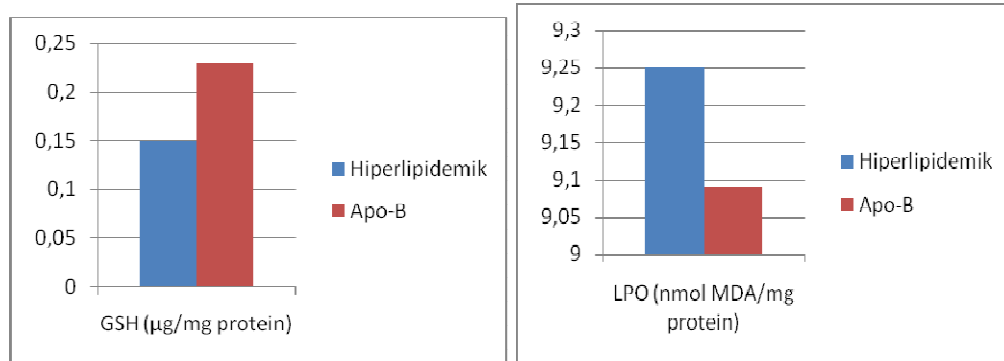
6.5.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında hiperlipidemik grubun glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyon (LPO) değerine Apo-B konjugatının etkisi istatistiksel olarak Tablo 6.5.2’de görülmektedir. Apo-B konjugatının hiperlipidemi durumunda glutatyona (GSH) etkisi anlamlı olarak artmış, lipid peroksidasyona (LPO) etkisi anlamsız olarak azalmıştır ($p < 0,05$ anlamlı). Şekil 6.5.2’de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.5.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları GSH ve LPO Değerleri

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

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



Şekil 6.5.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları GSH ve LPO Değerlerinin Karşılaştırılması

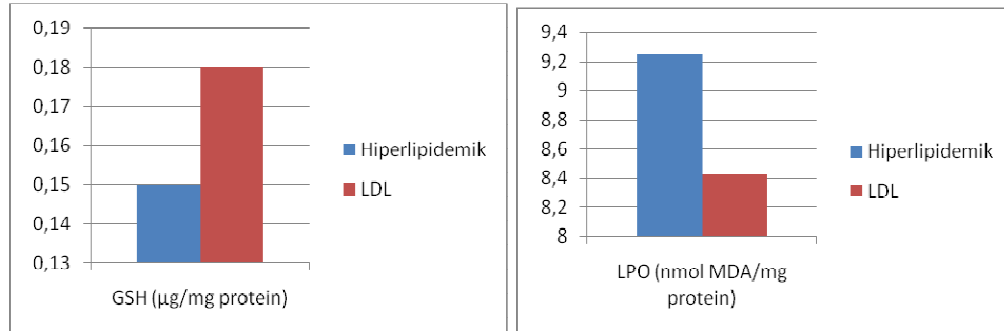
6.5.3. Hiperlipidemik ve LDL Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında hiperlipidemik grubun glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyon (LPO) değerine LDL konjugatının etkisi istatistiksel olarak Tablo 6.5.3’de görülmektedir. LDL konjugatının hiperlipidemi durumunda glutatyon (GSH) ve lipid peroksidasyona (LPO) etkisi anlamsız olarak artmış ve azalmıştır ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 6.5.3’de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.5.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları GSH ve LPO Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	LDL (n:8)	P
GSH ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	$0,15\pm0,04$	$0,18\pm0,05$	0,2
LPO (nmol MDA/mg protein)	$9,25\pm1,85$	$8,42\pm2,15$	0,2

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



Şekil 6.5.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları GSH ve LPO Değerlerinin Karşılaştırılması

6.6. Karaciğer Homojenatında Sialik Asid Sonuçları

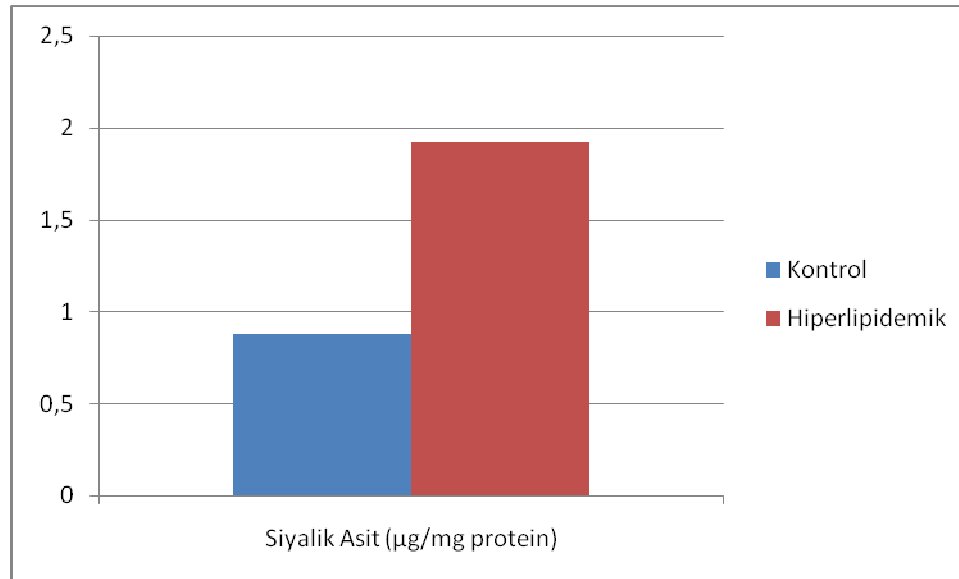
6.6.1. Kontrol ve Hiperlipidemik Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatında kontrol ve hiperlipidemik grupların sialik asid sonuçları istatistiksel olarak Tablo 6.6.1’de görülmektedir. Hiperlipidemik grupta sialik asid değerleri anlamlı derecede artmıştır ($p<0,05$ anlamlı). Şekil 6.6.1’de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.6.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları Sialik Asid Değerleri

	Kontrol (n:8)	Hiperlipidemik (n:8)	P
Siyalik Asit ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	$0,88\pm0,36$	$1,92\pm0,32$	0,001

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



Şekil 6.6.1: Kontrol ve Hiperlipidemik Grupları Sialik Asid Değerlerinin Karşılaştırılması

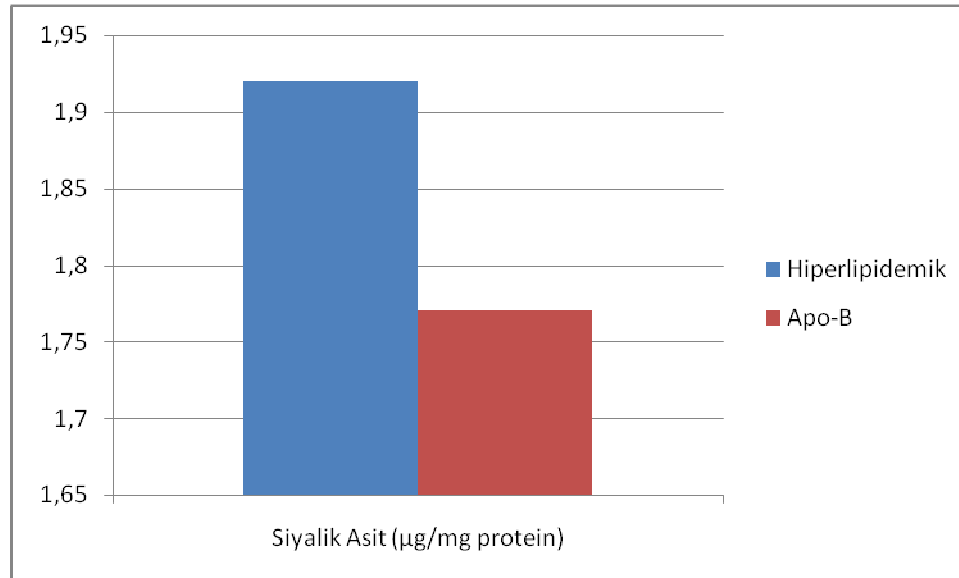
6.6.2. Hiperlipidemik ve Apo-B Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatındaki hiperlipidemik gruba Apo-B ilave edildiğinde sialik asid değerlerinin nasıl değiştiği istatistiksel olarak Tablo 6.6.2’de görülmektedir. Apo-B ilavesi ile hiperlipidemik grubun sialik asid düzeyi azalmıştır, fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$ anlamlı). Şekil 6.6.2’de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.6.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Sialik Asid Değerleri

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

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



Şekil 6.5.2: Hiperlipidemik ve Apo-B Grupları Sialik Asid Değerlerinin Karşılaştırılması

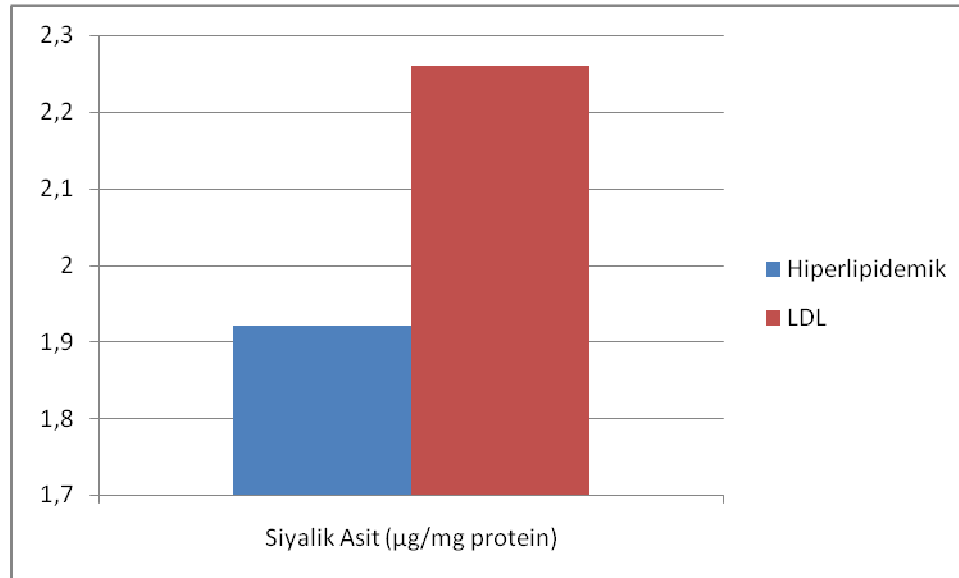
6.6.3. Hiperlipidemik ve LDL Grupların Karşılaştırılması

Karaciğer homojenatındaki hiperlipidemik gruba LDL ilave edildiğinde sialik asid değerlerinin nasıl değiştiği istatistiksel olarak Tablo 6.6.3’de görülmektedir. LDL ilavesi ile hiperlipidemik grubun sialik asid düzeyi artmıştır, fakat bu artma istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p < 0,05$ anlamlı). Şekil 6.6.3’de tablodaki bu değerler görsel olarak görülmektedir.

Tablo 6.6.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları Sialik Asid Değerleri

	Hiperlipidemik (n:8)	LDL (n:8)	P
Siyalik Asit ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	1,92 $\pm$ 0,32	2,26 $\pm$ 0,42	0,1

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



Şekil 6.6.3: Hiperlipidemik ve LDL Grupları Sialik Asid Değerlerinin Karşılaştırılması

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada 60 gün boyunca hiperlipidemik yem ile beslenen C57BL/6 tipi farelerin serum oksidasyona uğramış LDL değerleri ve bu değerlere Apo B ve LDL konjugatının etkisi kanda ve karaciğer homojenatında incelendi. Ayrıca karaciğer homojenatında lipid peroksidasyon ve siyalik asid değerleri kontrol grubu ile mukayeseli olarak incelendi.

Kısa süreli hiperlipidemi yapılan deney hayvanlarında hiperlipidemi ile birlikte LDL'nin oksidasyonunda da artış görülmüştür. Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlara Apo-B konjugatı ve LDL konjugatı verilmesi oksidasyonu etkilememiş daha ötesi ox-LDL'nin azalması beklenirken artma görülmüştür. Bu durum hücrel immunitede önemli görevi olan T lenfositlerinin aterosklerozun her safhasında yer alması nedeniyle ilk tepki olarak değerlendirilebilir.

Roselaar ve ark (78) siklosporin A (CyA) verdikleri tavşan ve C57BL/6 tipi farelerde T lenfositlerin aktivasyonunu önleyerek ateroskleroz ile immun sistem arasındaki ilişkiyi anlamaya çalışmışlardır.

Hücrel immunitede önemli görevi olan T lenfositlerin aterosklerozun her safhasında yer almaktadır (42,84,91). Yüksek kolesterolli diyetle beslenen tavşanlarda gelişen aterosklerozun erken safhalarından itibaren T lenfositlere rastlanmıştır. İnsandaki aterosklerotik lezyonlarda hem helper (CD4+), hem de baskılayıcı T hücreleri (CD8+) vardır. Tavşalarda gelişen lezyonda CD4+'nın daha baskın olduğu görülmüştür. T lenfositleri fazlaca sitokin üretirler. Sitokinler hücre göçünde, proliferasyonunda etkili olduğu gibi kolesterol bakiğinde de etkili olabilmektedir. Siklosporin A (Cy A); IL-2'nin transkripsiyonunu önleyerek T hepler lenfositlerin aktivasyonunu önler. CyA aynı zamanda IFN- γ , IL-3, IL-4, TNF- α sentezini inhibe eder. CyA'nın kandaki konsantrasyonu sadece hücrel immuniteyi baskılayacak dozda ayarlanmasına dikkat etmek gerekir. Çünkü yüksek dozda CyA nefrotoksiktir, hipertansiyon yapar ve lipoprotein konsantrasyonunu değiştirir diyen araştırmacılar, CyA'dan sonra kanda total kolesterolün değişmediğini görmüşlerdir. Renal fonksiyonun bozulmadığı da kandaki kreatinin konsantrasyonu ile kanıtlayan

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

Yli-Hertuala ve ark (107) hücrel immunitenin yanında humoral immunitenin de ateroskleroz gelişiminde etkisini incelemişlerdir. Bunun için de aterosklerotik lezyonda immunglobulinlerin durumuna bakmışlardır. Oksidasyon sonunda meydana gelen malondialdehid LDL'ye bağlandığında (MDA-LDL) meydana gelen otoantikorlar hem insan hem de hayvanlarda bulunmuştur. İnsanda MDA-LDL antikor titresi ile karotid aterosklerozunun gelişmesi ile korelasyonlu bulunmuştur. Ayrıca tavşanların MDA-LDL ile immunizasyonu ateroskleroz gelişimini azaltmıştır. MDA-LDL antikorlu saptanan bir çalışmada kontrol grubu ile CyA verilen grup arasında bir fark bulunmamıştır.

Hücrel immunitenin proaterojenik etki göstermesinin nedeni muhtemelen sitokin salınımının artması nedeniyledir. Çünkü lenfositler pek çok sitokin salınmasını sağlar. Bunlar içinde özellikle IFN- γ aterojenezde önemlidir. Çünkü lezyonda bu sitokine rastlanmıştır. Diğer taraftan IFN- γ skavenger reseptörler aracılığı ile makrofajlara kolesterol yığılmasını regüle ettiğini bildirmektedir (78).

Bizim çalışmamızda başlangıçta ve 7. günde hayvanlara enjekte ettiğimiz Apo B ve LDL konjugatlarının etkili olmamasının bu mekanizma içinde çeşitli nedenleri olabilir. Çünkü ateroskleroz multifaktörial bir prosesdir. En belirgin özelliği lipidlerin arter duvarına birikmesidir. Bu birikime mononükleer hücre infiltrasyonu ve düz kas hücrelerinin proliferasyonu da iştirak eder. Aterosklerotik lezyonun çeşitli safhalarında T hücrelerinin ve immunglobulinlerin bulunması bu oluşumda immun sistemin de etkili olduğu kabul edilmektedir. Ox-LDL gibi vermiş

olduğumuz konjugatları da immunojen olarak kabul etmiş ve yanıtı kısa süreli hiperlipidemide olumsuz olmuştur diye düşünmekteyiz.

Okside LDL'nin ateroskleroza hızlandırdığına dair ilk kanıt insan ve hayvan aterosklerotik lezyonlarında okside LDL'nin bulunması olmuştur. Burada ayrıca T lenfositlerinin de bulunmasının nedeni ox-LDL'yi tanıma amacı ile olduğu düşünülmektedir. Hayvanlarda homolog ox-LDL ile yapılan immunizasyon çalışmaları ateroskleroz gelişmesinde ve neointimal formasyonda zararlı değil, faydalı olduğu da görülmüştür (74).

Yapılan çalışmalar aterojenezde immun sistemin önemli olduğunu bildirmektedir. Bu nedenle immunolojik reaksiyonları başlatacak güçlü antijenlere dikkat çekilmiştir. Isı şok proteini (HSP-65) ile immunize edilmiş C57BL/6J farelerde yağlı çizgi oluşumu hızlanmıştır. George ve ark (29) normal ve kolesterol yüksek diyetle beslenen C57BL/6J farelerde HSP-65 ve HSP-65'den zengin mikobakterium tüberkülozis (MT) ile immunize etmişlerdir. MT yapısal olarak antijeniteyi arttıran bir bakteri türüdür. Bu nedenle HSP ile birlikte verilmiştir. HSP-65 ve HSP-65+MT'ye hızlı bir şekilde hücrel immun cevap geldiği halde, fosfat salin tampon (PSB) ile immunize edilenler ve hiç immunize edilmeyenlerde hücrel immun cevap yoktu. Ayrıca HSP-65 ve HSP-65+MT ile immunize edilen hayvanlarda gelişen aterosklerotik lezyonun büyüklüğü kontrol grubuna göre çok fazla idi. Değerlere bakıldığında; HSP-65 (n=10, ortalama aortik lezyon boyutu $45417 \pm 9258 \mu m^2$), HSP-65+MT (n=15, $66350 \pm 6850 \mu m^2$), PBS tamponlu olan (n=10, $10028 \pm 3599 \mu m^2$), hiç immunize edilmemiş grubun değerleri (n=10, $9500 \pm 2120 \mu m^2$) olarak görülmektedir. Proteinlerle immunize edilmiş hayvanların aortik lezyonlarında immunohistokimyasal analizde CD4 lenfosit infiltrasyonu vardı. Kontrol gruplarında ise çok azdı. Yağ çizgi oluşumu da HSP-65 ve HSP-65+MT ile immunize edilmişlerde kontrol grubuna göre fazlaydı. Bu çalışma aterojenezde immun sistemin ilişkisini ortaya çıkarmak yönünden önemli bulgulara sahiptir.

Xu ve ark (103) kolesterolü normal olan tavşanları rekombinant HSP-65 ve MT ile zenginleştirilip HSP-65 ile immunize etmişler ve hayvanları normal yem ile besledikleri halde ateroskleroz geliştiğini görmüşlerdir. Daha sonra aynı araştırmacılar HSP-60'ın ateroskleroz lezyon içinde eksprese edildiğini göstermişlerdir. Karotid

aterosklerozunda ve koroner kalp hastalıklarında antijene karşı humoral cevabın arttığı da görülmüştür.

Yapılan çalışmalar ox-LDL'nin CVH için iyi bir belirteç olduğunu söylemektedir. Aterosklerotik lezyonlarda makrofajlardan türeyen köpük hücrelerinde immunohistokimyasal çalışmalarda anti-ox-LDL monoklonal antikolar kullanılarak ox-LDL'nin biriktiği gösterilmiştir (44,70). Bu kanıtlara dayanılarak ox-LDL'nin ateroskleroz patogenezinde önemli olduğu savunulmaktadır. Buna rağmen ox-LDL'nin kan düzeyleri ile ilgili olarak anlaşılması gereken pek çok nokta vardır.

Kardiovasküler hastalığın belirtileri genellikle orta ve ileri yaşlarda görülür. Aterosklerozun gelişimi yıllar sürer. Ancak ilerleyen zamanlarda arterlerin daralması ve kanlanmanın azalması ile klinik belirtiler ortaya çıkar. Gelişim süresinin uzun zaman alması ve belirsizliğin nedeni ile araştırmacılar ateroskleroz çalışmalarında patogeneze için kesin bir şey söylemekte zorlanmaktadır. Bu nedenle ox-LDL gibi bir ipucu bulan araştırmacılar çözüme yaklaşmak için, bu noktada metodolojiye de önem vererek hızla ilerlemektedir.

Kandaki ox-LDL ölçümünde üzerinde önemle durulan nokta; bu değerlerin kişinin geleceğini ateroskleroz yönünden belirleyip belirlemeyeceğidir.

ELISA yöntemi ile kanda ölçülen ox-LDL düzeyleri; koroner arter hastalıklarında, karotid arter hastalıklarında, ateroskleroz nedeniyle transplantasyon yapılanlarda ve hemodiyaliz hastalarında yükselmiştir. Diyabetiklerde de ox LDL düzeylerinin arttığı bildirilmiştir. Endotel fonksiyonu ve damar vazodilasyonuna cevap ile ox-LDL arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmiştir. Plazma ox LDL düzeyi hastalıkların değişik fazlarında farklılıklar gösterebilmektedir. Akut miyokard infarktüsün (AMI) hemen akabinde, serebral infarkta, koroner anjiyografi uygulamalarını takiben en yüksek artışı göstermiştir. . Hastaların hastanede kalış süreleri ve sonrasında ölçümler yapılmış en yüksek ox-LDL düzeyi akut fazda olmuştur. AMI'de plak yırtılmasının dolaşımdaki göstergesi ox-LDL'nin artışı şeklinde olmuştur (43).

Statinlerin ox-LDL'ye etkisini inceleyen birkaç çalışma vardır. Inami ve ark. (Lit.43 içinde 49) Kyowa Medex (MX) kiti kullanarak kolesterolü yüksek kişilerde prevastatin tedavisinden önce ve 12 saat sonra ox-LDL düzeyini ölçmüş LDL

kolesterolün % 22 oranında azaldığını ox-LDL'nin % 21 oranında azaldığı bildirmişlerdir. Fluvastatin tedavisi ile kandaki ox-LDL konsantrasyonunun % 51 azaldığını fakat LDL kolesterol azalmasının % 15 lerde kaldığını bildirmişlerdir. Fluvastatinin antioksidan özelliği bilinmektedir. Bu nedenle, fluvastatin HMG-redüktaz inhibitörü etkisinin yanında, LDL'nin in vivo oksidasyonunu da inhibe ettiği düşünülmüştür.

Bir başka çalışmada (Lit. 43'de 35) atorvastatinin ox-LDL üzerine etkisi incelenmiştir. Burada 2341 AMI, stabil olmayan anjina pectorisde (UAP) ve plasebo 16 hafta süre ile takip edilmiş ve ox-LDL/Apo-B oranı Witztum's yöntemi ile ölçülmüştür. Atorvastatin apo B miktarını % 34 azaltırken ox-LDL/Apo-B oranında % 9,5 artış olduğu bildirilmiştir. Hulthe ve Fagerberg (Lit. 43'de 50) Mercodia'nın kitini kullanarak klinik olarak sağlıklı görülen fakat intima-medya kalınlığı ile birlikte aterosklerotik plak saptanan kişilerle kandaki ox-LDL konsantrasyonunun korelasyonlu olduğunu bildirmişlerdir.

Holvoet ve ark (40) kendi geliştirdikleri Holvoet yöntemi ile kanda ox-LDL ölçmüşler; 3033 olguda ox-LDL konsantrasyonlarını metabolik sendromu olanlarda $1.45 + 0.82$ mg/dl, metabolik sendromu olmayanlarda ise, $1.23 + 0.67$ mg/dl olarak saptamışlar ve ileri derece anlamlı sonuç bulduklarını ($p < 0.0001$) bildirmişlerdir.

Itabe yöntemi kullanılarak yapılan bir başka çalışmada (43), AMI geçiren hastaların kandaki ox-LDL düzeyleri, UAP, stabil anjina pectoris (SAP) ve kontrollere göre yüksek bulunmuştur. Tsimikas ve ark (96) Witztum yöntemi ile yaptıkları ELISA çalışmasında AMI'de yüksek ox-LDL düzeylerini görmüşlerdir. Araştırmacılar kanda ox-LDL'nin geçici olarak yüksek bulunması akut koroner sendromun işaretçisi olduğunu bildirmişlerdir. Literatürde bu bulgulara aykırı sonuçlar da vardır. Brun ve ark (Lit. 43'den 54) 386 SAP, 109 UAP ve 192 AMI'li hastada Mercodia kiti ile yapmış oldukları ox-LDL değerlerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır.

Ox-LDL ölçümünde; hepsinde temel prensip immunolojik olmakla beraber farklı tip yöntemlerle farklı ox-LDL'ler ölçülmektedir. Sjögren ve ark (Lit.43'de 55) Mercodia kiti ile yaptığı çalışmada; metabolik sendromlu hastaların ox-LDL

değerlerini kontrol grubundan farklı bulmamışlardır. Ancak literatürde çoğunluğun görüşü, ox-LDL'nin diagnostik ve prognostik öneminin olduğudur.

Naruko ve ark (68) 102 AMI geçiren hastada hastanede kalış süreleri içinde ox-LDL düzeyleri $1.55 \pm 1.21 \text{ ng/5}\mu\text{g}$ bulmuşlardır. Bu değerler kontrol grubunun 3 kat fazlasıdır. Hastaneden ayrıldıktan sonra bu değerler $0.71 \pm 0.47 \text{ ng/5}\mu\text{g}$ olmuştur. 102 AMI infarktüs geçiren hastanın 25 tanesinde 6 ay içinde restenoz gelişmiştir. Restenoz gelişen olguların ox-LDL değerleri $1.03 \pm 0.65 \text{ ng/5}\mu\text{g}$ 'dır. Restenoz gelişmeyen olguların değerleri ise, $0.61 \pm 0.34 \text{ ng/5}\mu\text{g}$ 'dır. Stabil fazda yüksek ox-LDL değerlerinin nedeni bu kişilerin yüksek oksidatif strese maruz kalmaları ya da başka unstabil plakların varlığı nedeni ile olabileceği düşünülmektedir. Bir başka çalışma grubunda plazma ox-LDL düzeyi Mercodia kiti ile ölçülmüş ve şu sonuçlar elde edilmiştir (Lit.43'den 53). AMI geçiren hasta grubunda kandaki ox-LDL düzeyi kontrole göre yüksek bulunmuştur. Bu hastaların ox-LDL değerleri CRP ile korelasyonlu çıkmamıştır. İnflamasyon göstergesi olarak kabul edilen CRP ile ox-LDL'nin aynı hastalarda birbiri ile korele olmaması ox-LDL'nin bağımsız bir risk faktörü olduğunu düşündürmüştür.

Apo E knockout (Apo E KO) yapılmış fareler ateroskleroza araştırmak için iyi bir model olarak kabul edilmektedir. Apo E yokluğunda VLDL ve LDL'nin periferel dokular tarafından alınması azaldığı için kanda kolesterol yükseliyor. Daha ötesi Apo E yokluğunda aterosklerotik lezyondan karaciğere giden revers kolesterol transpor da anlamlı olarak azalmıştır (26).

Kato ve ark (50) kendi yaptıkları mAb (monoklonal antikor) ile Elisa tekniğini kullanarak kanda dolaşan ox-LDL'yi ölçmüşlerdir. Dolaşan kanda ox-LDL ölçen başka araştırmacılar da vardır. mAbs kullanılarak kanda yapılan ölçümlerde CVH'lı hastalarda ox-LDL'nin yükseldiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar ayrıca ApoE KO farelerde doğumu takip eden 20 hafta içinde ox-LDL düzeylerinin giderek arttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada Apo E KO fareler doğumdan itibaren 40 hafta chow diyetle beslenmişlerdir. Ox-LDL ve aterosklerotik lezyon gelişmesi 40 hafta boyunca incelenmiştir. Deneklerin vücut ağırlığı 40 hafta boyunca giderek artmıştır. Total kolesterol 4. haftada 337 ± 25.4 , 10 haftada 583.8 ± 107 , 20. haftada 734.5 ± 141 , 28. haftada 924.2 ± 138.4 40. haftada $727.9 \pm 59.5 \text{ mg/dl}$ olmuştur. Total

kolesterol değerleri 28. haftada pig yapmış, 40. haftada düşmüş ve 20. hafta değerine gelmiştir. LDL kolesterol 28. haftada pig yaparak 269.7 + 81.7 olmuş, 40. haftada 173.0 + 54.3 olarak düşmüş ve bazal değere ulaşmıştır. Bazal değer olarak kabul edilen 4. hadtadaki LDL değeri 175.5 + 12.2 mg/dl'dir.

Apo E KO farelerdeki ateroskelrotik lezyonlar oil red o boyası kullanılarak görüntülenmiştir. Doğumu takiben 10. haftada aortun yüzeyinde birçok ateroskelrdotik lezyon fark edilmeye başlanmıştır. 10. Haftada bu lezyonların kesitlerinde kapladığı alan % 0.5 'dir. 20 haftada % 3 olmuştur. 20. haftayı takip eden günlerde arterlerdeki lezyon artışı dramatik bir şekilde yükselmiş ve buna bağlı olarak damar daralması hızla artmıştır. Bu süreçlerde ox-LDL değişimleri de ilginç bir değişim göstermiştir. Kanda 20. haftada en yüksek ox-LDL değerine ulaşılmıştır. 4. haftadan itibaren yükselmeye başlayan ox-LDL 20. haftada pig yapmış sonra azalmaya başlamış 40. haftada bazal değere yaklaşmıştır.

Hayvan çalışmalarına benzer çalışmalar myokard (Tsimikas 2003) ve beyin (70) infarktüsü geçiren hastalarda yapılmış ve ox-LDL miktarında geçici artışlar görülmüştür. Bunun sebebi ox-LDL'nin bir akut faz reaktanı gibi davranması olabildiği gibi, aterosklerotik plakdan zaman zaman kana verilen ox-LDL de olabilir. Bu geçici artış ilerlemiş lezyon alanı ile ilgili olarak ox-LDL deşarjı da olabilir. Oksidasyon ürünlerinin Apo EKO farelerede 28. haftada civarında en fazla olduğu ve kana geçtiği andan sonra lezyon artmış olarak orada dururken ox-LDL'nin bazal düzeye doğru yaklaşması ilginç bir bulgudur.

Anti-ox-LDL otoantikorları plazmadan ox-LDL'nin temizlenmesi için düşünülen bir yoldur. Çünkü ox-LDL düzeyi azalırken otoantikor konsantrasyonu değişmemiştir. Bu nedenle 40. haftaya doğru ox-LDL azalması otoantikorların etkisi ile olmuştur denemez. Bu süreçde ox-LDL düzeyinin değişmesinin nedeni oksidatif stres değişimleri ve de damar duvarındaki değişimler olabilir. Ancak Kato ve ark.(50) yaptığı bu çalışmada ilginç olan nokta ox-LDL'nin aterosklerotik lezyon gelişmeden önce ortaya çıkmasıdır. Aortik dokuda lipid peroksidasyon ürünleri ve ox-LDL fosfatidilkolin histokimyasal boyama ile 10. haftada ortaya çıkmıştır. Çalışmanın sonucu da bu noktaya odaklanmıştır. Yani ox-LDL aterosklerotik lezyonlar görülmeden kanda yükselmeye başlamıştır.

Biz bu nedenle kısa süreli deneysel hiperlipidemide ox-LDL'nin değişimini incelemek istedik ve arttığını gördük.

Lipoproteinlerin oksidasyonu ve oksidatif prosesler aterosklerotik lezyonun meydana gelmesinde ve sürecin hızlı ilerlemesinde önem taşıdığı insan ve hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda görülmüştür. Çünkü aterosklerotik lezyonda ox-LDL vardır (32). Ayrıca aterosklerotik lezyonlarda lipid peroksidasyon ürünleri; modifiye olmuş apoproteinler görülür. Burada vasküler hücrelerin sitotoksik hasarı da söz konusudur. Bu hasarın bilinen nedenleri şöyle özetlenebilir; Nitrik oksid salınması ile oluşan vazodilatasyona karşı çeşitli inhibe edici etkiler ile damar yapısı bozulur, geçirgenliği artar, monositlerin arter duvarını geçerek makrofajlardara dönüşür ve çöpcü reseptörler ile oksidlenerek modifiye olmuş LDL'yi toplamaya başlar. Bu esnada pek çok adezyon molekülleri ve sitokinler prosese katılarak bir taraftan da inflamatuvar yanıt prosesi devreye girer. LDL'nin oksidasyonu ile beraber lipid peroksidasyon işlemleri başlar ve reaktif aldehydler ortama çıkar. Lipid peroksidasyonu sırasında gelişen reaktif aldehydler LDL'de önemli bir protein olan Apo B'nin lizin ve histidin kalıntıları ile kovalant bağlar oluşturur. Böylece LDL üzerinde yüksek immunojeniteye sahip modifiye lizin kalıntıları belirir. Bu şekilde modifiye olmuş LDL'de MDA - lizinler ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) lizinler oluşur. Ox-LDL dediğimiz modifiye olan bu LDL'ler aterosklerotik lezyonda bulunur ve humoral immunitiyi başlatır. Bu şekilde ox-LDL'ye bağlanmış çeşitli otoantikorların varlığı gösterilmiştir. Bu otoantikorlar insanda, tavşanda ve sıçanlarda tespit edilmiştir (32). Yapılan çalışmalar MDL-LDL'ye bağlanmış otoantikorların aterosklerotik ilerlemeyi hızlandırdığı bildirilmiştir. Çünkü kontrol grubu ile yapılan çalışmalarda bu şekilde otoantikorların oluşumu ve buna bağlı olarak hızlanmış aterojenez gelişimi görülmemiştir. Birçok epidemiyolojik çalışmaların verilerine göre; MDA-LDL'ye bağlanmış otoantikorların veya bakır ile okside olmuş LDL'lerin (Cu-LDL) aterosklerozun ilerlemesini gösteren bir indikatör olarak kabul edilmesi benimsenmiştir. Karotid aterosklerozunda koroner arter hastalıklarında, diyabetiklerde, periferik damar hastalıklarında, hipertansiyonda, kanda modifiye LDL'ye karşı oluşan otoantikor titresinin arttığı bildirilmiştir (27). LDLR^{-/-} sıçanlarda yapılan bir çalışmanın sonuçları da oluşan otoantikor titresinin aortik ateroskleroz boyutu ile doğru orantılı olduğunu bildirmiştir. (27,50)

Freigang ve ark. (27) LDL reseptörü eksik olan ($LDLR^{-/-}$) mürinlerde okside LDL'nin çeşitli formları ile immunizasyon yapıp aterogenez oluşumunu değerlendirmişlerdir. Immunizasyonda 3 farklı grup 7 hafta süre ile immunojen verilmiştir. Oluşturulan gruplar; 1-homolog malondialdehid ile modifiye edilmiş LDL, kontrol olarak kullanılan doğal LDL ve yine kontrol olarak kullanılan fosfat buffer salin (PBS)'dir. İmmunizasyon devam ederken bu gruplar 17 gün süre ile kolesterolden zengin diyetle beslenerek aterojenez hızlandırılmıştır. IgM ve IgG gibi antikorların ve IgG1 ve IgG2 gibi izotopların ox-LDL'nin çeşitli formlarına bağlanması çalışma boyunca takip edilmiştir. 24 hafta sonra aortdaki ateroskleroz lezyonu incelendiğinde MDA-LDL'nin PBS'ye göre % 46.3, doğal LDL'nin ise yine PBS'ye göre % 36.9 oranında azalma gösterdiği görülmüştür. Aterosklerotik lezyondaki kesitlerin boyutu olarak bakıldığında MDA-LDL $133\ 558\ \mu m^2$, doğal LDL $157\ 141\ \mu m^2$, PBS'li olanda ise bu alan $248\ 867\ \mu m^2$ bulunmuştur. Aterosklerotik kesitlerde aterom plağı oluşumu böyle iken IgG antikorlarının bağlanması çok değişik olmuştur. IgG antikorları MDA-LDL grubundaki oksidatif neoepitoplara farklı bağlanmıştır. Örneğin; IgG; okside fosfolipide, okside kolesterole, okside kolesterol linoleata bağlanmış fakat doğal LDL'ye bağlanmamıştır. Yani MDA-LDL ile immunizasyonda IgG antikorları zamana bağlı olarak devamlı artış gösterdiği halde, doğal LDL ve PBS ile yapılan immunizasyonda bu artış görülmemiştir. MDA-LDL grupta; hem T helper 2 hücrelerine bağımlı IgG1 antikorları hem de T helper 1 hücrelerine bağımlı IgG2 antikorların oksidatif neoepitoplara bağlanması zamana bağlı olarak artış göstermiştir. Diğer taraftan immunize olan MDA-LDL ve doğal LDL ateroskleroz oluşumunda anlamlı artış gösterirken, MDA-LDL gruptaki antikor titresi, spesifik epitopların oksidasyonuna bağlı olarak çok yüksek bulunmuştur.

Bütün bu bulgular ox-LDL'ye karşı oluşan humoral ve hücrel immun cevapların ateroskleroz prosesinin önemli bir parçası olduğunu göstermektedir. Biz bu düşüncelerle hiperlipidemi oluştururken LDL'nin oksidlenmesini nasıl etkiler diye araştırmak amacıyla Apo B ve LDL konjugatı ile immunize ettik ve kısa süreli hiperlipidemide olumlu sonuç alamadık.

Karmaşık bir mekanizma olan aterosklerozun patogeneğinde ox-LDL'nin önemi büyüktür. Ox-LDL düz kas ve makrofajlarda aktivatör etki yaptığı gibi bu

hücrelerde TF ekspresyonunu da hızlandırarak pıhtılaşma sisteminin de olaya dahil olmasına neden olmaktadır.

C57BL/6 tipi fareler küçük olduğu için düşündüğümüz parametrelerin tamamını kanda yapmak mümkün olmadı. Bu düşüncelerle lipid metabolizmasında önemli bir yeri olan karaciğer hücrelerinde de LDL oksidasyonunu çalıştık. Oksidlenmiş LDL hiperlipidemik grupta kontrol grubuna göre karaciğer homojenatında da artış göstermiştir. Ancak ilginç olan nokta karaciğer homojenatında Apo B verilmiş grupta ox-LDL değerleri anlamlı olarak azalmıştır. Benzer azalmayı LDL konjugatı verilen grupta saptadık.

LDL kolesterolun oksidasyonu ile meydana gelen ox-LDL ateroskleroz patogenezinde serbest radikallerin ve lipid peroksitlerin önemini düşündürmüştür. Lipid peroksitlerinin çeşitli mekanizmalarla ateroskleroz etiyojoloji ve patogenezinde önemli oldukları gösterilmiştir. Kanda malondialdehid düzeylerinin ölçümü son yıllarda lipid peroksidasyonunun göstergisi olarak en sık kullanılan metodlardan biridir.

Biz bu çalışmada karaciğer homojenatında kontrol ve hiperlipidemik lipid peroksidasyon değerlerini malondialdehid düzeylerini ölçerek inceledik. Hiperlipidemik grupta lipid peroksidasyonunun arttığını gördük. Apo B konjugatının kısa süreli hiperlipidemi durumunda lipid peroksidasyonuna etkisi olmadığı saptandı. Benzer şekilde LDL konjugatının da hiperlipidemi durumunda lipid peroksidasyonuna etkisi olmadı yani beklediğimiz koruyucu etkisini göremedik.

Stabil bir molekülde elektronlar dış orbitalde çift olarak bulunmaktadır. Böylece her bir elektronun zıt spine sahip bir eşinin olması sağlanarak kararlı bir yapı oluşmaktadır. Eğer son yörüngedeki orbital elektron alırsa veya kaybederse, yani atom veya molekül bir veya daha çok sayıda çiftlenmemiş elektron taşır hale gelirse yapı artık bir serbest radikal halini alır. Bu şekilde elektron düzenleri bozulduğu için kararlılıklarını kaybetmiş ve bu yüzden reaktif hal almış atom veya molekül grupları olan serbest radikaller oksidasyona neden olduğu için aterosklerozda üzerinde önemle durulan konulardan biridir (33,52,67) .

Oksijen özel atomik yapısı nedeniyle radikal oluşumlarında önemli rol üstlenir. Aslında oksijen aerobik hücrelerde oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji

üretimde gerekli bir maddedir. Oksijenin % 99'u oksidatif fosforilasyon sırasında suya dönüşmekte ve ATP sentezine sebep olmakla birlikte yaklaşık % 1'i toksik maddelere dönüşebilmektedir. Oksijenin tek elektron transferi ile redüksiyonu serbest radikal anyonu oluşturur. Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin elektron alarak indirgenmesi sonucu superoksit radikal anyonu meydana gelir. İki superoksit molekülü reaksiyona girerek hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana gelir. Hidrojen peroksit serbest radikal biyokimyasında önemli bir bileşiktir. Hidrojen peroksit hücre membranlarından kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Demir ve bakır gibi geçiş metal iyonlarının katalizörlüğü hidroksil radikal üretimini kolaylaştırır (33,67).

Lipit peroksidasyonu serbest radikaller tarafından başlatılan ve hücre membranında bulunan poliansature yağ asitlerin oksidasyonuna yol açan kimyasal bir olaydır. Poliansature yağ asitleri içerdikleri çift bağlar nedeniyle oksidasyona oldukça duyarlıdır. Bu nedenle hücre memnaları lipid peroksidasyonundan en çok zarar gören bölgelerdir. Hücre zarındaki poliansature yağ asierinin alfa metil gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile lipid peroksidasyonu başlar. Zincir yapısından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile yağ asidi bir lipid radikali haline gelir. Burada etken serbest radikalın süperoksit veya hidroksil radikallerinin olduğu düşünülmektedir (1).

Meydana gelen lipid peroksitleri yıkılarak aktif yapılar olan aldehid ve karbonil bileşiklerine dönüşürler. 3 veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu ile malondialdehid meydana gelir. Hedef dokularda meydana gelen değişikliklerin sebebinin MDA olduğu düşünülmektedir (33,67). Peroksidasyonla oluşan MDA, membran yapılarını etkileyerek çapraz bağlanma ve polimerizasyona sebep olabilmektedir. İyon transport bozuklukları, enzimlerde fonksiyon bozukluklarının sebebi de MDA'dır. Bu nedenle bu molekülün; ateroskleroz, hipertansiyon, diabetes mellitus, yaşlanma.. gibi çeşitli olayları yaptığı ve karsinojenik, genotoksik ve mutajenik özellikler taşıdığı düşünülmektedir. İyonize radyasyonun serbest radikal üretimine neden olduğu bildirilmiştir.

Biz bu nedenle kısa süreli deneysel hiperlipidemide ox-LDL ile birlikte lipid peroksidasyonu durumunu görmek istedik ve lipid peroksidasyonun da arttığını saptadık.

Aterosklerozda reaktif oksijen türlerinin hücresel kaynakları, endotel hücreleri, intimadaki düz kas hücreleri ve monosit kökenli makrofajlardır. Serum lipoproteinleri özellikle LDL kolesterol konsantrasyonu artışı ateroskleroz için önemli bir risk faktörüdür. LDL'nin klinik ve epidemiyolojik çalışmalarda aterosklerozdan sorumlu olduğu birçok çalışmada bildirilmiştir (6,11,97). Superoksid anyonunun fagosit ve düz kas hücreleri yoluyla LDL oksidasyonunu uyaran bir ajandır. Tioller metal iyonları varlığında LDL oksidasyonunu uyaran superoksit radikali oluştururlar. İn vitro şartlarda LDL'nin demir ve bakır gibi geçiş metallerinin varlığında oksidatif modifikasyona uğradığı bildirilmiştir. LDL'nin oksidasyonunda LDL yoğunluğu önem taşır. Küçük yoğun LDL koroner arter hastalığı gelişiminde daha etkindir. Çeşitli çalışmalar küçük yoğun LDL'nin oksidasyona daha yatkın olduğunu göstermiştir. LDL oksidasyonu çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) peroksidasyonu ile sonuçlanan bir olaydır. Bunun sebebi de serbest radikallerdir. Oksidasyon başlangıçta LDL içindeki antioksidanların varlığı ile baskılanır. Baskılamanın mümkün olmadığı ve oksidasyonun ilerlemesi durumunda LDL oksidasyonu hızlanır. Sonuçta MDA ve diğer çeşitli aldehit ürünleri LDL içindeki apo B'ye zarar verir. Bunun sonunda dokulardaki LDL reseptörleri tarafından LDL dokulara geçemez fakat çöpcü reseptörler tarafından makrofajlara girişi artar. Burada LDL'nin MDA içeriği çok artmıştır.

Ox-LDL diğer taraftan da büyüme faktörlerini ve hücre sinyallerini uyarır ve ateroskleroz patogenezinde rol oynar. Ox-LDL monosit kemotaktik proteinleri ve çeşitli faktörleri etkileyerek nitrik oksid inaktivasyonunu sağlayarak vazodilatasyonu inhibe eder. Oksidlenmiş LDL prostaglandin üretimini de artırır. Damarda azalmış fibrinolizden ox-LDL'nin sorumlu olduğu bildirilmiştir. İmmunolojik yapıda olduğu kabul edilen MDA tarafından modifiye edilmiş LDL, immün kompleks oluşumunu uyarır bu agregatlar kolesterol birikimini artırırlar. Aterosklerozdaki lezyonlarda okside LDL'ye karşı antikörlerin varlığı hastalığın ilerlemesi ile pozitif korelasyonlu olduğu gösterilmiştir (5,15,30,35,69,83,86,94).

Ancak bizim planladığımız çalışma beklediğimiz sonucu vermemiş, deneysel hiperlipidemi oluşumu sırasında ilave ettiğimiz Apo B ve LDL gibi konjugatlar kısa sürede lipid peroksidasyonu yani MDA oluşumunu önleyememiştir.

Biz bu çalışmada karaciğer homojenatında ox-LDL değerleri ile birlikte antioksidan etkinin de nasıl değişeceğini görmek istediğimiz için, karaciğer homojenatında GSH değerlerini inceledik ve kısa süreli hiperlipidemide GSH değerlerinin de lipid peroksidasyon değerleri gibi arttığını gördük.

Antioksidan mekanizmalar serbest radikallerin en önemli dengeleyicileridir. Antioksidan moleküller serbest radikaller ile etkileşime girerek zincir reaksiyonunu sonra erdirirler, kendi elektronlarını vermek suretiyle serbest radikalleri nötralize ederler ve hayati molekülleri hasardan korurlar. Bu noktadan bakıldığında bizim değerlerimizde GSH değerlerinde görülen artma kısa süreli hiperlipidemide meydana gelen oksidasyonda dengeleyici olabilir diye düşünmekteyiz.

Biz bu çalışmada birçok fizyolojik olayda etkin olan siyalik asidin deneysel olarak yapmış olduğumuz kısa süreli hiperlipidemide nasıl bir değişim göstereceğini inceledik ve hiperlipidemik grupta siyalik asid değerlerinin kontrol grubuna göre artmış olduğunu gördük. Apo –B konjugatı ilavesi ile hiperlipidemik grupta siyalik asid düzeyleri azalırken LDL konjugatı ilave edildiğinde hiperlipidemik grubun siyalik asid düzeyinin arttığı görülmüştür. Kimi araştırmacılara göre sialik asid endotel hücreleri için koruyucu bir role sahiptir (95). Hücrelerin birbiri ile interaksyonu ve hücre proliferasyonunda sialik asidin önemli fonksiyonu olduğu bilinir (63). Bizim değerlerimizde görülen siyalik asid artışının nedeni oksidasyona bağlı gelişen hücre hasarını korumak amaçlı olabilir.

Sonuç:

Kısa süreli deneysel hiperlipidemi yapılmış farelerin serum ox-LDL değerleri kontrole göre artış göstermiştir. Apo-B ve LDL konjugatının bu bulguya etkisi hiperlipidemik gruptaki ox-LDL’yi artırma yönünde olmuştur.

Ox-LDL karaciğer homojenatında da ölçülmüş ve hiperlipidemik grupta karaciğerdeki LDL’nin oksidasyonu da artmıştır. Serumdakinin aksine karaciğerdeki oksidasyonu Apo-B konjugatının etkisi azaltıcı yönde olmuştur. LDL de benzer etkiyi göstermiş fakat bu etki Apo-B kadar olmamıştır.

Karaciğer homojenatındaki protein değerleri hiperlipidemi yönünden az anlamlı olan bir azalma göstermiştir. Apo B konjugatı ve LDL bu azalmayı daha da arttırmıştır Karaciğer homojenatında GSH ve LPO değerleri hiperlipidemik grupta

anlamalı bir artış göstermiştir. Apo-B ve LDL konjugatları bu değerleri sırasıyla arttırma ve azaltma yönünde değişim göstermiştir.

Karaciğer homojenatındaki siyalik asid değerleri hiperlipidemik grupta artmış, Apo B ve LDL konjugatlarının bu artışa etkili olmamıştır.

Özetle; kısa süreli deneysel hiperlipidemide kanda LDL oksidasyonu ve karaciğerde lipid peroksidasyonu ve sialik asid artmıştır. Apo-B ve LDL konjugatlarının bu artışa kanda etkili olmamıştır. Karaciğerdeki etkisi dikkat çekicidir.

8. KAYNAKLAR

1. Alturfan E.I. Tükürüğün oksidatif stres elemanları. In.Tükürük Eds.Emekli N., Yarat A. Nobel Tıp Kitapevleri, s. 309-20, 2008.
2. Alturfan Ebru Emekli, Başar Işık, Alturfan A.Ata, Ayan Faruk, Koldaş Lale, Balci Huriye, Emekli Nesrin. The relation between plasma tissue factor and oxidized LDL levels in acute coronary syndromes. Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis. 36:290-97, 2007.
3. Alturfan Ebru Işık: Hiperlipidemik ve diyabetik hayvan modellerinde “arachis hypogae” ve doymamış yağ asidi içeriğinin trombojenik aktivite ve lipid profili üzerine etkisinin incelenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Danışman: Prof. Dr. Ayşen Yarat, İstanbul, 2006.
4. Alber HF, Suessenbacher A, Weidinger F: The role of inflammation in the pathophysiology of acute coronary syndromes. Wien Klin Wochenschr 117(13-14): 445-55, 2005.
5. Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Regnstrom J et al. Effect of immunization with homologous LDL and oxidized LDL on early atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16(8):1074-09, 1996.
6. Barber DA, Haris SRX. Oxygen free radicals and antioxidants: a review. Am Pharm NS 34:26-32, 1994.
7. Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM: Antiinflammatory Properties of HDL. Circ. Res. 95(8): 764-72, 2004.
8. Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. Biochem Cell Biol 1990 68:989-93, 1990.
9. Berr F. Characterization of chylomicron remnant clearance by retinyl palmitate label in normal humans. Journal of Lipid Research 33: 915-30, 1992

10. Brinton EA, Eisenberg S, Breslow JL. A low-fat diet decreases high density lipoprotein (HDL) cholesterol levels by decreasing HDL apolipoprotein transport rates *Journal of Clinical Investigation* 85: 144-51, 1990.
11. Brown M.S, Goldstein JL. How LDL receptors influence cholesterol and atherosclerosis. *Scienttific American* 251: 58-66, 1984.
12. Brown M, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage. *Ann Rev Biochem* 52:223-28, 1983.
13. Chait A, Heinecke JW. Lipoproteins, modified lipoproteins and atherosclerotic vascular disease. In: *Lipoproteins in Health and Disease* Eds: Betteridge DJ, Illingworth DR, Shepherd J. s. 597-10, Arnold 1999.
14. Crook MA. Sialic acid and cardiovascular disease. *Med Biochem* 1: 123-30, 1999.
15. Davies MJ. Pathology of Coronary Atherosclerosis. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, editors. *Hurst's The Heart*. 10th ed. USA. International Edition McGraw-Hill Medical Publishing Division; s. 1095-05,2001.
16. Dawber TR, Meadors GF, Moore FEJ. Epidemiological approaches to heart disease the Framiningham Study. *Am J Public Health* 41:279,1951. In: *Williams Hematology* 6. Baskı s. 1743-52. Mac Graw Hill, 2001.
17. Dinçer S, Doğan F, Koç L, Yarat A. Deneysel hiperlipidemi ve sirkenin etkisi. Sorumlu öğretim üyesi. Prof. Dr. Ayşen Yarat, Arş.gör. Leyla Koç. Öğrenciler M.Ü. Dişhekimliği Fakültesi 1. sınıf. İ.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Öğrenci Araştırma Kulübü. VI. Bilimsel Toplantısı Özet Kitabı s. 26-27, 1998.
18. Diplock AT. The role of antioxidants in clnical practice. *Br J Clin Pract* 44:257-63, 1990
19. Durnington PN, Mackness B, Mackness MI. Role of HDL in preventing atherogenic modification of LDL. *Atherosclerosis* 146:13-18, 1999.

20. Edwards IJ, Wagner WD, Owens RT. Macrophage secretory products selectively stimulate dermatan sulfate proteoglycan production in cultured arterial smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 136:609-21; 1990.
21. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Matsuo T, Ogami M, Ikura Y, Itabe H, Komatsu R, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J. Pathophysiological role of oxidized low-density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases. *J Diabetes and its Complications* 16:60-64, 2002.
22. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otuska M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 103: 1955-60, 2001.
23. Emekli N: Ateroskleroz Biyokimyası. In: Temel ve Uygulamalı Biyokimya. 4. Baskı, s. 547-62. Marmara Kitapevi, 2006.
24. Emekli N. Biochemistry of Haemostatic System In: Basic and Applied Biochemistry, s. 341-417 Nobel Kitapevi, 2004.
25. Fang JC, Kinlay S, Bhargava V, Hikita H, Witztum JL, Selwyn AP, Ganz P. Circulating autoantibodies to oxidized LDL correlate with impaired coronary endothelial function after cardiac transplantation. *Arterioscle Thromb Vasc Biol* 26:2044-48, 2006.
26. Fraley AE, Tsimikas S. Clinical applications of circulating oxidized low density lipoprotein biomarkers in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol.* 17: 181-207, 2006.
27. Freigang S, Horkko S, Miller E, Witzthum JL, Palinski W. Immunization of LDL Receptor-deficient mice with homologous malondialdehyde-modified and native LDL reduces progression of atherosclerosis by mechanisms other than induction of high titers of antibodies to oxidative neoepitopes. *Arterioscler. Thromb Vasc. Biol* 18(12):1972-82, 1998.

28. Gaw A, Hobbs HH. Lipoprotein (a) In: In: Lipoproteins in Health and Disease Eds: Betteridge DJ, Illingworth DR, Shepherd J. s. 88-90, Arnold 1999.
29. George J, Shoenfeld Y, Afek A, Gilburd B, Keren P, Shanish A, Kopolovic J, Wick G, Harats D. Enhanced fatty streak formation in C57BL/6J Mice by immunization with heat shock protein-65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:505-510,1999.
30. Graves DR and Gordon S. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res.* 46:11-20, 2005.
31. Grundy SM : Cholesterol and atherosclerosis. Diagnosis and treatment. J.B. Lippincott Company, s. 12, 1990.
32. Haberland ME, Fong D, Cheng L. Malondialdehyde altered protein occurs in atheroma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Science* 241:215-241, 1988.
33. Hahn M, Subbiah MT. Significant association of lipid peroxidation products with high density lipoproteins. *Biochem Mol Biol. Int* 33:699-704, 1994.
34. Hajjar KA, Esmon NM, Marcus AJ, Muller WA: Vascular function in hemostasis. Ed: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U : Williams Hematology. 6 baskı, s. 1451-69, McGraw-Hill, America, 2001.
35. Hansson GK : Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Eng J Med* 352: 1685-95, 2005.
36. Hansson G, Nilsson J. Pathogenesis of atherosclerosis. In: Crawford MH, DiMarco JP, Paulus WJ, editors. *Cardiology* 1st ed. USA. Elsevier Science Limited; s. 1-12, 2001.
37. Harvey RA, Champe PC. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden. *Biyokimya*. S. 229-231, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2007.
38. Hein TW, Liao JC, Kuo L. ox-LDL specifically impairs endothelium-dependent, NO mediated dilation of coronary arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 278:H175-H183, 2000.

39. Herrick JB. Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries
JAMA 59:2015, 1912 In: Williams Hematology 6. Baskı s. 1743-52. Mac
Graw Hill, 2001.
40. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Van de Werf F, Collen D. Oxidized
LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary
syndromes and stable coronary artery disease. Circulation. 98:1487-94, 1998.
41. Horvath EM, Blazovics A, Kemeny T, Vasarhelyi B, Weinbrenner Z, Feter J.
Antioxidant effect of vitamin E in experimental hyperlipidemia. Orv Hetil
134(32):1757-63, 1993.
42. Hulthe J, Wiklund O, Camejo HE, Bondjers G. Antibodies to oxidized LDL
in relation to carotid atherosclerosis, cell adhesion molecules and
phospholipase A2. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 21:269-274, 2001.
43. Itabe H, Ueda M: Measurement of plasma oxidized low density lipoprotein
and its clinical implications. J Atheroscler Thromb. 14: 1-11, 2007
44. Itabe H, Yamamoto H, Imanaka T, Suzuki M, Kawai Y, Nakagawa Y, Suzuki
A, Takano T. A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes
foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation of oxidized
phosphatidyl choline and polypeptides. J Biol Chem 269:15274-79, 1994.
45. Iverius PH. The interaction between human plasma lipoproteins and
connective tissue glycosaminoglycans. J Biol Chem. 247:2607-13; 1972.
46. Johnston N, Jernberg T, Lagerqvist B, Siegbahn A, Wallentin L. Oxidized low
density lipoprotein as a predictor of outcome in patients with unstable
coronary artery disease. Int.J g Cardiology, 113:167-173, 2006.
47. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO : Dolaşım sistemi, Çeviri Ed. Aytekin Y,
Solakoğlu S, Ahışalı B. Temel Histoloji s. 203-213, Barış Kitapevi, 1998.
48. Kaplan LA, Pesce AJ, Kazmierczak SC. Methods in Clinical Chemistry .
Hyperlipidemias. The CV Mosby Company , 2003.
49. Kardiyoloji Miniatlas. 1. Baskı. AND Danışmanlık, Eğitim, yayıncılık ve
Organizasyon Ltd. şti.. s. 155-162, 2003.

50. Kato, R, Mori C, Kitazato K, Arata S, Obama T, Mori M, Takahashi K, Aiuchi T, Takano T, Itabe H. Transient increase in plasma oxidized LDL during the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29:33-39, 2009.
51. Kaur J, Woodman RC, Ostrovsky L, Kubes P. Selective recruitment of neutrophils and lymphocytes by thrombin: a role for NF- κ B. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H784-H795, 2001.
52. Kendler BS. Free radicals in health and disease: implication for primary health care providers. *Nurse Pract* 20:29- 34, 1995.
53. Kiersenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi s. 296, Çeviri Demir, R. Palme Yayıncılık, 2006.
54. Kılıçturgay K. Sitokinler ve Adezyon Molekülleri. *Immunoloji*. 3. Baskı s. 221-225, Nobel & Güney Yayınevi, 2003.
55. Koffler S, Nickel T, Weis M. Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation. *Clinical Science* 108:205–213; 2005.
56. Landmesser U, Hornig B, Drexler H : Endothelial Function: A Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation* 109(21_suppl_1): II-27-II-33, 2004.
57. Lee KW, Lip GYH, Tayebjee M, Foster W, Blann AD : Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. *Blood* 105(2): 526-32, 2005.
58. Leeuw K, Kallenberg C, Bijl M : Accelerated Atherosclerosis in Patients with Systemic Autoimmune Diseases. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 1051(1): 362-371, 2005.
59. Lerman A, Zeiher AM: Endothelial Function: Cardiac Events. *Circulation* 111(3): 363-68, 2005.
60. Libby P, Theroux P: Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation* 111(25): 3481-88, 2005.

61. Lindberg G. Resialylation of sialic acid deficit vascular endothelium, circulating cells and macromolecules may counteract the development of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 192: 243- 245, 2007.
62. Martins IJ, Mortimer BC, Miller JC, Redgrave TG. Effects of the particle size and number on the plasma clearance of chylomicrons and remnants. *Journal of Lipid Research* 37, 2696-705, 1996.
63. Matthew W K, GERALD F. W, MARK L. D. Is sialic acid an independent risk factor for cardiovascular disease? A 17 year follow-up study in Busselton- Australia. *Ann Epidemiol*; 14: 627-632, 2004.
64. Maziere C, Auclair M, Djavaheri MM, Packer L, Maziere JC: Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcription factor NF kappa B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 39: 1201-1207, 1996.
65. Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, Boullier A, Boullier A, Butler S, Witztum JL : Toll- Like Receptor 4-Dependent and –Independent Cytokine Secretion Induced by Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein in Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25(6): 1213-19, 2005.
66. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanism and therapeutic strategies related to Nitric oxide. *FASEB, J*:1319-22, 1995.
67. Naito C, Kawamura M, Yamamoto Y. Lipid peroxides as the initiating factor of atherosclerosis. *Ann NY Acad Sci* 676:27-45, 1993.
68. Naruko T, Ueda M, Ehara S, Itoh A, Haze K, Shirai N, Ikura Y, Ohsawa M, Itabe H, Kobayashi Y, Yamagishi H, Yoshiyama M, Yoshikawa J, Becker AE. Persistent high levels of plasma oxidized low density lipoprotein after acute myocardial infarction predict stent restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:877-883, 2006.
69. Nicholson AC, Hajjar DP: CD36, oxidized LDL and PPAR γ : pathological interactions in macrophages and atherosclerosis. *Vascular Pharmacology* 41: 139-146, 2005.

70. Nishi K, Itabe H, Uno M, Kitazato KT, Horguchi H, Shinno K and Nagahiro S. Oxidized LDL in carotid plaques and plasma associates with plaque instability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22:1649-54, 2002.
71. Nordin Fredrikson G, Hedblad B, Berglund G, Nilsson J. Plasma oxidized LDL: a predictor for acute myocardial infarction? *J Intern Med* 253:425-29, 2003.
72. Ohmura H, Watanabe Y, Hatsumi C, Sato H. Possible role of HDL to lipid peroxidative modification and oxidized HDL in genesis of coronary artery spasm. *Atherosclerosis* 142:179-184, 1999.
73. Oram JF. Apolipoprotein mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. In: *Lipoproteins in Health and Disease* Eds: Betteridge DJ, Illingworth DR, Shepherd J.s. 323-333, Arnold 1999.
74. Palinski W, Miller E, Witztum JL. Immunization of low density lipoprotein (LDL) receptor deficient rabbits with homologous malondialdehyde- modified LDL reduces atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92(3):21-25,1995.
75. Penny WF, Ben-Yehuda O, Kuroe K, Long J, Bond A, Bhargava V, Peterson JF, Mc Daniel M, Julicano J, Witztum JL, Ross Jr.J, and Peterson KL. Improvement of coronary artery endothelial dysfunction with lipid lowering therapy:Heterogeneity of segmental response and correlation with plasma oxidized low density lipoprotein. *J Am Coll Cardiol* 37:766-774, 2001.
76. Reganon E, Vila V, Martinez-Sales V, Vaya A, Mira Y, Ferrando F, Aznar J. Sialic acid is an inflammation marker associated with a history of deep vein thrombosis.*Thrombosis Research*; 119: 73-78, 2007.
77. Robbesyn F, Salvayre R, Negre-Salvayre A : Dual role of oxidized LDL on the NF- κ B signaling pathway. *Free Radic Res*. 38(6): 541-51, 2004.
78. Roselaar SE, Schonfeld G, Daugherty A. Enhanced development of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits by suppression of cell-mediated immunity. *J Clin Invest*. 96:1389-94,1995.
79. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 1990s. *Nature*, 362:801-809, 1993.

80. Salomone OA, Crook JR, Hossein NM, Holt D, Kaski JC.. Serum sialic acid concentration is not associated with the extent of severity of coronary artery disease in patients with stable angina pectoris. *Am Heart J*; 136: 620-623, 1998.
81. Scott J. The molecular and cell biology of apolipoprotein-B. *Molecular and Biological Medicine* 6: 65-80, 1989.
82. Segev A, Strauss BH, Witztum JL, Lau HK and Tsimakas S. Relationship of a comprehensive panel of plasma oxidized low density lipoprotein markers to angiographic restenosis in patients undergoing percutaneous coronary intervention for stable angina *Am Heart J* 150:1007-14, 2005.
83. Shi Q, Vandeberg JF, Jett C, Rice K, Leland M, Talley L, Kushwaha R,S, Rainwater L, Vandeberg JL, Wang L : Arterial endothelial dysfunction in baboons fed a high-cholesterol, high-fat diet. *Am. J. Clinical Nutrition* , 82(4): 751-59, 2005.
84. Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M, Shimamura K, Kimura J, Kanda H, Emoto M, Kawagishi T, Morii H. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and anti-oxLDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis* 148:171-177, 2000.
85. Simoons L, Zeiher AM, and for the Capture Study Investigators. Serum Level Of The Antiinflammatory Cytokine Interleukin-10 is an Important Prognostic Determinant in Patients With Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 107(16): 2109-14, 2003.
86. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M: Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92:8264-68,1995.
87. Stary HC: The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur. Heart J* 11 (suppl E) :3-19; 1990.

88. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol. Chem* 272(34):20963-66, 1997.
89. Steinberg D, Parthasarthy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320,-:915-924, 1989.
90. Steinbrecher UP. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1436:279-98, 1999.
91. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witzthum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92(9):3893-97,1995.
92. Stryer L. Biosynthesis of membrane lipids and steroid hormones. *Biochemistry*, s. 547-70, WH Freeman and Company New York 1988.
93. Şengül T: Koroner arter hastalıklarında bazı hemostatik parametrelerin C-Reaktif proteinve lipid gestergeleri ile karşılaştırılması.M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Danışman :Prof.Dr Nesrin Emekli İstanbul 2006.
94. Taubman MB : Atherosclerosis, thrombosis and coroner artery disease. Ed: Beutler E, Lichtman MA, Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U: Williams Hematology, s. 1743-52, 6. Baskı. Mc Graw-Hill, 2001.
95. Tertov VV, Sobenin IA, Orekhov AN. Characterization of desialylated low-density lipoproteins which cause intracellular lipid accumulation. *Int J Tissue React*; 14: 155-162, 1992.
96. Tsimkas S, Bergmark C, Beyer RW, Pater R, Pattison J, Miller E, Juliano J, Witztum JL. Temporal increases in plasma markers of oxidized low density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 41: 360-730, 2003.
97. Tsutsui T, Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Mabuchi N, Hayashi M, Ohnishi M, Kinoshita M. Plasma oxidized low density lipoprotein as a prognostic predictor in patients with chronic congestive heart failure. *Am Coll Cardiol* 39:957-962, 2002.

98. Ulukaya E. Kolesterol ve steroid metabolizması. Biyokimya. S. 205-208
Editörler: Tokullugul A, Dirican M, Ulukaya E. Nobel Kitapevi, 1997.
99. Ulutin ON : The Relationship Of Haemostatic System To The Vessel Wall, Thromboembolism, Atherosclerosis From Pathogenesis And Laboratory Standpoints. Turk J Haematol 19(1): 7-29, 2002.
100. Wang H, Chen C, Fisher EA. N-3 fatty acids stimulate intracellular degradation of apoprotein B in rat hepatocytes. Journal of Clinical Investigation 91, 1380-9, 1993.
101. Wang JM, Sica A, Peri G et al. Expression of monocyte chemotactic protein and interleukin -8 by cytokine activated human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb 11:1166-74, 1991.
102. Warren L. The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J Biol Chem; 234: 1971-75, 1959.
103. Wojcicki J, Samaochowiec L. Experimental model of hyperlipidemia in rats. Pol J Pharmacol Pharm. Nov-Dev 35(6):437-443, 1983.
104. Xu Q, Willeit J, Marosi M, Kleindienst R, Oberhollenzer F, Kiechi S, Stulng T, Luef G, Wick G. Association of serum antibodies to heat shock protein 65 with carotid atherosclerosis. Lancet. 341:225-229, 1993.
105. Yamagami H, Kitagawa K, Hoshi T, Furukado S, Hougaku H, Nagai Y, Hori M : Associations of Serum IL-18 Levels With Carotid Intima-Media Thickness. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 25(7): 1458-62, 2005.
106. Yamaguchi Y, Kunitomo M, Haginaka J. Assay methods of modified lipoproteins in plasma. Journal of Chromatography B, 781:313-330, 2002.
107. Yang SY, Bao JH, Zhang JP. Experimental studies of hyperlipidemia in rats and mice given a hyperlipidemic diet. Chang Kuo Chung Yao TSa Chih.14(1): 48-51, 1989
108. Yli-Hertuala S, Pallinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. Arterioscler Thromb 14:32-40, 1999.

9. ETİK KURUL ONAYI



MARMARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI ARAŞTIRMA ETİK KURULU PROJE ONAY FORMU

PROJENİN ADI : Hiperlipidemi yapılmış sıçanlarda oksidlenmiş düşük dansiteli lipoprotein metabolizmasının incelenmesi

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ Prof.Dr. Nesrin Emekli

PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR : Ali Şahin, Dr. Arş.Gör.Ebru Alturfan , Arş.Gör. Şehkar Uslu, Uz.Dr. Koray Ak

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

ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI : 12.06.2008- 35.2008.mar

Sayın : Prof.Dr. Nesrin Emekli

Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu'na "Hiperlipidemi yapılmış sıçanlarda oksidlenmiş düşük dansiteli lipoprotein metabolizmasının incelenmesi "*Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu*" tarafından incelenerek onaylanmıştır.

Çalışmalarınızda başarılar dileriz.

Doç.Dr. Zafer GÖREN
Deney Hayvanları Araştırma Etik Kurulu
Yürütücü Sekreteri

Prof. Dr. Berrak YEĞEN

Prof.Dr. Göksel ŞENER

Prof.Dr. Ayşen YARAT

Doç.Dr. Halil TUĞTEPE

Öğr. Gör. Dr. Gürkan SERT

Vet. Hek. Dilek ÖZBEYLİ

Av. Serkan DURAN

Av. Onur GİR

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

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ali	Soyadı	ŞAHİN
Doğum Yeri	Beykoz	Doğum Tarihi	29.10.1982
Uyruğu	T.C.	Tel	0216 322 62 71
E-mail	asahin28@hotmail.com	Cep. Tel.	0535 499 9745

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Yüksek Lisans (Tezsiz)	Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Ens. Biyoloji Öğ.	2007
Lisans	Çanakkale 18 Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. Biyoloji	2006

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS Puanı	ÜDS Puanı	TOEFL Puanı	IELTS Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	50	50		

* Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır *Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL: Test of English as a Foreign Language

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Windows, Office Prog.	Çok iyi

