

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PLANTAGO MAJOR’UN HİPERKOLESTEROLEMİK DİYETLE
ATEROSKLEROZ OLUŞTURULAN TAVŞANLARDA
ATEROSKLEROZ VE ATEROSKLEROTİK RİSK FAKTÖRLERİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Özkan ÖZER

**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 13L3330002 proje numarası ile desteklenmiştir.**

ANKARA

2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Özkan ÖZER	Tarih:
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	11/ 07 / 2014
Tez Danışmanı	: Prof. H. Serdar ÖZTÜRK	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Plantago Major'un Hiperkolesterolemik Diyetle Ateroskleroz Oluşturulan Tavşanlarda Ateroskleroz ve Aterosklerotik Risk Faktörleri Üzerine Etkileri	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak ☒ Kabulüne ☐ Reddine ☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mustafa KAVUTÇU
Gazi Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



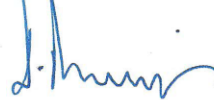
Jüri

Prof. Dr. H. Serdar ÖZTÜRK
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Jüri

Prof. Dr. Erdi DEVRİM
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimi aldığım süre boyunca, tez çalışmalarım ve akademik çalışmalarım sırasında, ayrıca eğitimimde karşılaştığım her türlü zorluk karşısında, rehberliğini, derin bilgi ve tecrübelerini benden hiçbir zaman esirgemeyen Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve değerli tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. H. Serdar Öztürk başta olmak üzere, eğitimim boyunca her zaman rehberliklerine başvurduğum değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. İlker Durak'a, Sayın Prof. Dr. Kadirhan Sunguroğlu'na, Sayın Prof. Dr. Serenay Elgün Ülkar'a, Sayın Prof. Dr. Aslıhan Avcı'ya, Sayın Prof. Dr. B. İmge Ergüder'e ve Sayın Prof. Dr. Erdinç Devrim'e;

Yetişmemde ve bugünlere gelmemde en büyük pay sahipleri olan sevgili anneme, babama ve ağabeyime;

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Ebru Gürleyik'e, Dr. Neriman Sevinç'e, Dr. Şebnem Korkmaz'a, Dr. Oğuz Han Edebal'a, Dr. Süleyman Büber'e, Dr. Seda Bahsi'ye, Dr. Pınar Koyuncu'ya, Dr. Metin Genç'e, Dr. Bedia Akosman'a ve Dr. Ömer Yavuz'a;

Anabilim Dalımızın değerli çalışanları Ömer Savran, Sema Öztürk, Nurdan Torunoğlu, Nurhan Gödelekoğlu, Kadime Kızılırmak ve Hidayet Arslan'a;

Sayın Uz. Dr. Esra Elmalı'ya, Sayın Uz. Dr. Zihni Karaeren'e ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nın değerli çalışanlarına;

Tez çalışmamın ortaya çıkmasında bilgi, emek ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz Billur'a ve Sayın Şule Kızıl'a, başta Sayın Prof. Dr. Nurten Türközkan olmak üzere Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nin (GÜDAM) değerli yönetici ve çalışanlarına, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü'nden Sayın Prof. Dr. Y. Sedat Velioğlu'na ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin değerli yönetici ve çalışanlarına;

Teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Özkan ÖZER
Ankara, 2014

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY.....	i
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Ateroskleroz.....	4
2.1.1. Tanım.....	4
2.1.2. Epidemiyoloji.....	4
2.1.3. Histoloji.....	5
2.1.3.1. Normal Arter Duvarı Histolojisi.....	5
2.1.3.2. Endotel ve Özellikleri.....	5
2.1.4. Patogenez.....	7
2.1.4.1. Endotel Disfonksiyonu.....	8
2.1.4.2. Vasküler Düz Kas Hücre Göçü ve Proliferasyonu.....	12
2.1.4.3. Aterosklerozun Morfolojik Gelişimi.....	13
2.1.5. Ateroskleroz Risk Faktörleri.....	15
2.1.5.1. Lipid Risk Faktörleri.....	15
2.1.5.2. Lipid Olmayan Risk Faktörleri.....	18
2.1.5.3. Yeni Kullanıma Giren Lipid Risk Faktörleri.....	19
2.1.5.4. Yeni Kullanıma Giren Lipid Olmayan Risk Faktörleri.....	20
2.2. Serbest Radikaller, ROT ve Oksidatif Stres.....	22
2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	23
2.2.1.1. Singlet Oksijen (O-O:) (1O_2).....	24
2.2.1.2. Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet}$).....	24
2.2.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2).....	25
2.2.1.4. Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$).....	26
2.2.1.5. Nitrik Oksit ($NO^{\bullet}$).....	28
2.2.1.6. Peroksinitrit ($ONOO^-$).....	31

2.2.2. ROT Kaynakları.....	31
2.2.3. ROT'nin Etkileri.....	34
2.2.3.1. ROT'nin Lipidler Üzerine Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu.....	34
2.2.3.2. ROT'nin Proteinler Üzerine Etkileri.....	36
2.2.3.3. ROT'nin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri.....	37
2.2.3.4. ROT'nin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	38
2.3. Antioksidan Savunma Sistemi.....	39
2.3.1. Antioksidan Enzimler.....	40
2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD).....	40
2.3.1.2. Katalaz (KAT).....	41
2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPO) ve Glutasyon Redüktaz (GR).....	42
2.3.1.4. Glutasyon S-Transferazlar (GST).....	43
2.3.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar.....	43
2.3.2.1. Glutasyon (GSH).....	43
2.3.2.2. E Vitamini (α -Tokoferol).....	44
2.3.2.3. C Vitamini (Askorbik Asit).....	45
2.3.2.4. Karotenoidler.....	45
2.3.2.5. Fenolik Bileşikler (Polifenoller).....	46
2.3.2.6. Diğer Antioksidan Bileşikler.....	50
2.4. Asimetrik Dimetil Arginin (ADMA), ROT ve KVH.....	51
2.5. <i>Plantago Major</i> L. (Büyük Sinirli Ot).....	56
2.5.1. Botanik Özellikleri.....	56
2.5.2. Tarihçesi ve Geleneksel Tıptaki Yeri.....	57
2.5.3. Kimyasal İçeriği.....	58
2.5.3.1. Fenolik Bileşikler.....	58
2.5.3.2. Diğer Kimyasal Bileşikleri.....	59
2.5.4. <i>P. Major</i> Ekstrelerinin Biyolojik Etkileri.....	60
2.5.4.1. Antioksidan ve ROT Temizleyici Etkileri.....	60
2.5.4.2. Antiaterosklerotik Etkileri.....	61
2.5.4.3. Diğer Biyolojik Etkileri.....	62

2.6. Aterosklerotik Tavşan Modelleri.....	62
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	65
3.1. <i>P. Major</i> Yaprığı Ekstresinin Eldesi.....	65
3.2. Deney Hayvanları.....	66
3.2.1. Deney Hayvanlarının Özellikleri ve Bakım Koşulları.....	66
3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Hayvanlara Yapılan İşlemler.....	66
3.3. Gereçler.....	70
3.4. Protein Miktarı Ölçüm Yöntemi (Lowry Yöntemi).....	71
3.5. Serumda ve Aort Dokusunda Ölçümü Yapılan Çeşitli Parametrelere Ait Yöntemler.....	73
3.5.1. Malondialdehid (MDA) Miktarı Ölçüm Yöntemi.....	73
3.5.2. Ksantin Oksidaz (KO) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi.....	75
3.5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi.....	77
3.5.4. Katalaz (KAT) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi.....	79
3.5.5. Glutasyon Peroksidaz (GPO) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi.....	80
3.5.6. Nitrik Oksit (NO [•]) Miktarı Ölçüm Yöntemi.....	81
3.5.7. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi.....	82
3.5.8. ADMA Miktarı Ölçüm Yöntemi.....	84
3.6. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi.....	85
3.7. Aort Dokusunun Histopatolojik Değerlendirmesi.....	89
3.8. İstatistiksel Değerlendirme.....	93
4. BULGULAR.....	94
5. TARTIŞMA.....	118
6. SONUÇLAR.....	127
ÖZET.....	129
SUMMARY.....	131
KAYNAKLAR.....	133
EKLER.....	156
EK 1: Etik Kurul Kararı.....	156

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

C°: Santigrad Derece

µL: Mikrolitre

µm: Mikrometre

µmol: Mikromol

µM: Mikromolar

¹O₂: Singlet oksijen

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ACE: Anjiyotensin-dönüştürücü enzim

ADMA: Asimetrik dimetil arginin

AHA: Amerikan Kalp Birliği

ALT: Alanin transaminaz

Apo (a): Apolipoprotein (a)

Apo B-100: Apolipoprotein B-100

AST: Aspartat transaminaz

BUN: Kan üre azotu

C: Derişim

CAT: Katyonik amino asit taşıyıcıları

cGMP: Siklik guanozin mono fosfat

cm: Santimetre

CRP: C-Reaktif Protein

CSF: Koloni-stimüle edici faktör

Cu: Bakır

CuCl₂: Bakır (II) klorür

CuZn-SOD: Bakır çinko süperoksit dismutaz

ÇDYA: Çoklu doymamış yağ asitleri

d: Yoğunluk

DDAH: Dimetilarginin dimetilaminohidrolaz

DM: Diyabetes mellitus

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

e⁻: Elektron

EDRF: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
EDTA: Etilendiamintetraasetik asit
eNOS: Endotelyal NOS
ESWL: Extracorporeal shock wave lithotripsy
ET-1: Endotelin-1
F: Faktör
FAD: Flavin adenin dinükleotid
Fe: Demir
FGF: Fibroblast büyüme faktörü
FMN: Flavin mononükleotid
g: gram
GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni-stimüle edici faktör
GPO: Glutasyon peroksidaz
GR: Glutasyon Redüktaz
GSH: Redükte glutasyon
GS–SG: Okside glutasyon (glutasyon disülfid)
GST: Glutasyon S-Transferaz
H: Hidrojen
H[•]: Hidrojen radikali
H₂O: Su
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HCl: Hidroklorik asit
HDL kolesterol: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
H-E: Hematoksilen-Eozin
HOCl: Hipoklorik asit
HPLC: High-performance liquid chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
HPR: 'Horseradish' Peroksidaz
HQ[•]: Semikinon radikali
HT: Hipertaniyon
ICAM: İntersellüler adezyon molekülü

IL: İnterlökin
IM: Işık mikroskobu
IU: İnternasyonal ünite
KAH: Koroner arter hastalığı
KAT: Katalaz
KBH: Kronik böbrek hastalığı
KD: Ksantin dehidrogenaz
kg: Kilogram
KH₂PO₄: Potasyum dihidrojen fosfat
KKH: Koroner kalp hastalığı
KO: Ksantin oksidaz
KoQ: Koenzim Q
KREA: Kreatinin
KVH: Kardiyovasküler hastalık
l: Işığın kat ettiği yol (santimetre olarak)
L: Litre
L[•]: Lipid radikali
L7G: Luteolin 7-glukozid
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein
L-NMMA: L-N^G-monometilarginin
LOO[•]: Lipit peroksil radikali
LOOH: Lipit hidroperoksit
Lp (a): Lipoprotein (a)
M: Molarite (mol/L); molar
M-A: Mallory Azan
MA: Molekül ağırlığı
MAO: Monoamin oksidaz
MAPK: Mitojenle aktive edilmiş protein kinase
MCP-1: Monosit kemoatraktan protein-1
M-CSF: Makrofaj koloni-stimüle edici faktör
MDA: Malondialdehid
mg: Miligram

ml: Mililitre
mm: Milimetre
mM: Milimolar
MMP: Matriks metalloproteinazlar
Mn-SOD: Mangan süperoksit dismutaz
N₂O: Nitröz oksit
Na₂CO₃: Sodyum karbonat
Na₂HPO₄: Disodyum hidrojen fosfat
NAD⁺: Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid
NADP⁺: Yükseltgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOH: Sodyum hidroksit
NBT: Nitro Blue Tetrazolium
NCEP ATP: The National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel
nm: Nanometre
nmol: Nanomol
NO⁻: Nitroksil anyonu
NO⁺: Nitrozonyum katyonu
NO[•]: Nitrik oksit
NO₂⁻: Nitrit
NO₂⁺: Nitronyum iyonu
NO₂[•]: Nitrojen dioksit
NO₃⁻: Nitrat
NOS: Nitrik oksit sentaz
O₂: Oksijen
O₂^{•-}: Süperoksit radikali
O₃: Ozon
OH⁻: Hidroksil iyonu
OH[•]: Hidroksil radikali
ONOO⁻: Peroksinitrit

ONOOH: Peroksinitrik asit
Ox LDL: Okside LDL
P. major: Plantago major L.
PCI: Perkütan koroner girişim
PDGF: Platelet-kökenli büyüme faktörü
PDGF-BB: Platelet-kökenli büyüme faktörü -BB
PDH: Periferik damar hastalıkları
pg: Pikogram
PME: *P. major* ekstresi
PMYE: *P. major* yaprağı ekstresi
PRMT: Protein metil-arginin transferaz
RCOO[•]: Organik peroksit radikali
RNA: Ribonükleik asit
RO[•]: Alkoksil radikali
ROO[•]: Peroksil radikali
ROT: Reaktif oksijen türleri
rpm: dakikada dönüş sayısı; revolutions per minute
SDMA: Simetrik dimetilarginin
SOD: Süperoksit dismutaz
SVH: Serebrovasküler hastalıklar
TBA: Tiyobarbitürik asit
TCA: Triklor asetik asit
TEM: Transmisyon Elektron Mikroskobu
TEP: Tetraetoksipropan
TG: Trigliserid
TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü- β
TK: Total kolesterol
TLR: "Toll-like" reseptörleri
TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α
TSH: Tiroid stimüle edici hormon
USG: Ultrasonografi
UV: Ultraviyole

v/v: Hacim/hacim

VCAM: Vasküler hücre adezyon molekülü

w/v: Ağırlık/hacim

YZA: Yeni Zelanda ırk albino

Δ OD: Delta optik dansite

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1:	KVH'lar ile ilişkili olduğu bilinen bazı ROT ve oluşum yolları	32
Şekil 2.2:	Lipid peroksidasyonu: Bir serbest radikal zincir reaksiyonu	35
Şekil 2.3:	ROT aracılı hücrel hasar	37
Şekil 2.4:	GSH redoks döngüsü	43
Şekil 2.5:	E vitamininin (α -tokoferol) lipid peroksil radikallerini (LOO [•]), daha stabil lipid peroksitlere (LOOH) dönüştürmesi	44
Şekil 2.6:	Bir fenolik bileşik olan "Quercetin"in (flavonoid ailesine aittir) moleküler yapısı	46
Şekil 2.7:	Fenolik bileşiklerin antioksidan etki mekanizmalarına örnekler	47
Şekil 2.8:	Fenolik bileşiklerin, serbest radikalleri temizleme mekanizmalarına örnekler	48
Şekil 2.9:	Fenolik bileşiklerin (polifenoller), iyi bilinen ana biyolojik etkilerinin sınıflandırılması	49
Şekil 2.10:	L-Arginin, L-N ^G -monometilarginin (L-NMMA), ADMA ve onun stereoizomeri olan SDMA'nın moleküler yapıları	51
Şekil 2.11:	ADMA ile ilgili biyokimyasal yollara genel bir bakış	52
Şekil 2.12:	ADMA'nın üretimi, etkisi, metabolizması ve taşınması ile ilgili hücrel mekanizmalar ve ROT ile etkileştiği yerler	53
Şekil 2.13:	ROT ve ADMA'nın, KVH'ların, vasküler hastalıkların ve KBH'nın oluşumundaki etkilerini ve birbirleriyle etkileşimlerini gösteren diyagram	55
Şekil 2.14:	<i>Plantago major</i> L. bitkisinin görünümü	56
Şekil 3.1:	Tavşanlara oral gavaj yoluyla SF uygulanması	67
Şekil 3.2:	Tavşanlara oral gavaj yoluyla kolesterol süspansiyonu uygulanması ...	67
Şekil 3.3:	Tavşanlara oral gavaj yoluyla kolesterol süspansiyonu ile aynı enjektörde <i>P. major</i> yaprağı ekstresi uygulanması	68
Şekil 3.4:	Tavşanların aortlarının çevre dokulardan uzaklaştırılarak açığa çıkarılması	69
Şekil 3.5:	Lowry protein standart grafiği	73
Şekil 3.6:	ADMA standart grafiği	85
Şekil 4.1:	Sudan IV boyaması yapılan aort kesitlerine ait fotoğraflar - 1.....	104

Şekil 4.2:	Sudan IV boyaması yapılan aort kesitlerine ait fotoğraflar - 2	105
Şekil 4.3:	1. gruba ait aort kesiti	106
Şekil 4.4:	1. gruba ait aort kesitinde tunika intimada endotel ve çok ince bir subendotel izlenmektedir	106
Şekil 4.5:	1. gruba ait yarı ince kesitte endotel hücreleri ve altında ince intima tabakası doğal görünümde izlenmektedir	107
Şekil 4.6:	2. gruba ait aort kesiti	107
Şekil 4.7:	2. gruba ait aort kesitinde tunika intima yüzeyinde hasar ve köpük hücreleri görülmektedir	108
Şekil 4.8:	2. gruba ait yarı ince kesitte intima tabakasının köpük hücreleriyle dolu olduğu görülmektedir	108
Şekil 4.9:	3. gruba ait aort kesiti	109
Şekil 4.10:	3. gruba ait aort kesitinde tunika intimada köpük hücreleri görülmekte, vasküler düz kas hücrelerinin arasında ekstrasellüler matriks artışı izlenmektedir.....	110
Şekil 4.11:	4. gruba ait aort kesiti	111
Şekil 4.12:	4. gruba ait aort kesitinde tunika intimada kalınlaşma, köpük hücreleri, elastik lamellerde bozulma, intima-media sınırında ekstrasellüler matriks artışı izlenmektedir	111
Şekil 4.13:	4. gruba ait yarı ince kesitte intima tabakasında kalınlaşma, ekstrasellüler matriks artışı ve köpük hücreleri dikkat çekmektedir	112
Şekil 4.14:	5. gruba ait aort kesiti	113
Şekil 4.15:	5. gruba ait aort kesitinde tunika intimada kalınlaşma ve köpük hücreleri izlenirken, yüzeyde intima hasarı görülmektedir.....	113
Şekil 4.16:	İntima/mediya oranlarının kutu grafiği şeklinde gösterilmesi	115
Şekil 4.17:	1. gruba ait TEM mikrografı.....	116
Şekil 4.18:	2. gruba ait TEM mikrografı.....	116
Şekil 4.19:	4. gruba ait TEM mikrografı.....	117

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Endotel hücrelerinin özellikleri ve fonksiyonları.....	6
Tablo 2.2: Aterosklerotik plakların değerlendirilmesinde kullanılan, Amerikan Kalp Birliği'nin (AHA) Histolojik Sınıflaması	14
Tablo 2.3: Koroner Arter Hastalığı (KAH) Risk Faktörleri	16
Tablo 2.4: CRP'nin proaterojenik etkileri	21
Tablo 2.5: Çeşitli reaktif oksijen türleri (ROT).....	23
Tablo 2.6: NOS izoformları ve özellikleri	29
Tablo 2.7: ROT ile ilişkili bazı patolojik durumlar ve hastalıklar	38
Tablo 2.8: <i>P. major</i> L. yaprak ve tohumlarının kuru ağırlık olarak yapılarında bulunan toplam fenolik, toplam flavonoid ve tannin içeriği (mg/g).....	59
Tablo 3.1: Lowry protein ölçüm yöntemine ait protokol	72
Tablo 3.2: MDA ölçüm yöntemine ait protokol	74
Tablo 3.3: KO aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol	76
Tablo 3.4: SOD aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol	78
Tablo 3.5: GPO aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol	80
Tablo 3.6: NO [•] ölçüm yöntemine ait protokol	82
Tablo 3.7: NOS aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol.....	83
Tablo 4.1: Aort dokusunda ADMA ve NO [•] seviyeleri ile NOS enzim aktiviteleri ve gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi.....	94
Tablo 4.2: Aort dokusunda SOD, KAT, GPO ve KO enzim aktiviteleri ile MDA seviyeleri ve gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi.....	95
Tablo 4.3: Serum GPO ve KAT enzim aktiviteleri ve gruplar ve zamanlar arasındaki farklılıkların incelenmesi.....	96
Tablo 4.4: Serum NO [•] seviyeleri ve NOS enzim aktiviteleri ve gruplar ve zamanlar arasındaki farklılıkların incelenmesi.....	97
Tablo 4.5: Serum MDA seviyeleri ve KO enzim aktiviteleri ve gruplar ve zamanlar arasındaki farklılıkların incelenmesi.....	98
Tablo 4.6: Serum ADMA ile homosistein seviyeleri ve gruplar ve zamanlar arasındaki farklılıkların incelenmesi.....	99

Tablo 4.7: Deney sonu serum BUN, KREA, AST ve ALT seviyeleri ve gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi	100
Tablo 4.8: Deney sonu serum TG, TK, LDL ve HDL kolesterol seviyeleri ve gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi	101
Tablo 4.9: Deney sonu serum LDL/TK, HDL/TK ve HDL/LDL oranları ve gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi.....	102
Tablo 4.10: Çalışma sonunda en yüksek NO*, NOS ve en düşük ADMA seviyelerine sahip gruplar.....	103
Tablo 4.11: Çalışma sonunda en yüksek KAT, GPO ve en düşük KO, MDA seviyelerine sahip gruplar.....	103
Tablo 4.12: Sudan IV boyaması yapılan aort bölümlerinde, aterosklerotik plak alanlarının tüm yüzey alanına oranla yüzdeleri.....	105
Tablo 4.13: Tunika intima ve tunika mediya tabakalarının kalınlık ölçümleri ile intima/mediya oranları.....	114

1. GİRİŞ

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH'lar), Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün yayınladığı raporlara göre, tüm dünyada insanlarda görülen ölüm sebepleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Bu raporlara göre, 2008 yılında bütün dünyada ölen insanların % 30'u (17,3 milyon kişi) KVH'lar nedeniyle hayatlarını kaybetmişlerdir. Kuruluşun yaptığı projeksiyona göre KVH'lar nedeniyle (temel olarak kalp hastalıkları ve inme) hayatını kaybedecek insan sayısının 2030 yılında 23,3 milyona yükselmesi beklenmektedir (1, 2).

Ateroskleroz, KVH'ların ortaya çıkmasının ana sorumlusu olan, damar duvarlarında aterosklerotik plak olarak adlandırılan ve damar lümenine doğru uzanan intimal lezyonlarla karakterize, kronik patolojik bir süreçtir (3, 4). Bugün için ateroskleroz ve ona bağlı nedenlerle ortaya çıkan klinik durumların tedavisi ile ilgili olarak tıbbın önerebildiği seçenekler sınırlıdır. Özellikle oluşmuş plakların anlamlı derecede geriletilmesi ya da ortadan kaldırılması, cerrahi seçenekler dışında, bugün için tedavi seçenekleri arasında bulunmamaktadır. Bu nedenle de bütün dünyada pek çok araştırmacı bugün için insanoğlunun bir numaralı sağlık problemi olan aterosklerozla ilgili olarak oldukça fazla sayıda araştırma yürütmektedir (3-5).

Çok eski çağlardan bu yana, dünyanın birçok yerinde çeşitli hastalıklardan korunma ve tedavi amacıyla, geleneksel olarak çok çeşitli bitkisel ürünler kullanılmış ve kullanılmaya devam etmektedir (6-9). Son yıllarda, birçok bitki ve onlardan elde edilen ekstrelerle ilgili çok sayıda bilimsel araştırma yapılmış ve insan sağlığı ile ilgili olumlu etkilerinin olduğuna ve olabileceğine dair oldukça fazla sayıda veri elde edilmiştir (10-14). Bu bitkiler içinde yüksek fenolik bileşik (polifenol) içeriğine ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip olanlar önemli bir yere sahip olmuşlardır (15-18). Son yıllarda, fenolik bileşiklerin antioksidan özelliklerinin yanı sıra, çok sayıda farklı mekanizmalar aracılığıyla da çeşitli hastalıklardan korunmada etkili oldukları çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur (19-23). Aterosklerozun olumsuz etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla da, çok çeşitli bitkiler ve moleküller üzerinde, tedavi ve koruma amaçlı kullanılabilecek yeni etken maddeler bulma ümidiyle, çok çeşitli in

vitro ve in vivo araştırmalar yapılmaktadır. Birçok in vivo ve in vitro çalışmada, fenolik bileşiklerin ve bu molekülleri yapısında bulunduran bitkilerin ve bitki ekstralarının ateroskleroza karşı çok çeşitli mekanizmalarla koruyucu etkiler gösterebileceklerine dair veriler elde edilmiştir (16, 23-28).

Yapısında yüksek oranda fenolik bileşik bulunduran, yüksek antioksidan ve serbest radikal temizleme yeteneğine sahip bitkilerden biri de *Plantago major* L. (*P. major*)'dur (29-32). *P. major*; Plantaginaceae ailesinin, Plantago cinsine ait çok yıllık bir bitki türüdür ve ülkemizde "büyük sinirli ot" adıyla bilinmektedir (32, 33). *P. major*'un yaprakları ve tohumları, geleneksel tıpta; solunum ve gastrointestinal sistem rahatsızlıkları gibi oldukça geniş bir yelpazedeki hastalık ve rahatsızlıkların tedavisinde, çok çeşitli amaçlar için yaygın bir biçimde kullanılmaktadır (32, 34). Ayrıca, yara iyileşmesi, ülser tedavisi ve zehirlenmeler gibi değişik pek çok alanda kullanılmakla beraber, antiinflamatuvar, antihipertansif, immünmodölatör, antinoziseptif, antimikrobiyal ve antitümöral etkinlik gibi birçok farklı özelliğinin bulunduğunu gösteren çok sayıda çalışmanın varlığı da bu bitkiye olan ilgiyi artırmaktadır (32-42). *P. major* ekstralarının fitokimyasal analizi sonucunda; polisakkaritler, lipitler (doymuş ve doymamış), amino asitler (esansiyel ve esansiyel olmayan), fenolik bileşikler (özellikle flavonoidler), iridoid glikozidleri ve terpenoidler gibi çok değişik biyolojik etkileri bulunan, oldukça fazla sayıda kimyasal bileşiğe sahip olduğu ortaya çıkmıştır (30, 32, 35).

P. major'un ateroskleroz üzerine etkileri ile ilgili literatürde oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır ve aterosklerotik hayvan modelleri ile ilgili ise hemen hemen hiç çalışma bulunmamaktadır. Bu alanda literatürde sadece, 1962 yılında hiperkolesterolemik diyetle ateroskleroz oluşturulmuş tavşanlarda *P. major* yapraklarının direkt etkisinin ve içeriğı ile ilgili bilgi verilmeyen bir ekstresinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışma yapılmış ve bu amaçla, serum TK ve lesitin seviyeleri ile aterosklerotik plakların kalitatif özellikleri incelenmiş ve kolesterol seviyelerinde oldukça anlamlı düşüşler olduğu gösterilmiştir. Bu tarihten sonra *P. major* ile ilgili bu konuda, daha detaylı bir çalışmanın yapılmamış olduğu görülmektedir (43).

Bu çalışmanın amacı; *P. major* yaprağı ekstresinin yüksek kolesterol diyeti ile beslenen hayvanlarda ateroskleroz oluşumu, bazı ateroskleroz risk faktörleri ve oksidan/antioksidan sistem üzerine etkilerini gözlemlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

2.1.1. Tanım

Ateroskleroz, KVVH'ların ortaya çıkmasının ana sorumlusu olan, damar duvarlarında aterosklerotik plak olarak adlandırılan ve damar lümenine doğru uzanan intimal lezyonlarla karakterize, kronik patolojik bir süreçtir. Ateroskleroz terimi, sertleşme anlamına gelen 'skleroz' ve 'lapa' anlamına gelen 'atero' kelimelerinin birleşmesiyle oluşmaktadır (3, 4).

2.1.2. Epidemiyoloji

Ateroskleroz, yağlı çizgilenmelerin gelişimi ile çocukluk döneminde başlamaktadır ve aterosklerozdaki ileri lezyonlar, yaşla birlikte giderek artan bir sıklıkta ortaya çıkmaktadır. Ateroskleroz, erkeklerde kırklı, kadınlarda da ellili yaşlardan sonra hızlı bir ilerleme göstererek, klinik bulgular vermeye başlar ve KVVH'lar olarak adlandırılan yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden klinik durumlara yol açar. Erkek cinsiyete sahip olmak ateroskleroz risk faktörleri içinde yer almaktadır, ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda kadınların da KVVH'lardan ve bu hastalıklara bağlı ölümlerden erkekler kadar etkilendiklerini göstermiştir (3, 44, 45).

KVVH'lar, DSÖ'nün 2011 yılında yayınladığı raporlara göre, tüm dünyada insanlarda görülen ölüm sebepleri arasında birinci sırada yer almaktadır ve bu raporlara göre, 2008 yılında bütün dünyada ölen insanların % 30'u (17,3 milyon kişi) KVVH'lar nedeniyle hayatlarını kaybetmişlerdir. Bu ölümlerin de yaklaşık 7,3 milyonu koroner kalp hastalıkları, 6,2 milyonu da inme nedeniyle gerçekleşmiştir. Bu ölümlerin % 80'inden fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmektedir ve görülme sıklığı erkeklerde ve kadınlarda hemen hemen eşittir. DSÖ'nün yaptığı projeksiyona göre KVVH'lar nedeniyle (temel olarak kalp hastalıkları ve inme) hayatını kaybedecek insan sayısının 2030 yılında 23,3 milyona yükselmesi beklenmektedir (1, 2).

2.1.3. Histoloji

2.1.3.1. Normal Arter Duvarı Histolojisi

Normal arter duvarı intima, medya ve adventisya olmak üzere üç tabakadan oluşmaktadır. İntima tabakası, en içte bulunarak damar lümenini çevreler ve dolaşımdaki çeşitli maddeler için bariyer görevi gören tek katlı endotel hücreleri, subendotelyal matriks, bazal membran ve az miktarda vasküler düz kas hücresi tarafından oluşturulmuş ince bir tabakadır. En kalın tabakayı oluşturan medya tabakası ise orta kısımda bulunur ve intima ile adventisya tabakalarından 'lamina elastika interna' ve 'lamina elastika eksterna' aracılığıyla ayrılır. Bu tabaka kollajen, elastik lifler, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlardan meydana gelmiş bir matriks içindeki vasküler düz kas hücreleri tarafından oluşturulmuştur ve esas olarak damar duvarında kasılma ve gevşeme hareketleri oluşturarak kan akımının düzenlenmesini sağlar. Adventisya ise en dış tabakayı oluşturur ve uzunlamasına seyreden kollajen lifleri, fibroblastlar, arterlerin kanlanması sağlayan 'vaza vazorum'lar, sinir uçları, lenfatikler ve yağ hücreleri gibi çeşitli hücre tiplerini içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır (3, 46).

2.1.3.2. Endotel ve Özellikleri

Normal arter intimasının damar lümenine bakan kısmını kaplayan endotel, birçok fizyolojik ve patolojik olayda düzenleyici görevleri bulunan, mezoderm kaynaklı, tek katlı yassı epitel özelliğinde, vücudun en büyük endokrin, otokrin ve parakrin organıdır. Endokrin, otokrin ve parakrin özellikleriyle kendisini, vasküler düz kas hücrelerini, subendotel tabakadaki ve dolaşımdaki hücreleri etkileme özelliklerine sahiptir (3, 47). Endotel hücreleri, hormonlar ve adezyon molekülleri gibi pek çok molekülle, çeşitli reseptörleri aracılığıyla etkileşime girmektedir. Endotel yarı geçirgen özelliğe sahiptir ve damar geçirgenliğindeki rolü bulunduğu yere ve damarın özelliğine göre (örneğin merkezi sinir sistemindeki endotelde oldukça az) değişmektedir. Pek çok yağda çözünen ve çok küçük çaplı suda çözünen maddenin

kan ve dokular arasında taşınmasına, ayrıca inflamasyon ve yara iyileşmesi gibi bazı olaylar için gerekli çeşitli moleküllerin geçişine aracılık etmektedir (3, 47, 48).

Endotel, normal damar homeostazı, hücre proliferasyonu, vasküler tonusun ayarlanması, inflamatuvar olaylar, koagülasyon sisteminin düzenlenmesi ve immünolojik reaksiyonlar için gerekli pek çok maddenin sentez ve metabolize edildiği, oldukça fazla işleve sahip bir dokudur (Tablo 2.1) (3). Endotel dokusu bu fonksiyonlarını; hormonlar, büyüme faktörleri ve inhibitörleri, vazodilatör ve vazokonstriktör maddeler, inflamatuvar araçlar, antitrombotik ve protrombotik maddeler gibi pek çok aracı kullanarak gerçekleştirmektedir (47, 48).

Tablo 2.1: Endotel hücrelerinin özellikleri ve fonksiyonları – Kumar ve ark. (3)’dan alınmıştır.

Endotel Hücrelerinin Özellikleri ve Fonksiyonları	
Geçirgenlik bariyerinin sürdürülmesi	- Kan akımı ve damar reaktivitesinin ayarlanması - Vazokonstriktörler: Endotelin, ACE - Vazodilatörler: NO[•], prostasiklin
- Antikoagülan, antitrombotik, fibrinolitik düzenleyicilerin oluşturulması - Prostasiklin - Trombomodülin - Heparin benzeri moleküller - Plazminojen aktivatörü	- İnflamasyon ve immünitinin düzenlenmesi - IL-1, IL-6, kemokinler - Adezyon molekülleri: VCAM-1, ICAM, E-selektin, P-selektin - Histokompatibilite antijenleri
- Protrombotik moleküllerin oluşturulması - Von Willebrand faktörü - Doku faktörü - Plazminojen aktivatör inhibitörü	- Hücre büyümesinin düzenlenmesi - Büyümeyi uyaranlar: PDGF, CSF, FGF - Büyüme inhibitörleri: Heparin, TGF-β
Ekstrasellüler matriks yapımı (kollajen, proteoglikanlar)	LDL oksidasyonu
ACE, anjiyotensin-dönüştürücü enzim; CSF, koloni-stimüle edici faktör; FGF, fibroblast büyüme faktörü; ICAM, intersellüler adezyon molekülü; IL, interlökin; LDL, düşük-dansiteli lipoprotein; NO, nitrik oksit; PDGF, platelet-kökenli büyüme faktörü; TGF-β, transforme edici büyüme faktörü-β; VCAM, vasküler hücre adezyon molekülü.	

Endotel dokusunun sahip olduğu bu önemli özellikleri nedeniyle, aterosklerotik risk faktörleri etkileriyle endotel disfonksiyonunun görüldüğü durumlarda vasküler tonus bozuklukları, koagülasyon sistemi anormallikleri ve vasküler düz kas hücre proliferasyonları gibi patolojiler meydana gelmektedir. Bu durumlar da trombosit ve lökosit adezyonu, inflamatuvar sitokinlerin üretiminde artış, endotel geçirgenliğinde artma, subendotel alanda makrofaj birikimi ve zamanla köpük hücre oluşumları ve vasküler düz kas hücre proliferasyonları gibi sonuçlar doğurarak, KVVH'lar için zemin oluşturmaktadır (3, 4).

2.1.4. Patogenez

Ateroskleroz, arter duvarının endotel hasarına verdiği kronik inflamatuvar bir cevaptır (49). Endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri, oksidasyon gibi çeşitli modifikasyonlara uğramış lipoproteinler, monositlerden köken alan makrofajlar, T lenfositleri ve damar duvarında bulunan normal hücreler arasında meydana gelen etkileşimler neticesinde, aterosklerotik lezyonda progresyon meydana gelir. Kronik endotel hasarı nedeniyle endotel disfonksiyonu meydana gelir ve damar duvarı geçirgenliği artar, lökosit adezyonu gerçekleşir, tromboza yatkınlık artar, damar duvarında LDL ve okside LDL (ox LDL) gibi lipoproteinler birikir. Endotele monositlerin toplanması ve adezyonu gerçekleşir ve bu hücreler intima tabakasına göçerek makrofajlara dönüşürler ve daha sonra zamanla köpük hücrelerini oluşturmaya başlarlar. Plateletler adezyona uğramaya başlarlar ve aktifleşmiş plateletlerden, makrofajlardan ve damar duvarında bulunan hücrelerden çeşitli sitokinlerin salınımı ile medya tabakasında vasküler düz kas hücre proliferasyonu gerçekleşir ve bu hücreler intima tabakasına da girerek, burada da çoğalmaya başlarlar. Bununla birlikte ekstraselüler matriks yapımında da artış görülmeye başlar. Hücre dışı alanlarda ve makrofajlar ve vasküler düz kas hücreleri gibi hücre içi alanlarda da lipid birikimi oluşmaya başlar. Bu şekilde intima tabakasında lipid yüklü makrofajların ortamda birikmesi sonucunda yağlı çizgilenmeler meydana gelir. Bu lezyonun progresyonuyla da, proliferasyona uğramış vasküler düz kas hücreleri, köpük hücreleri, hücre dışı lipid birikimleri ve ekstraselüler matriksten oluşan aterom plağı oluşur (3, 44, 49).

2.1.4.1. Endotel Disfonksiyonu

Endotel disfonksiyonu, aterosklerozun tüm basamaklarında etkili olan ve inflamatuvar, proliferatif ve koagülasyona yatkınlık durumları ile beraberlik gösteren, ateroskleroz oluşumunun ana mekanizmalardan biridir. Hiperlipidemi, obezite, diyabetes mellitus (DM), hipertansiyon (HT), sigara toksinleri, oksidatif stres, immün komplekslerin birikimi, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinler, artmış CRP seviyeleri, hiperhomosisteinemi, virüsler gibi çeşitli enfeksiyon ajanları, ileri glikasyon son ürünleri ve kronik sistem enfeksiyonları gibi pek çok faktör nedeniyle endotel disfonksiyonu meydana gelmektedir (47, 50).

Günümüzde endotel disfonksiyonunun, endotelde görülen yapısal değişikliklerden daha çok, fonksiyonel değişiklikler sonucu oluşmaya başladığı görüşü hakimiyet kazanmıştır. İnsanlarda, damar duvarlarında görülen erken aterosklerotik lezyonların, yapısal olarak sağlam endotel alanlarından başladığı tespit edilmiştir. Yapısal olarak sağlam, fakat fonksiyonel olarak bozuk hücrelerin varlığında, endotel geçirgenliği artar, lökosit adezyonu çoğalır ve gen ekspresyonlarında değişiklikler meydana gelir. Endotel disfonksiyonunun en önemli nedenleri olarak, hemodinamik bozukluklar, hiperlipidemi ve inflamasyon ön plana çıkmaktadır (3, 49, 50).

Hemodinamik bozuklukların en önemli nedenlerinden biri, NO $\cdot$ ile ilişkili vasküler reaktivitede görülen bozulmalardır (50). NO $\cdot$, argininin nitri oksit sentaz (NOS) enzimi ile NO $\cdot$ ve L-sitrüline dönüştürülmesi ile elde edilir. NO $\cdot$ (endotel kaynaklı gevşetici faktör olarak da bilinir), endotel bağımlı vazodilatasyondan sorumludur ve vasküler düz kas hücreleri üzerine guanilat siklaz yoluyla etki etmektedir (51). NO $\cdot$ 'nun, damar tonusunu ayarlama, trombosit kümelenmesini engelleme, vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmalarını engelleme, peroksinitrit (ONOO $\cdot$) gibi hasar yapıcı özelliği olan serbest radikallerin salınımı gibi pek çok fonksiyonu bulunmaktadır (52). Endotel disfonksiyonu, NO $\cdot$ gibi vazodilatörlerin biyoyararlanımında azalma ve endotelin-1 (ET-1) gibi endotel kaynaklı vazokonstriktörlerde artış ile karakterizedir ve bu durum, endotel kaynaklı

vazodilatasyonun azalmasına yol açmaktadır (53). Çeşitli farmakolojik ve hemodinamik uyaranlara endotel hücrelerince yetersiz NO[•] cevabının oluşması, aterosklerozun gözlenen ilk fizyolojik bulgusudur (54, 55). NO[•] fonksiyonlarında görülen kayıplar neticesinde endotel hücrelerinin yüzeylerinde VCAM-1, ICAM-1 ve P selektin gibi moleküller oluşmaya başlarlar. Bu moleküller gibi adezyon moleküllerinin oluşmasıyla inflamatuvar hücreler endotele yapışırlar ve sonra subendotel alana göç etmeye başlarlar. Sonuçta, endotel disfonksiyonu neticesinde, lökositlerin arter duvarına adezyonu, subendotel alana geçişleri, vasküler düz kas hücrelerinin göçü ve proliferasyonu tetiklenmiş olur (47, 53, 55).

Aterosklerozda görülen hemodinamik bozukluğa yol açan faktörlerden biri de kan akımlarında görülen türbülanstır. Aterosklerotik plakların daha çok damarların çıkış ostiumları ve dallanma noktaları, abdominal aortun arka duvarı gibi kan akımının değişikliğe uğradığı bölgelerde oluşmaya meyilli oldukları gösterilmiştir. Akım dinamiklerinde görülen bu değişiklikler endoteli mekanik olarak etkilemelerinin yanı sıra, fonksiyonel olarak da etkilemekte ve ateroskleroz patofizyolojisiyle ilişkili genlerin ekspresyonunu uyarak, aterogenezin kompleks transkripsiyonel düzenlenmesine belirgin bir biçimde katkıda bulunmaktadır. Ayrıca yapılan bazı in vitro çalışmalarda, normal laminer kan akımı olan ve türbülant kan akımı olan damar bölgeleri karşılaştırıldığında, laminer kan akımının SOD gibi antioksidan enzimlerin üretimiyle ilgili endotelyal genleri uyardığı gösterilmiştir (3, 50).

Endotel disfonksiyonuna neden olan ana sebeplerden bir diğeri ise hiperlipidemidir (56). Lipidler kanda genel olarak apoproteinlere bağlı olarak, lipoprotein kompleksleri şeklinde taşınırlar. Artmış LDL kolesterol düzeyleri, azalmış HDL kolesterol düzeyleri ve artmış anormal lipoprotein (a) (Lp (a)) seviyeleri, önemli lipoprotein anormallik durumlarını oluşturmaktadır (3). Hiperlipidemi varlığında NADPH (indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) oksidaz enziminin 'upregüle' olduğu, süperoksit (O₂^{•-}) üretiminin ve oksidatif stresin arttığı ve plazma ADMA seviyelerinin yükseldiği ve LDL'nin endotel hücrelerine girerek, intima tabakasına yayıldığı ve intimada oksidatif modifikasyona uğrayarak makrofaj göçüne ve kolesterol birikimine neden olduğu gösterilmiştir (3, 56). ADMA, NO[•]

oluşumunun önemli bir inhibitörüdür ve endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır (57). ADMA, endotelyal NOS'un (eNOS) endojen bir inhibitörüdür ve bu durum artmış $O_2^{\cdot -}$ üretimine ve azalmış $NO^{\cdot}$ üretimine neden olmaktadır (56). ADMA'nın plazma konsantrasyonlarının hiperkolesterolemi ile arttığı gösterilmiştir ve bu molekülün endotel disfonksiyonu için hem bir belirteç, hem de bir risk faktörü olduğu düşünülmektedir (58, 59). LDL seviyelerindeki artış ve özellikle LDL oksidasyonu, endotel hasarı ve damar duvarındaki inflamatuvar yanıtın artışından sorumlu ana etkenlerden biridir. Ox LDL'nin endotel hücrelerindeki proinflamatuvar moleküllerin ve adezyon moleküllerinin ekspresyonunu indüklediği, ET-1 üretimini uyardığı, çeşitli kemoatraktan moleküllerin sentezini artırdığı, monosit toplanmasını ve makrofaj oluşumunu uyardığı ve bu nedenle çok çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin üretimini indüklediği, vasküler düz kas hücre göçü ve proliferasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (3, 56, 60). Ox LDL reseptöründen farklı yapıdaki çöpçü reseptörler tarafından makrofajlarca alınır ve bu makrofajlar köpük hücrelerine dönüşürler ve aterosklerotik lezyon oluşum sürecini hızlandırırlar (3, 61). Ox LDL, aterosklerotik lezyonlarda monosit toplanmasını uyaran büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinlerin endotel hücrelerinden ve makrofajlardan salınmasını uyarmaktadır, ayrıca endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücrelerine sitotoksik etki yaparak da endotel disfonksiyonuna katkıda bulunmaktadır (3, 62).

Endotel disfonksiyonu ile ilişkili ana faktörlerden bir diğeri ise inflamasyondur. Aterosklerotik lezyonların başlangıç ve ilerleme aşamaları ve meydana gelen komplikasyonlarında inflamatuvar hücreler ve çeşitli mediyatörler görev almaktadırlar (3, 49). Yapılan çok sayıda çalışmada, sigara, hiperkolesterolemi, HT ve DM gibi çeşitli risk faktörlerinin genel bir inflamatuvar yanıtı neden olarak vücutta yaygın bir reaksiyon oluşturdıkları gösterilmiştir (63). Bu risk faktörlerine yanıt olarak hem sistemik akut faz reaktanları aktive olur, hem de endotel hücrelerince çeşitli sinyal molekülleri üretilmeye başlar (64, 65). Normalde hücre adezyonunu ve trombüs oluşumunu engelleyici özellikte olan endotel, çeşitli risk faktörlerinin etkisi ile adezyona açık ve protrombotik hale gelmektedir (66).

İnflamatuvar hücreler normalde damar yüzeyine bağlanamazlar, ancak aterogenezin erken dönemlerinde damarlarda meydana gelen endotel disfonksiyonu nedeniyle, endotel hücrelerinden VCAM-1, ICAM gibi lökosit adezyonunu artıran adezyon moleküllerinin ekspresyonu, PDGF, FGF, TGF- β , IL-1 ve TNF- α gibi çeşitli büyüme faktörlerinin salınımı ve makrofaj koloni-stimüle edici faktör (M-CSF), granülosit makrofaj koloni-stimüle edici faktör (GM-CSF) gibi sitokinlerin üretimi başlamaktadır (3, 67). Bu moleküller aracılığıyla endotele bağlanan monositler ve T hücreleri gibi hücreler, lokal olarak üretilmiş kemokinlerin etkisi altında subendotelyal alana diyapedez mekanizması ile göç etmektedirler. İntimada monositler makrofajlara dönüşürler ve ox LDL'yi ve ortamda bulunan diğer lipoproteinleri içlerine almaya başlarlar ve sonunda köpük hücrelerine dönüşürler. Zamanla ox LDL'nin giderek artan bir şekilde birikimi sonucunda aterosklerotik lezyonlar oluşmaya ve ilerlemeye başlarlar (3, 4). Ox LDL primer proinflamatuvar sitokinler olarak adlandırılan IL-1 ve TNF- α 'yı aktive eder. Bu sitokinler IL-6'yı aktive ederek karaciğerden CRP gibi akut faz reaktanlarının salınımına yol açarlar (62, 68). Ox LDL veya T hücreleri gibi uyarıcılar tarafından aktive edilen makrofajlarca da TNF- α gibi sitokinler ve LDL oksidasyonunu artıran reaktif oksijen türleri (ROT) üretilmeye başlar. Üretilen bu sitokinler ile daha fazla lökosit adezyonu gerçekleşir. Tüm bu hücrelerden salınan çeşitli kemokinlerce, ortama çok sayıda mononükleer inflamatuvar hücre toplanmaya başlar (3, 68). Risk faktörlerinin varlığının devam etmesi halinde, intimada toplanan T hücreleri makrofajlarca aktive edilmeye devam eder ve böylece kronik bir immün inflamatuvar durum oluşur. Böylece intimal lezyonlarda ilerleme devam eder ve bu lezyonlarda bulunan aktive olmuş T hücreleri interferon- γ gibi makrofajları, endotel hücrelerini ve vasküler düz kas hücrelerini uyaran inflamatuvar sitokinleri salgırlar (3, 66). T hücreleri ayrıca makrofajları aktive ederek kollajen, matriks metalloproteinazlar (MMP) ve çeşitli sitokinlerin salınımlarını teşvik etmektedir. Bu şekilde aterom plağı giderek büyümeye başlar. Ayrıca ox LDL ve "heat shock proteinleri", "toll-like" reseptörlerini (TLR) uyarak inflamasyonu daha da artırır (49, 69). Bu şekilde meydana gelen kronik inflamatuvar durumun neticesinde, aktive olmuş lökositler ve damar duvarında bulunan hücrelerce vasküler düz kas hücre çoğalması ve ekstraselüler matriks sentezini uyaran çeşitli büyüme faktörleri salgılanır (3, 70).

2.1.4.2. Vasküler Düz Kas Hücre Göçü ve Proliferasyonu

Ateroskleroz oluşum sürecinde meydana gelen ana hücrel olaylar, endotel disfonksiyonu sonucu damar duvarında lökositlerin toplanması ve birikimi ile makrofaj ve lenfositlerle beraber vasküler düz kas hücrelerinin intima tabakasına göç etmesidir. Vasküler düz kas hücrelerinin bu anormal göçleri ve proliferasyonları, ateroskleroz progresyonunun yanısıra, HT patogenezi ve perkütan koroner girişim (PCI) sonrası görülen restenoz oluşumu gibi pek çok kardiyovasküler patoloji ile ilgili anahtar bir rol oynamaktadır (3, 71, 72).

Vasküler düz kas hücreleri, ateroskleroz progresyonunun her aşamasında görev alır ve lipid yüklenmesi ile beraber, aterom plağı oluşum sürecinin düzenlenmesinde çok önemli fonksiyonlara sahiptir (73). İntimada ışınal yayılma şeklinde biriken plazma LDL'leri, apolipoprotein B100 kısımları yardımıyla, vasküler düz kas hücreleri tarafından salgılanan sülfatlanmış proteoglikanlara, fibronektinlere ve kollajenlere bağlanarak oksidasyon gibi çeşitli modifikasyonlara uğrarlar (74, 75). Vasküler düz kas hücrelerinin aterosklerozdaki rolü, lipid bileşenleri endositoz ile alma ve nanometrik moleküler kompleksleri, hücrel parçacıkları ve apoptotik hücreleri fagosite etme yeteneği gibi özellikleri ile doğrudan ilişkilidir (73). LDL'ler, vasküler düz kas hücrelerinin LDL'lere özgül reseptörleri tarafından içeri alınırken, modifiye-LDL'ler çöpçü reseptörler tarafından hücre içine alınmaktadır ve vasküler düz kas hücreleri, ox LDL gibi modifiye LDL'leri, doğal LDL'lerden endositoz yoluyla daha fazla içlerine alırlar (76, 77). LDL'lerin vasküler düz kas hücreleri tarafından endositozu, sitoplazmalarında geniş lipid damlacıkları içeren köpük hücrelerinin oluşumuna neden olmaktadır ve vasküler düz kas hücreleri yaşlanmış eritrositleri ve hem-kaynaklı demiri de makrofajlar gibi fagosite edebilmektedirler (78, 79).

Lipid birikimi ile meydana gelen başlangıç hasarı sonucunda bazı mediyal vasküler düz kas hücreleri, fizyolojik kontraktıl fonksiyonlarını kaybederek, sentetik ve proliferatif bir fenotip kazanırlar. Bu fenotipe sahip mediyal vasküler düz kas hücreleri, plateletler, makrofajlar, endotel hücreleri ve vasküler düz kas hücrelerinden de salgılanan PDGF gibi pek çok uyarının etkisiyle intimaya göç

ederler, prolifer olurlar, LDL'lere ve kollajenlere afinitesi düşük proteoglikanlar gibi pek çok maddeyi sentezlerler (3, 73).

İntimal vasküler düz kas hücre çoğalması ve ekstraselüler matriks birikimi, erken aşamadaki bir yağlı çizgilenmeyi, olgun bir aterom plağına dönüştürmekte ve aterosklerotik lezyonların ilerleyici bir şekilde büyümesine neden olmaktadır. PDGF, FGF ve TGF- α gibi bir çok büyüme faktörü vasküler düz kas hücre çoğalması ve ekstraselüler matriks sentezine neden olmaktadır. Artmış sentezin yanısıra, aterom plaklarında bulunan aktif inflamatuvar hücreler, intimal vasküler düz kas hücrelerinde apoptoza da neden olabilmekte ve aynı zamanda yırtılmaya meyilli, dengesiz, labil bir plak oluşumuna neden olan ekstraselüler matriks yıkımını da artırabilmektedirler (3, 71, 73).

2.1.4.3. Aterosklerozun Morfolojik Gelişimi

Aterosklerozda görülen anahtar olaylar intimada kalınlaşma ve lipid birikimidir (3). Ateroskleroz gelişim sürecinde görülen en erken lezyon ise çocuklar ve bebeklerde de görülebilen ve ilk defa Stary tarafından tanımlanan, damar duvarında bulunan makrofajlar ve vasküler düz kas hücrelerinde hücre içi lipid birikimi ile karakterize yağlı çizgilenmelerdir (80, 81). Bu lezyonlar, hiperkolesteroleminin etkisiyle giderek ilerler ve ara lezyonlara dönüşür. Ara lezyonların ilerlemesi ile tüm bu süreç sonunda fibröz ya da ateromatöz plak gelişir (44). Aterosklerotik plakların gelişim aşamalarını içeren sınıflandırılma tablo 2.2'de görülmektedir. Aterom plakları; makrofajlar, vasküler düz kas hücreleri, lökositler, kollajen ve elastik dokular, intrasellüler ve ekstrasellüler yağ birikimlerinin oluşturduğu fibröz bir başlık içerir. Zaman içinde bu plak yapısı genişlemeye, kalınlaşmaya başlar ve damar lümeninde ilerleyici bir daralmaya neden olur. Herhangi bir zamanda, plak yüzeyinde ülserasyon ve trombüs oluşumu gözleendiğinde, vücudun değişik bölgelerinde embolizasyon ya da oklüzyon gibi durumlar görülebilir (3, 44).

Tablo 2.2: Aterosklerotik plakların değerlendirilmesinde kullanılan, Amerikan Kalp Birliği'nin (AHA) Histolojik Sınıflaması– Perrotta (82)'dan alınmıştır.

Başlangıç lezyonları	
Tip I	Belirgin olmayan plak görünümü ve izole lipid yüklü makrofajlar (köpük hücreleri).
Tip II	Yağlı çizgilenmeler ve noktalar: Makrofaj ve düz kas hücreleri kaynaklı köpük hücrelerini içeren, görülebilen ilk lezyonlar.
Ara lezyonlar	
Tip III	Tip II'de gözlenen lezyonlarla beraber, düz kas hücrelerinde artış, köpük hücreleri ve küçük hücre dışı lipid birikimleri.
İlerlemiş lezyonlar	
Tip IV	Aterom: Köpük hücreleri ve düz kas hücrelerince infiltrasyona uğramış, proteoglikanlardan zengin tabaka ile kaplı, yoğun hücre dışı lipid birikimi (lipid çekirdek).
Tip V	
Va	Fibroaterom: İntimanın proteoglikandan zengin tabakasında fibröz doku artışı.
Vb	Elastik liflerde, matriks veziküllerinde, lipid damlacıklarında kalsifikasyon (Tip VII olarak da adlandırılır).
Vc	Lipid çekirdeğin minimal düzeyde bulunması ya da olmaması (Tip VIII olarak da adlandırılır).
Komplike lezyonlar	
Tip VI	Tip IV ve Tip V lezyonlarla birlikte hemoraji, tromboz ve ülser bulunması.

2.1.5. Ateroskleroz Risk Faktörleri

Bilindiği üzere koroner arter hastalıklarının temelinde ateroskleroz yer almaktadır (1, 2). Ateroskleroza neden olan çok çeşitli risk faktörleri bulunmaktadır ve bu risk faktörlerinin tanımlanması ve bu durumların tedavisi, henüz belirti göstermeyen kişilerde koroner kalp hastalıklarının önlenmesi, açığa çıkmış hastalığı olan kişilerde ise tekrarlayan olayların önlenmesi için gereklidir. Bu amaçla sistematik yaklaşımlara gereksinim olduğundan, çeşitli kılavuzlar hazırlanmaktadır. NCEP ATP kılavuzları (The National Cholesterol Education Program, Adult Treatment Panel Guidelines), dünyada koroner arter hastalıklarına yaklaşımlarda en sık kullanılan kılavuzlardan biridir. En son yayınlanan NCEP ATP III kılavuzunun final raporuna göre koroner arter hastalığı risk faktörleri, tablo 2.3'te gösterilmiştir (83).

Sigara kullanımı, fazla kiloluluk/obezite, fiziksel inaktivite, yaşam tarzı değişiklikleri ve/veya çeşitli ilaçlarla düzenlenebilen değişik lipid bozuklukları, HT, DM ve insülin direnci gibi risk faktörlerinden bazıları yaşam tarzı değişiklikleri ile modifiye edilebilmektedir. Yaş, cinsiyet ve aile hikayesi gibi faktörler ise modifiye edilemeyen faktörler arasında yer almaktadır. Ayrıca Lp (a), homosistein, trombotik ve inflamatuvar faktörler gibi yeni risk faktörleri de bulunmaktadır. Tüm bu risk faktörleri aterosklerozun başlangıcında ve ilerlemesinde önemli roller oynamaktadır (83).

2.1.5.1. Lipid Risk Faktörleri

LDL Kolesterol: Hiperkolesterolemi, ateroskleroz için majör bir risk faktörüdür ve diğer risk faktörlerinin yokluğunda bile hiperkolesterolemi aterosklerotik lezyon gelişimini başlatmak için yeterlidir. Kolesterolün artmış risk ile ilişkili olan ana elemanı LDL kolesteroldür (3). LDL'nin proinflamatuvar bir ajan olduğu, endotel hasarına yol açtığı ve aterosklerotik lezyonun en önemli belirtisi olan kronik inflamatuvar cevabı uyardığı tespit edilmiştir. LDL, endotel tabakasına girerek oksidatif modifikasyona uğramakta, çeşitli inflamatuvar mediyatörlerin sekresyonuna, makrofaj göçüne ve kolesterol birikimine neden olmaktadır ve tüm

bunların sonucunda endotel hücre fonksiyonları bozulmakta ve NO^{*} üretimi azalmaktadır. Ox LDL'yi fagosite eden makrofajlar köpük hücrelerine dönüşerek aterosklerotik sürecin devamına katkıda bulunmaktadır. LDL ayrıca vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonuna da neden olmaktadır (56, 60-62).

Tablo 2.3: Koroner Arter Hastalığı (KAH) Risk Faktörleri–NCEP ATP III (83)'ten alınmıştır.

1) Lipid Risk Faktörleri	2) Lipid Olmayan Risk Faktörleri	
• LDL • Trigliseridler • Lipoprotein artıkları • Non-HDL Kolesterol • HDL düşüklüğü • Aterojenik dislipidemi	A) Modifiye Edilebilen Risk Faktörleri	B) Modifiye Edilemeyen Risk Faktörleri
	• HT • Sigara içiciliği • DM • Fazla kiloluluk/Obezite • Fiziksel inaktivite • Aterojenik diyet	• Yaş • Erkek cinsiyet • Ailede erken koroner kalp hastalığı (KKH) öyküsü
3) Yeni Kullanıma Giren Risk Faktörleri		
A) Yeni Kullanıma Giren Lipid Risk Faktörleri	B) Yeni Kullanıma Giren Lipid Olmayan Risk Faktörleri	
• Lp (a) • Küçük LDL parçacıkları • HDL alt tipleri • Apolipoproteinler (Apolipoprotein B ve A-I) • TK/HDL kolesterol oranı	• Homosistein • Trombojenik/hemostatik faktörler • İnflamatuvar faktörler (ör. CRP) • Bozulmuş açlık glukozu	

Serum kolesterol seviyeleri ile KKH riski arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (84). TK ve LDL kolesterol seviyeleri düşük olan toplumlarda; sigara, HT ve DM gibi diğer risk faktörleri sık olarak görüldüğünde bile KKH riskinin düşük olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (85). Hiperkolesteroleminin genetik formlarında ise, diğer risk faktörlerinin tamamen yok olduğu durumlarda bile, tek başına yüksek LDL seviyelerinin KAH'a yol açtığı oldukça açık bir biçimde gösterilmiştir (86).

Ayrıca iyi tanımlanmış topluluklarda yapılan prospektif çalışmaların en dikkate değer olanlarından biri olan "Framingham Kalp Çalışması ve Toplumlarda Ateroskleroz Riski" sonuçlarına göre, serum kolesterol düzeylerindeki artışlarla beraber, KAH'a bağlı ölümlerde de bir artış görüldüğü tespit edilmiştir (87, 88). Bu çalışmalar gibi daha pek çok çalışmanın verilerini dikkate alan NCEP ATP kılavuzları, lipid düşürücü tedavide LDL kolesterolü ana hedef olarak belirlemiştir (83).

HDL Kolesterol Düşüklüğü: Yapılan çok sayıda çalışmada HDL kolesterol seviyeleri ile KAH gelişme riski arasında ters yönde ve güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir ve düşük HDL kolesterol seviyeleri KAH için bağımsız bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. HDL kolesterol seviyelerinde görülen % 1'lik düşüşün, KKH riskini % 2-3 oranında artırdığı tespit edilmiştir (83, 89). NCEP ATP III kılavuzunda, düşük HDL kolesterol seviyelerinin (<40 mg/dl) KKH için bir risk faktörü, yüksek HDL kolesterol seviyelerinin (>60 mg/dl) ise koruyucu bir faktör olduğu belirtilmektedir (83). Düşük HDL düzeylerine neden olan faktörler arasında fazla kiloluluk ve obezite, fiziksel inaktivite, sigara içiciliği, aşırı karbonhidrat alımı, tip 2 diyabet, genetik faktörler ve beta blokörler, anabolik steroidler ve progestasyonel ajanlar gibi ilaçlar sayılabilmektedir (90-92).

Trigliseridler: Birçok prospektif epidemiyolojik çalışma sonucunda serum trigliserid seviyeleri ile KKH insidansı arasında pozitif bir ilişki bulunduğu ortaya çıkmıştır (93, 94). Trigliseridlerle KKH'ları arasındaki ilişki, özellikle DM, obezite, HT, LDL kolesterol yüksekliği ve düşük HDL kolesterol değerleri gibi faktörlerle ilişkilendirilmektedir (95). Bununla birlikte, yapılan pek çok prospektif çalışmanın metaanalizi sonucunda, sınırda (150-199 mg/dl) veya yüksek (200 mg/dl'den yüksek) trigliserid seviyelerinin KAH için bağımsız bir risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur (83, 93, 94).

2.1.5.2. Lipid Olmayan Risk Faktörleri

Lipid olmayan risk faktörleri, modifiye edilebilen ve edilemeyen risk faktörleri olarak ikiye ayrılmaktadır. Modifiye edilebilen risk faktörleri arasında HT, sigara içiciliği, DM, fazla kiloluluk/obezite, fiziksel inaktivite ve aterosjenik diyet gibi risk faktörleri yer almaktadır. Modifiye edilemeyen risk faktörleri arasında yaş, erkek cinsiyet ve ailede erken KKH öyküsü gibi risk faktörleri yer almaktadır (83).

HT, KKH'ları, kalp yetmezliği, serebrovasküler hastalıklar (SVH), periferik damar hastalıkları (PDH), böbrek yetmezliği ve atriyal fibrilasyon gibi pek hastalık için major bir risk faktörüdür (96). Sigara içiciliği de, KKH'ları, SVH ve bütün aterosklerotik KKH'lar için güçlü ve bağımsız bir major risk faktörüdür (83, 97). İnsülin direnci, hiperinsülinemi ve artmış kan glukozu da aterosklerotik kardiyovasküler hastalık gelişimiyle ilişkilidir ve DM varlığı, KKH eşdeğeri olarak görülmektedir (83, 98). Obezite de; HT, insülin direnci ve glukoz intoleransı, hipertrigliseridemi, azalmış HDL kolesterol seviyeleri ve düşük adiponektin seviyeleri gibi ateroskleroz, KKH ve kardiyovasküler mortalite ile ilgili bir dizi risk faktörüyle yakından ilişkilidir (99-102) ve AHA tarafından, koroner kalp hastalıkları için majör bir risk faktörü olarak tanımlanmaktadır (103).

Koroner hastalık riski, kadınlarda ve erkeklerde yaşla giderek artmaktadır (83). KKH taraması amacıyla kendi istekleriyle hastaneye başvuran 40 yaşında veya daha yaşlı olan 3,6 milyondan fazla insandan oluşan bir kohortla yapılan büyük bir çalışmada, KKH varlığının, yaşamın her dekadında belirgin bir şekilde artış gösterdiği ve bu artışların 40-50 yaş arası % 2, 51-60 yaş arası % 3,5, 61-70 yaş arası % 7,1, 71-80 yaş arası % 13, 81-90 yaş arası % 22,3 ve 91-100 yaş arası % 32,5 oranında olduğu tespit edilmiştir (104). Erkeklerde 40 yaşından 60 yaşına kadar miyokard infarktüsünün insidansında beş kat artış olduğu tespit edilmiştir (3). Erkeklerde KKH'ların kadınlardan 10 ile 15 yıl daha erken geliştiği bilinmektedir (83).

KKH'ları, ailelerde kümelenme eğilimi göstermektedir ve yapılan çok sayıda prospektif çalışmada, diğer risk faktörlerinin bulunmadığı durumlarda, erken KKH ile ilgili pozitif aile öyküsü varlığının, bağımsız bir risk faktörü olduğu tespit edilmiştir (83).

2.1.5.3. Yeni Kullanıma Giren Lipid Risk Faktörleri

Lp (a): Lp (a) yapısal olarak LDL molekülüne çok benzeyen, lipid içeriği LDL ile hemen hemen aynı olan ve LDL gibi dışı apolipoprotein B-100 (apo B-100) ile çevrili, LDL'den farklı olarak dışında apolipoprotein (a) (apo (a)) adı verilen ve apo B-100'e tek bir disülfid bağı ile bağlı ek bir apoprotein daha bulunan bir moleküldür. Artmış Lp (a) düzeyleri TK veya LDL seviyelerinden bağımsız olarak yüksek koroner ve serebrovasküler hastalık riski ile ilişkili güçlü ve bağımsız bir risk faktörüdür (3).

TK/HDL Kolesterol Oranı: Yapılan çeşitli epidemiyolojik çalışmalarda, KAH riskinin belirlenmesinde, çeşitli plazma lipidlerinin beraber nasıl etki ettiklerini anlamada ve KAH riskinin önceden tahmin edilmesinde plazma TK/HDL kolesterol oranının yararlı olduğu vurgulamaktadır (83). Normal olarak TK/HDL kolesterol oranının 5'in altında olması gerektiği öne sürülmektedir (105). Ülkemizde yapılan TEKHARF çalışmasının sonuçlarına göre TK/HDL kolesterol oranındaki 2 birimlik bir artışın, koroner olay ve ölüm riskini bağımsız bir şekilde % 68 oranında yükselttiği tespit edilmiş ve bu çalışmaya göre TK/HDL kolesterol oranının, halkımızda KKH riskini belirlemede en iyi lipid öngörücüsü olduğu belirlenmiştir (106).

2.1.5.4. Yeni Kullanıma Giren Lipid Olmayan Risk Faktörleri

Homosistein: Homosistein, metiyonin amino asidinden türeyen, sentezi ve metabolizması demetilasyon, transmetilasyon ve transsülfürasyon aşamalarından oluşan, sülfürlü bir amino asittir (107). Yapılan çok sayıdaki klinik ve epidemiyolojik çalışmada, total serum homosistein seviyeleri ile KAH, PDH, inme ve venöz trombüs arasında güçlü bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir (3). Homosisteinin, monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve IL-8 ekspresyonunu ve sekresyonunu uyarak, vasküler alanda lökosit birikimine neden olduğu gösterilmiştir (108). Homosisteinin vasküler düz kas hücre proliferasyonunu ve kollajen üretimini artırdığı gösterilmiştir (109). Homosisteinin tiyolakton metabolitinin LDL kolesterolle birleşerek kümelenmeler oluşturduğu ve bu kümelenmelerin arter intimasında bulunan vasküler makrofajlarca alınarak köpük hücrelerinin oluştuğu ve daha sonra bu köpük hücrelerinin endotel alanına lipid bıraktığı ve serbest radikal oluşumuna neden olan homosistein-tiyolakton moleküllerini serbestlediği tespit edilmiştir (110). Akut koroner sendromlu hastalarda homosisteinin protrombotik etkilerinin olduğu gösterilmiştir (111). İndirgenmiş homosisteinin oksidasyonu sırasında meydana gelen serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin de doğrudan endotel hücrelerine zarar verebildiği gösterilmiştir (112, 113). Endotel hücrelerinin uzun süre homosisteine maruz kalması sonucunda, NOS'un endojen inhibitörü olup, NO^{*} üretimini bozan ADMA'yı parçalayan enzim olan dimetilarginin dimetilaminohidrolaz (DDAH) aktivitesinin azaldığı ve homosisteinin bu yolla endotel-bağımlı vazodilatasyonun bozulmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (114, 115). Homosisteinin ateroskleroz gelişiminde, kolesterol seviyelerindeki yükselme ile homosistein seviyelerindeki yükselme arasında ilişki olduğu tespit edilmiş ve homosistein katabolizmasını kolaylaştıran piridoksin, folat, kobalamin, kolin, riboflavin and trokserutin gibi maddelerin plazma homosistein, kolesterol, trigliserit ve LDL düzeylerini azalttığı gösterilmiştir (116). KAH'da, toplam mortalite ile total homosistein seviyeleri arasında kademeli bir doz-yanıt ilişkisi bulunduğu ve 5 yıllık bir takip sürecinde plazma homosistein düzeyleri 9.0 µmol/L'den düşük vakalarda mortalite oranının %

3.8, 9.0-14.9 $\mu\text{mol/L}$ düzeyindeki vakalarda % 8.6 ve 15 $\mu\text{mol/L}$ 'den yüksek vakalarda ise % 24.7 olduğu tespit edilmiştir ($p<0,001$) (117).

CRP: CRP, pentraksinler ailesinin bir üyesi ve aynı zamanda bir akut faz reaktanı olan bir plazma proteindir ve ilk olarak 1930'da akut infeksiyonlu hastaların plazmalarındaki pnömokokların C polisakkaridi ile reaksiyona girdiği gösterilmiştir (118, 119). Plazmadaki CRP'nin büyük kısmı karaciğer kaynaklı olup esas olarak IL-6 ve IL-1 gibi birtakım inflamatuvar sitokinlerin regülasyonu ile sentez edilmektedir (120). CRP'nin miyokard infarktüsü, inme, periferik arter hastalığı ve ani kardiyak ölüm riskini, görünürde sağlıklı insanlarda bile kuvvetli ve bağımsız bir şekilde öngördüğü tespit edilmiştir (121). Yapılan birçok çalışmanın sonuçları, yüksek duyarlıklı CRP'nin, aterosklerozun ve vasküler ölümlerin öngörülmesinde en güçlü belirteç olduğunu göstermiştir (122-124). Kardiyovasküler olayları öngörmede inflamatuvar ve lipid belirteçlerin tümü karşılaştırıldığında, CRP'nin tüm diğer biyobelirteçlere (LDL de dahil) üstün geldiği görülmüştür (122). CRP'nin proaterojenik etkileri tablo 2.4.'te gösterilmiştir .

Tablo 2.4: CRP'nin proaterojenik etkileri – Devaraj ve ark. (125)'dan alınmıştır.

CRP'nin Proaterojenik Etkileri		
Endotelial Hücreler	Monosit-Makrofajlar	Düz Kas Hücreleri
VCAM, ICAM-1, E-selectin, MCP-1 ve monosit adezyonunu artırır	Doku faktörünü artırır	AT-1 ve vasküler düz kas hücre göçünü ve proliferasyonunu artırır
PAI-1, IL-8, CD40/CD40L, MMP-1, ET-1 ve M-CSF'yi artırır	Süperoksit ve miyeloperoksidazı artırır	In vivo neointimal formasyonu artırır
tPA'yı azaltır	Proinflamatuvar sitokinleri artırır ve IL-10'u azaltır	iNOS'u artırır
Prostasiklini azaltır	CD11b ve CCR2'yi artırır	ROT'leri artırır
Süperoksit ve iNOS'u artırır	oxLDL alımını artırır ve kolesterol atılımını (efflux) azaltır	Doku faktörünü artırır
eNOS'u (uncoupling) azaltır	MMPs ve HMGB1'i artırır	
In vivo endotelial disfonksiyonu artırır	M-CSF ve proliferasyonu artırır	
In vitro EPC sayı ve fonksiyonunu azaltır		

2.2. Serbest Radikaller, ROT ve Oksidatif Stres

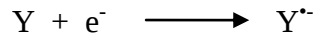
Elektronlar, atom çekirdeğinin etrafında, değişik enerji seviyelerine sahip orbital adı verilen yörüngelerde hareket etmektedirler. Her bir orbitelde en fazla iki elektron (e^-) bulunmakta ve bu e^- lar birbirlerine zıt yönde olmak üzere kendi eksenleri etrafında hareket etmektedirler. Serbest radikaller, son yörüngelerinde bir veya daha çok eşlenmemiş e^- içeren atom veya moleküllerdir. Eşlenmemiş e^- lar, serbest radikallerin artmış tepkimeye girme eğiliminden sorumludur. Serbest radikaller, atom veya molekül üzerine konulan bir nokta ile ifade edilirler ve biyolojik sistemlerde en fazla e^- transferi sırasında oluşmaktadırlar (126, 127).

Canlı organizmalarda serbest radikaller temel olarak üç yolla oluşmaktadır (127):

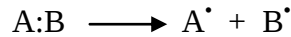
1) Radikal olmayan bir atom veya molekülün bir e^- kaybetmesi yoluyla.



2) Radikal olmayan bir atom veya molekülün bir e^- kazanması yoluyla.



3) Bir kovalent bağın yıkılması sonucu eşlenmiş elektronların her biri bir molekülde kalıyorsa radikal oluşabilir. Buna homolitik fizyon denir. Çoğu kovalent bağın yıkılması için yüksek sıcaklık gereklidir (450-600 °C). Örneğin H_2O molekülündeki O-H kovalent bağlarından biri homolitik fizyona uğradığında hidrojen radikali (H^*) ve hidroksil radikali (OH^*) açığa çıkar.



Serbest radikaller, vücuttan etkin bir şekilde uzaklaştırılmazlarsa, organizmada oksidan-antioksidan dengesinin oksidan lehine bozulması olarak tanımlanan oksidatif stres ortaya çıkar. Oksidatif stres, kimi zaman fizyolojik bir gereksinim olarak

karşımıza çıkabilirken, kimi zaman da patolojik süreçlere neden olabilmektedir. Serbest radikaller, proteinleri denatüre ederek, nükleik asitleri hasara uğratarak ve lipid peroksidasyonuna neden olarak, sonuçta hücrede yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olarak doku hasarı ve hücre ölümüne sebep olabilmektedirler. Serbest radikal hasarının kardiyovasküler ve inflamatuvar hastalıklar, kanser, DM, nörodejeneratif hastalıklar, respiratuvar sistem hastalıkları, otoimmün hastalıklar, yaşlanma ve infertilite gibi pek çok hastalığın etiyolojisinde yer aldığına dair çok sayıda kanıt bulunmaktadır (126-130).

2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

Oksijenin (O_2) elektronik düzenine bakılacak olursa π 2p orbitalinde paralel dönüşü sahip 2 adet eşlenmemiş e^- 'u olduğu görülmektedir ve bu O_2 'nin en stabil durumudur (temel durum: ground state). Bu yapısı nedeniyle moleküler O_2 ($\cdot O-O\cdot$), diradikal olarak adlandırılır ve diradikal özelliğinin bir sonucu olarak da yüksek derecede ROT (tablo 2.5) oluşturma ve okside edici ajan olarak görev alma eğilimindedir (127). Serbest radikallerden fizyolojik olaylarda ve oksidatif strese en fazla rol alanlar ROT'dir (131).

Tablo 2.5: Çeşitli reaktif oksijen türleri (ROT) – Sözman (126)'den alınmıştır.

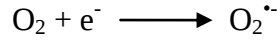
Radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$)	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$)	Singlet oksijen (1O_2)
Alkoksil radikali ($RO^{\cdot}$)	Ozon (O_3)
Semikinon radikali ($HQ^{\cdot}$)	Hipokloröz asit (HOCl)
Organik peroksit radikali ($RCOO^{\cdot}$)	Azot dioksit (NO_2)
Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$)	Peroksinitrit ($ONOO^-$)

2.2.1.1. Singlet Oksijen (O-O:) (¹O₂)

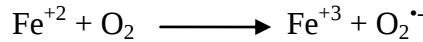
¹O₂, moleküler oksijenin daha reaktif bir türü olarak bilinir ve enerji yüklemeye ulaşabilmektedir. ¹O₂ durumu, temel duruma göre 22,4 kcal daha fazla enerjiye sahiptir. ¹O₂ radikal olarak sınıflandırılmaz, çünkü eşlenmemiş e⁻'a sahip değildir. Fakat e⁻ yörünge dönüşü kısıtlaması ortadan kalktığından ¹O₂ oldukça oksidan bir hal almaktadır (127). Deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA), proteinler, lipidler, kolesterol ve steroller, tokoferoller, glutatyon, askorbik asit, beta karoten, NAD⁺/NADH ve NADP⁺/NADPH gibi pek çok molekülle tepkimeye girebilmektedir (132).

2.2.1.2. Süperoksit Radikali (O₂^{•-})

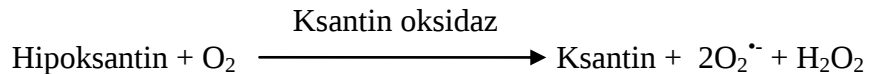
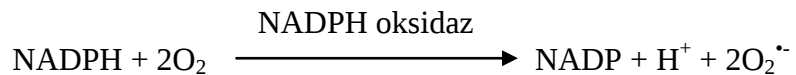
Temel durum oksijene bir e⁻ eklenirse O₂^{•-} oluşur ve hemen hemen tüm aerobik hücrelerde oluşan ilk O₂ radikalidir.



İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu ile de O₂^{•-} oluşabilmektedir.



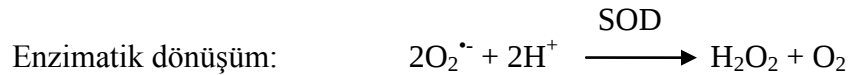
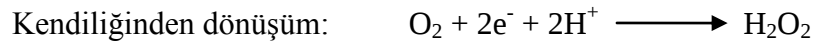
O₂^{•-} çok güçlü bir radikal değildir, ancak oluşumlarına neden olduğu diğer güçlü radikallerle birlikte canlılarda genel bir oksitleyici gibi davranmaktadır (127). Canlılarda çok çeşitli yollarla O₂^{•-} oluşabilmektedir. Dehidrogenazlar ve oksidazlar gibi pek çok enzimin, örneğin ksantin oksidaz ve NADPH oksidazın katalizlediği tepkimeler sonucunda O₂^{•-} oluşabilmektedir (133).



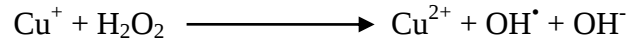
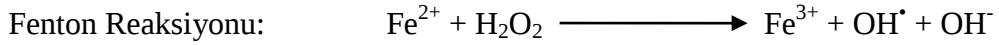
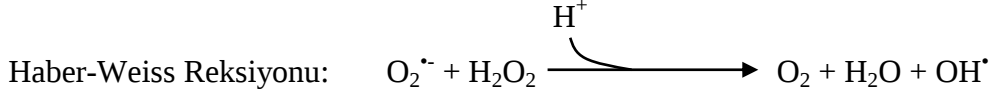
Çok önemli $O_2^{\bullet-}$ kaynaklarından birisi de mitokondriyal e^- taşınmasıdır. Mitokondriyal solunum zincirinde, sitokrom oksidaz öncesindeki basamaklarda bazı elektronlar doğrudan O_2 'ye sızarlar ve $O_2^{\bullet-}$ oluşumuna neden olurlar (134). Ayrıca insanlarda eritrositlerdeki hemoglobinin her gün % 3'lük bir kısmı otooksidasyona uğrayarak methemoglobine dönüşmekte ve bu dönüşüm sırasında da çok miktarda $O_2^{\bullet-}$ oluşmaktadır (135). Yine, dopamin, epinefrin, norepinefrin gibi monoaminlerin, ve flavinlerin otooksidasyonları sonucunda, sitokrom P-450 enziminin O_2 'yi indirgemesiyle ve arginin veya tetrahidrobiyopterin eksikliğinde nNOS veya eNOS tarafından O_2 'nin indirgenmesi gibi daha pek çok yolla $O_2^{\bullet-}$ oluşmaktadır (136). $O_2^{\bullet-}$, nitroblue tetrazolium'u (NBT^{2+}) mavi renkli formazan'a indirger ve $O_2^{\bullet-}$ 'nin sitokrom c ve NBT indirgeme özelliği SOD aktivite ölçümünde kullanılmaktadır (127).

2.2.1.3. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

H_2O_2 , eşlenmemiş elektronu olmadığından bir serbest radikal değildir, fakat serbest oksijen radikali üretimine neden olan moleküllerden biridir. Ayrıca, lökositlerde miyeloperoksidaz aracılığıyla oldukça güçlü bir oksidan madde olan hipoklorik asite ($HOCl$) çevrilmektedir (137). H_2O_2 , oksijenin enzimatik olarak iki e^- la indirgenmesi sonucunda oluşabildiği gibi, $O_2^{\bullet-}$ 'lerin enzimatik veya nonenzimatik (spontan) dismutasyonu sonucunda da oluşabilmektedir. Aerobik canlılarda $O_2^{\bullet-}$ 'lerin H_2O_2 'ye çevrilmesi SOD enzimi tarafından katalizlenir ve nötral pH'da bu enzimatik dismutasyonun çok daha hızlı olması nedeniyle SOD, antioksidan savunma sistemi açısından oldukça önemli bir enzimdir. SOD olmaksızın, hafif asidik pH'da bu dönüşüm kendiliğinden de gerçekleşebilmektedir (127, 138).



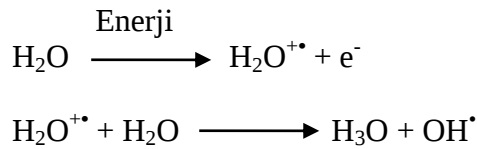
H₂O₂'nin asıl önemi, O₂^{•-} (Haber-Weiss Reaksiyonu) veya Fe ve Cu gibi metal iyonları ile (Fenton Reaksiyonu) reaksiyona girerek en reaktif ve zararlı serbest oksijen radikali olan OH[•] oluşturmak üzere yıkılabilmesinden kaynaklanmaktadır (127).



2.2.1.4. Hidroksil radikali (OH[•])

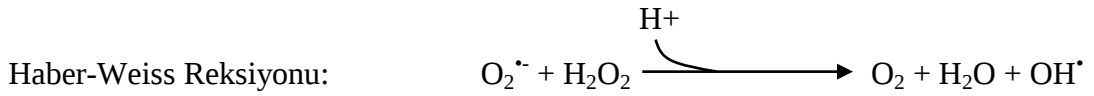
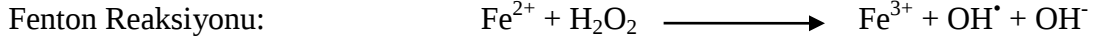
ROT içerisindeki en güçlü radikal OH[•]'dir ve yarılanma ömrü çok kısadır. Nükleik asitler, lipidler, proteinler ve karbonhidratlar gibi çok sayıda molekülle reaksiyona girebilmektedir. Çok reaktif bir molekül olduğundan lipid peroksidasyonuna, DNA'ya etkileri sonucunda baz modifikasyonlarına, zincir kırıklarına, baz delesyonlarına ve protein fragmentasyonuna neden olmaktadır. Biyolojik sistemlerde OH[•] başlıca iki mekanizma ile oluşabilmektedir (127, 139):

1) İyonlaştırıcı radyasyonun etkisi ile sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması gerçekleşmektedir. Bu tepkimeler çok kısa sürede gerçekleşmektedir ve üretilen OH[•], radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.

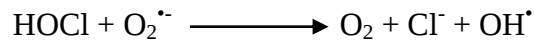
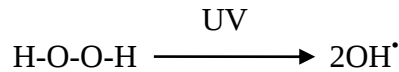


2) H₂O₂'nin homolitik fizyonu ile OH[•] yapımı, vücutta bu radikalin en önemli oluşum kaynağıdır. H₂O₂'nin iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektron ile indirgenmesi OH[•] yapımına neden olur. Bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Oksitlenen metal iyonları, askorbik asit ve O₂^{•-}

gibi indirgeyici bileşiklerin bulunduğu ortamlarda tekrar indirgendiğinden, H_2O_2 'den $OH^\bullet$ yapımı sürekli bir hale gelmektedir. $O_2^{\bullet-}$ hem H_2O_2 'nin öncülü, hem de metalleri indirgeyici bir özelliğe sahiptir. Bu nedenle proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına da neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda $O_2^{\bullet-}$ oluşumunun arttığı ortamlarda $OH^\bullet$ üretimi kaçınılmaz bir hal almaktadır.



Diğer $OH^\bullet$ oluşum kaynaklarına örnek olarak, ultraviyole (UV) ışınları ile uyarılmış homolitik fizyonla H_2O_2 (H-O-O-H)'nin O-O bağlarının yıkılması yoluyla oluşumu, hipoklorik asidin $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyonu sonucu oluşumu, ultrasonografi (USG) ile akışkan sıvılarda hidrojen atomları ile birlikte oluşumu, ESWL (Extracorporeal shock wave lithotripsy) ile böbrek taşı kırılması sonucu verilen yüksek enerji sonucunda oluşumu ve dondurma, kurutma ve dondurma-kurutma (liyofilizasyon) işlemleri sonucunda oluşumu örnek olarak verilebilmektedir (127).

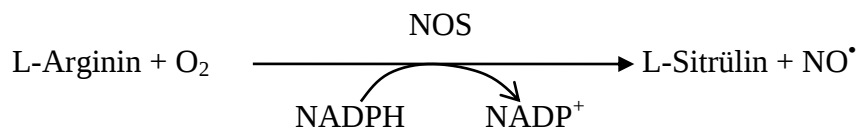


$OH^\bullet$ başlıca, elektron transferi tepkimeleri, organik moleküllerden H^+ alarak su oluşturduğu hidrojen çıkarma tepkimeleri ve özellikle pürin bazları, primidin bazları ve aromatik aminoasitler gibi elektronlarca zengin moleküllere katılım yoluyla gerçekleştirdiği katılma tepkimeleri olmak üzere üç tür tepkimeye girmektedir. Tüm bu tepkimelerin temelinde $OH^\bullet$ 'nin eşlenmemiş e^- içeren dış yörüngesinin e^- alma ilgisi yer almaktadır (127, 139).

2.2.1.5. Nitrik Oksit (NO[•])

1980 yılında Furchgott ve Zawadski isimli araştırmacılar, asetil kolin uyarısıyla endotel hücrelerince üretilen ve damar düz kasını gevşetici özelliği bulunan bir madde bulduklarını bildirmişlerdir. Bu maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ismi verilmiştir. 1987 yılında ise Palmer ve arkadaşları, EDRF'nin aslında NO[•] adında bir molekül olduğunu bulmuşlardır (140-143).

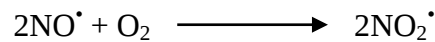
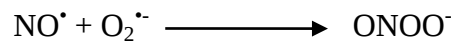
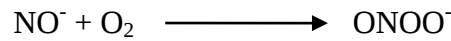
NO[•] (resmi adı nitrojen monooksit) renksiz bir gazdır. Suda orta derecede çözünür ve organik çözücülerde daha iyi çözünür. Bu nedenle NO[•] hücre içi ve dışı arasında rahatça difüze olabilmektedir. NO[•] $\pi 2p$ orbitalinde eşlenmemiş bir e⁻ taşımaktadır. Bu nedenle diatomik yapıda bir serbest radikaldir ve hem fizyolojik hem de patofizyolojik süreçlerde önemli bir role sahiptir. Organizmamızda, endojen olarak L-arginin ve O₂'den, NOS (EC 1.14.13.39) enzimi kataliziyle sentezlenmektedir. Bu reaksiyon için ortamda O₂ ile beraber NADPH, flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN), tetrahidrobiopterin, hem ve kalmodulin gibi bazı diğer kofaktörlerin de bulunması gerekmektedir. NOS üç farklı izoforma sahiptir. NOS izoformları ve özellikleri tablo 2.6'da görülmektedir (127, 144-146).



Tablo 2.6: NOS izoformları ve özellikleri – Özkan ve ark. (145)'dan alınmıştır.

Nitrik Oksit Sentezleyen Enzimler						
NOS İzoform	Diğer Adı	Salınım	Kaynak	Regülasyon	NO [•] Miktarı	Kromozom
Tip I	nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (picomol)	12
Tip II	iNOS	İndüklen- diğinde	Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler, hava yolu epiteli	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlar tarafından indüklenme	Yüksek (nanomol)	17
Tip III	eNOS	Devamlı	Vasküler endotel hücreleri, plateletler, miyokard ve endokard, mast hücreleri, nötrofiller	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (picomol)	7
NO [•] : nitrik oksit, NOS: nitrik oksit sentezleyen enzim, nNOS: nöral NOS, iNOS: indüklenebilen NOS, eNOS: endotel kökenli NOS						

NO[•]'nun bir e⁻ oksidasyonu ile nitrozonyum katyonu meydana gelir (NO⁺). Bir e⁻ indirgenmesiyle nitroksil anyonu oluşur (NO⁻). NO⁻ reaktiftir, doğrudan NO[•] ile tepkimeye girerek nitroz oksit (N₂O) ve OH[•] oluşturur. NO⁻, O₂ ile tepkimeye girerek oldukça reaktif bir oksidan molekül olan peroksinitriti (ONOO⁻) meydana getirir. Ayrıca NO[•], O₂⁻ ile reaksiyona girerek inaktif edilmekte ve yine ONOO⁻ oluşmaktadır. NO[•], O₂ ile tepkimeye girerek nitrojen dioksiti de (NO₂[•]) meydana getirmektedir (127, 147).

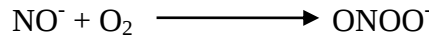
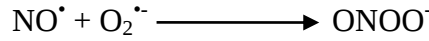


NO^{*} çeşitli geçiş metallerine bağlanabilmektedir. Pek çok fizyolojik etkisi guanilat siklaz enzimidaki Fe²⁺,ye bağlanmalarla oluşur. Vasküler endotel hücreleri tarafından sentezlenen NO^{*} endotel altındaki düz kas tabakasına ulaştığında guanilat siklaza bağlanır ve aktive eder. Bu sayede siklik guanozin mono fosfat (cGMP) üretimi artar, hücre içi serbest Ca²⁺ azalır ve kası gevşeterek damarı genişletir ve kan basıncını düşürür. Meydana gelen bu olaylar, düz kas kasılması, vasküler tonüs ve kan akışının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (144). NO^{*} aynı zamanda trombositlerdeki çözülebilir guanilat siklaz aktivitesini de artırarak trombositlerin adezyon ve agregasyonunu azaltmaktadır. Bununla birlikte, mikroorganizmaların mitokondriyal proteinlerine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip, DNA sentezini bozarak ölümlerine yol açmakta ve savunma sisteminde de rol oynamaktadır (145). NO^{*}'nun yarılanma ömrü oldukça kısadır ve hızla okside olarak nitrit (NO₂⁻) ve nitrata (NO₃⁻) dönüşmektedir. NO^{*}, Fe²⁺ ile ve ferröz bileşenlerle stabil kompleksler oluşturmaktadır. In vivo üretilen NO^{*}'nun büyük kısmı hemoglobinin hem gruplarıyla etkileşimi sonucunda kaybedilmektedir. Bu bağlanma, O₂'ye göre 3000 kat daha hızlıdır ve bu kadar hızlı inaktive olması belki de NO^{*}'nun etkilerini lokalize kılan en önemli faktördür (127, 145, 147).

NO^{*} sentezinde görev alan NOS'lar, pek çok dokuda bulunmakla birlikte, sinir sistemi ve kardiyovasküler sistemde oldukça önemli görevlere sahiptirler. eNOS ve nNOS enzimlerince üretilen çok düşük miktardaki NO^{*}, sinir sistemi ve vasküler düz kaslarda, hücre içi ve hücreler arası haberci molekül olarak kullanılmaktadır. Bu Ca⁺² ve kalmodulin bağımlı iki form, esas izoformlardır ve sitoplazmik guanilat siklazı aktive ederek hücrelerde cGMP derişimini artırmaktadırlar. cGMP ise çeşitli enzimler aracılığıyla hücre içi Ca⁺² konsantrasyonlarının düzenlenmesini sağlamaktadır. iNOS izoformu ise aktive makrofajlar, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler ve hava yolu epiteli gibi çok çeşitli hücrelerde bulunmakta ve sentezi TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinler, bakteriyel toksinler ve oksidan moleküller tarafından indüklenmektedir. iNOS enziminin aktivitesi Ca⁺²dan bağımsızdır ve kontrol edilememektedir. Eğer ortamda arginin bulunmaya devam ederse, sürekli aktif halde kalır. Bu nedenle de uzun süreli ve yüksek konsantrasyonda NO^{*} sentezine yol açabilmektedir (148, 149).

2.2.1.6. Peroksinitrit (ONOO⁻)

ONOO⁻, NO[•]'nun O₂^{•-} ile veya NO[•]'nun O₂ ile tepkimeye girmesi sonucu oluşan, oldukça reaktif bir oksidan moleküldür. Resmi adı oksoperoksinitrat'tır. Peroksinitrit, fizyolojik pH'da hızla peroksinitrik asite protonlanır (HO-O-N=O) ve bu molekül de homolitik fizyonla OH[•] ve NO₂[•] oluşturmaktadır. (127, 147).

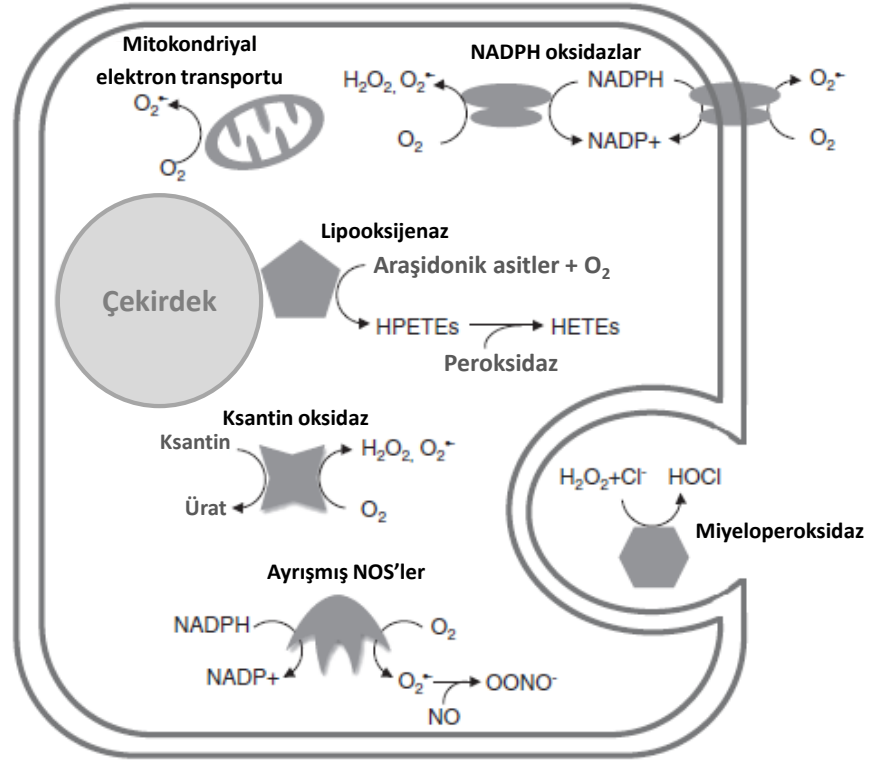


ONOO⁻, ayrıca OH[•] benzeri bir aktiviteye sahiptir ve zincir radikal tepkimelerini başlatmaktadır. ONOO⁻'in olumsuz etkilerinden birisi de biyomoleküllerin nitrasyonuna neden olmasıdır. ONOO⁻, NO[•] toksisitesinin ana sorumlusudur. Proteinler üzerine doğrudan zararlı etkileri bulunmaktadır ve NO₂[•], OH[•], nitronyum iyonu (NO₂⁺), peroksinitrik asit (ONOOH) gibi toksik ürünlere dönüşebilmektedir. Ayrıca, DNA'da kırılmalara ve lipid peroksidasyonuna da neden olmaktadır. ONOO⁻, NO[•] radikalinin stabil son ürünleri olan NO₂⁻ ve NO₃⁻'e metabolize edilmektedir. NO[•] ile O₂^{•-}'nin birleşmesiyle oluşan ONOO⁻'nin zararlı etkileri, ONOO⁻'nin tekrar NO[•] ile tepkimeye girmesi sonucunda azaltılabilmektedir. NO[•] ayrıca peroksil ve alkoksil gibi radikalleri de toplayabilme özelliğine sahiptir (127, 147, 150).

2.2.2. ROT Kaynakları

Günlük tükettiğimiz O₂'nin ortalama % 3-5'lik bir kısmı serbest oksijen radikallerine dönüşmekte ve bu durum hücrelerde sabit bir ROT kaynağı oluşturmaktadır. Bu ROT'nin bazıları, oksidasyon reaksiyonları gibi normal enzimatik reaksiyonların oluşumu esnasında metal içeren enzimlerin aktif bölgelerinden kazara sızmaları sonucu oluşmaktadır. Bunların dışında H₂O₂ gibi, peroksizomlarda oksidazlar tarafından üretilen, fizyolojik rolleri bulunan moleküller de ROT kaynaklarındandır. İnflamatuvar yanıt durumlarında da toksik serbest radikallerin, planlı bir üretimi söz konusudur. Bunların dışında çok çeşitli ilaçlar, doğal radyasyon, hava kirliliği (azot

dioksit, ozon ve sülfür dioksit gibi gazlar), sigara ve diğer yollarla toksik tütün kullanımı, alkol kullanımı, pestisitler, çeşitli metaller (kurşun, civa, arsenik, alüminyum ve kadmiyum gibi) ve çeşitli kimyasalların (CCl_4 , halojenlenmiş hidrokarbonlar, difenoller ve kinonlar gibi) etkileriyle de, hücrelerde ROT üretiminde artış olmaktadır (126, 151).



Şekil 2.1: KVH'lar ile ilişkili olduğu bilinen bazı ROT ve oluşum yolları – Sugamura ve ark.(152)'dan alınmıştır.

ROT, çoğunlukla mitokondride elektron transport zincirinde yer alan NAD^+ , FAD ve koenzim Q (KoQ) gibi pek çok bileşiğin O_2 ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen elektron sızmaları nedeniyle oluşmaktadır. Bunlar arasında da en çok O_2^- üretimi artmaktadır ve bu olay tek değerli oksijen kaçağı olarak bilinmektedir. Bununla beraber çok sayıda anabolik ve katabolik reaksiyonlar sonucunda da ROT üretimi gerçekleşmektedir. Hücrelerde, O_2 kullanan tepkimeleri katalizleyen çok sayıda oksidaz, peroksidaz ve oksijenaz sınıfında enzim bulunmaktadır ve bu enzimler O_2 'ye çeşitli metaller aracılığıyla e^- aktarmaktadırlar. Reaksiyonlardan

sızma şeklinde oluşan ROT'nin ana kaynaklarından birisi sitokrom P450 enzimleridir. P450 enzimlerinin alkol, ilaçlar ve kimyasal toksinler ile indüksiyonu hücrel hasarın artışına yol açmaktadır. H_2O_2 ve lipid peroksitler; peroksizomlar, mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunan oksidazlar tarafından enzimatik olarak üretilen ana reaksiyon ürünleridirler. Örneğin monoamin oksidaz (MAO), çeşitli nöronların mitokondri membranlarında, bir nörotransmitter olan dopamini oksidatif olarak parçalayarak H_2O_2 üretmektedir. Peroksizomal yağ asidi oksidaz enzimi, çok uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonu esnasında, $FADH_2$ 'den daha çok H_2O_2 oluşumuna neden olmaktadır. Ayrıca lipid peroksitler de ara ürünler olmak üzere, lökotrienler ve prostaglandinler gibi pek çok eikozanoidin sentez yollarında, enzimatik olarak üretilmektedirler. Bunların dışında; ksantin oksidaz, triptofan deoksijenaz, siklooksijenaz ve lipooksijenaz gibi çok sayıda enzimin katalitik döngüsü sırasında da ROT ortaya çıkmaktadır (126, 151).

Ksantin dehidrogenaz (KD) (ksantin: NAD oksidoredüktaz, EC 1.1.1.204) / ksantin oksidaz (KO) (ksantin: oksijen oksidoredüktaz, EC 1.2.3.22), insanlarda pürin katabolizmasının son iki basamağında yer alan, hipoksantin ve ksantin de ürik aside dönüşüm reaksiyonlarını katalizlemektedir. Memelilerde bu enzim KD olarak sentezlenmekte, dokularda esas olarak bu formu bulunmakta ve e^- alıcısı olarak NAD^+ kullanılmaktadır. KD formu ROT oluşumuna neden olmamaktadır. Hipoksi veya iskemi gibi patolojik durumlarda doku perfüzyonu bozulmakta ve yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı sonucu dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitleri birikmektedir. Bu enzim, hipoksi veya iskemi varlığında, hücre içinde azalan O_2 ve artan Ca^{+2} konsantrasyonu varlığında proteolize uğrayarak yapısındaki sülfidril bakiyelerinin oksidasyonu ya da proteolizi sonucu, hızla ve geri dönüşümsüz olarak KO formuna dönüşmektedir. Doku yeniden oksijenlenmediği sürece ROT oluşumu gerçekleşmemektedir. İskemi sonrası doku reperfüzyonu gibi uygun şartların olduğu durumlarda ise KO formu e^- alıcısı olarak O_2 kullanılmaktadır ve önemli miktarda $O_2^{\bullet-}$ ile H_2O_2 oluşturmakta ve böylece doku hasarına katkıda bulunmaktadır. KO, özellikle intestinal mukoza ve endotel hücrelerinde görülen iskemi-reperfüzyon hasarına yol açan ana etkenlerden biri olarak gösterilmektedir. İnsanlarda en çok hepatosit sitoplazmasında, vasküler endotel hücrelerinde ve meme

epitelinde bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar, KO aktivitesinin kardiyovasküler hastalıklarda, kalp yetmezliğinde, iskemi-reperfüzyon sonrası durumlarda, solunum yetmezliğinde, viral enfeksiyonlarda, termal streste, hemorajik şokta ve daha pek çok durumda arttığını göstermektedir. KO, hem antioksidan bir molekül olan ürik asitin üretimine, hem de ROT oluşumuna neden olabildiğinden, canlılarda oksidan/antioksidan sistem dengesi üzerinde önemli bir yere sahiptir (151, 153-159).

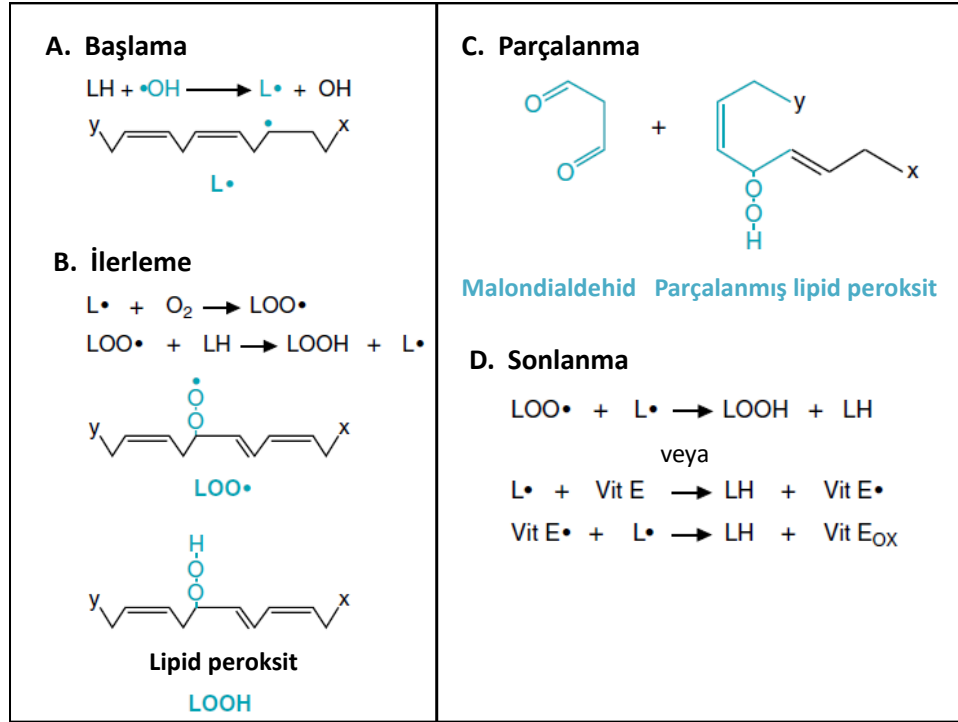
ROT'nin diğer bir kaynağı da; aktif makrofajların, nötrofillerin ve eozinofillerin, fagositik solunumsal patlama sırasında, membran ve sitoplazmalarında bulundurdıkları NADPH oksidaz ve miyeloperoksidaz gibi enzimleri ile H₂O₂ ve HOCl gibi güçlü reaktif molekülleri oluşturmalarıdır. Bu ROT, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek çeşitli mikroorganizmaları, tümör hücrelerini ve ortadan kaldırılması gereken diğer hücreleri etkileyen toksik maddeler oluşturmaktadırlar (151).

2.2.3. ROT'nin Etkileri

ROT, reaktif yapıları nedeniyle başta lipidler, nükleik asitler ve proteinler olmak üzere, tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilme ve onlara zarar verebilme özelliğine sahiptirler (151, 160).

2.2.3.1. ROT'nin Lipidler Üzerine Etkileri ve Lipid Peroksidasyonu

ROT, özellikle LDL olmak üzere lipoprotein oksidasyonuna neden olarak, ox LDL gibi ateroskleroz patogenezinde oldukça önemli moleküllerin oluşumuna yol açmaktadırlar (62). ROT'nin lipidler üzerindeki en önemli etkilerinden biri de lipid peroksidasyonunun uyarılmasıdır. Memeli hücre membranları, peroksidatif hasara karşı oldukça duyarlı olan çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA) içermektedir. Lipid peroksidasyonu, serbest radikallerce başlatılan ve hücre membranlarında bulunan ÇDYA'nın oksidasyonuna yol ačan, zincir tepkimeleri şeklinde süren kimyasal bir olaydır (126, 160).



Şekil 2.2: Lipid peroksidasyonu: Bir serbest radikal zincir reaksiyonu – Smith ve ark. (151)’dan alınmıştır.

Lipit peroksidasyonu başlama, ilerleme, parçalanma ve sonlanma olmak üzere dört temel aşamadan oluşmaktadır (Şekil 2.2) (151) ve var olan bir serbest radikal (başlıcaları $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{OH}^{\cdot}$, $\text{ROO}^{\cdot}$ ve $\text{RO}^{\cdot}$), ışık veya metal iyonları ile (135, 160), ÇDYA zincirinin (LH) çift bağlarındaki α -metilen gruplarından hidrojen atomlarının çıkarılması ve bu işlem sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali ($\text{L}^{\cdot}$) özelliği kazanmasıyla başlamaktadır (160). $\text{L}^{\cdot}$, dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Önce molekül içi çift bağ aktarılması ile (rezonans) dien konjugatı oluşup, daha sonra O_2 eklenmesiyle hızlı bir şekilde peroksil formuna ($\text{LOO}^{\cdot}$) dönüşmektedir. Diğer ÇDYA yan zincirleri ile tepkimeye giren $\text{LOO}^{\cdot}$, hidrojen atomlarını çıkarıp kendi yapısına almakta, LOOH formuna dönüşmekte ve yeni reaksiyonların başlamasına neden olan $\text{L}^{\cdot}$ bileşiklerinin tekrar oluşumuna yol açmaktadır. Bu serbest radikaller ise ya kendi aralarında birleşerek ya da ortamda bulunan E vitamini gibi bir antioksidan molekülle reaksiyona girerek radikal olmayan bir yapıya dönüşürler (126, 151, 160).

LOOH bileşiklerinin etan, pentan ve MDA gibi bileşiklere dönüşmeleriyle lipid peroksidasyonu reaksiyonları sona ermektedir. MDA, sadece üç veya daha çok çift bağ taşıyan yağ asitleri tarafından üretilmektedir. MDA, $\omega 3$ yağ asitlerinin uç iki karbonundan üretilen etan ve $\omega 6$ yağ asitlerinin uç beş karbonundan üretilen pentan gibi moleküllerle birlikte lipid peroksidasyonunun bir ölçütü olarak kullanılmaktadır (135, 151).

LOOH yapısındaki ve MDA gibi aldehit yapısındaki moleküllerin derişimleri arttıkça membranların akışkanlıkları azalmakta, lipidlerin moleküler yapıları bozulmakta, membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyonlar oluşmakta, transport sistemi etkilenmekte, Ca^{+2} gibi iyonların hücre içine geçişi kolaylaşmakta ve hücre işlevlerinde bozukluklar ortaya çıkmaya başlamaktadır. Özellikle mitokondri membranının yapısı bozulduğunda, çok daha fazla serbest radikal üretimi gerçekleşmektedir. MDA ve benzer yapıdaki aldehit moleküller en toksik olan lipid peroksidasyon ürünleridir ve diğer hücre bölümlerine de yayılarak hasara neden olmaktadır. MDA kanda ve idrarda bulunmaktadır ve serbest radikal hasarının bir belirleyicisi olarak kullanılmaktadır (127, 151, 160).

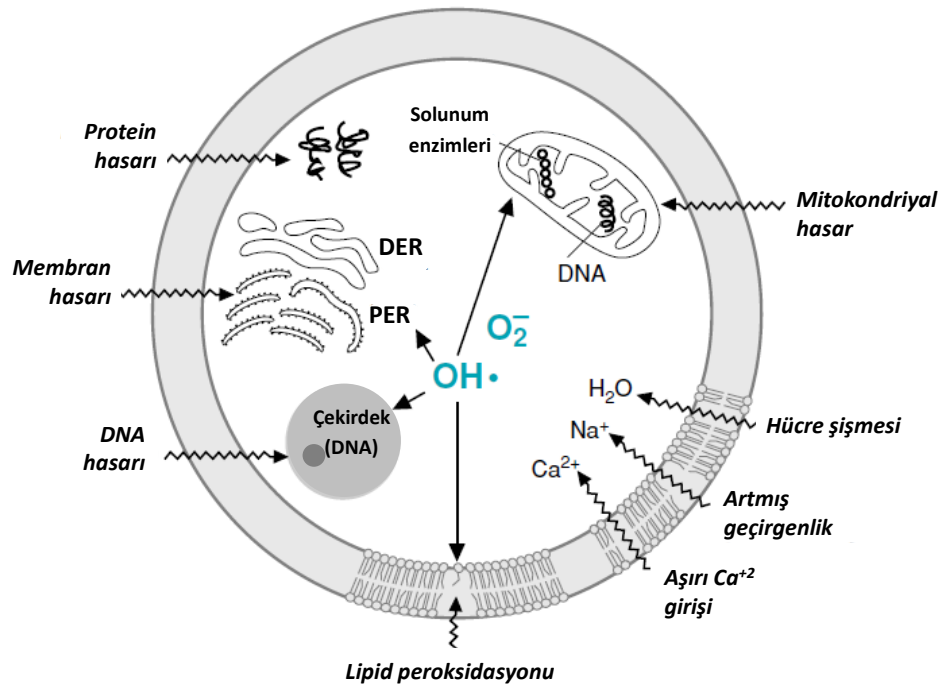
2.2.3.2. ROT'nin Proteinler Üzerine Etkileri

ROT, özellikle serbest radikal yapısında olanlar, proteinler üzerinde doğrudan veya dolaylı yoldan etki gösterebilmektedirler. Prolin, lizin, histidin, arginin, sistein ve metiyonin gibi amino asitler ile peptid bağları serbest radikal hasarına açıktır. Bu etkiler sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşmaktadır. $OH^{\bullet}$ radikalleri, peptid bağlarında ve aminoasitlerde hidroksilasyona neden olarak onların yapı ve fonksiyonlarını bozarak denatürasyona, enzim inhibisyonlarına ve proteolitik yıkıma neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonunun MDA gibi aldehit yapısındaki ürünleri de, sisteinin sülfidril gruplarıyla veya lizin ve histidinler ile kovalent bağlar oluşturarak proteinlerde parçalanma ve çapraz bağlanmalara yol açmakta, membran iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitelerinin değişmesine neden olmaktadır. Bir tripeptid olan glutatyonun (GSH) (γ -glutamil-sisteinil-glisin) sistein amino asidindeki sülfidril bakiyelerinin serbest radikal

saldırısına ve oksidasyona uğraması, hücrelerdeki oksidatif hasarın artmasına neden olmaktadır. Çünkü glutatyon serbest radikallere karşı hücre savunmasında görevli ana moleküllerden birisidir ve glutatyonun oksidasyonu, onun koruyucu etkilerini baskılamaktadır (127, 129, 151, 160).

2.2.3.3. ROT'nin Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

ROT'nin etkileri ile çeşitli proteazların aktivasyonu sonucu proteolitik etki şiddetlenmekte, katabolik enzimlerin aktiviteleri artmakta, apoptoz hızlanmakta ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmaları oluşmaktadır. Serbest radikaller ve özellikle MDA, 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ve aldehit yapısındaki diğer bileşikler, membranlardan kolaylıkla geçerek, DNA yapısında yer alan bazlarla reaksiyona girerek baz değişimleri veya zincir kopmaları sonucu kromozomal yapıda değişiklikler oluşturmakta ve sitotoksik, mutajenik, karsinojenik ve genotoksik etkiler göstermektedirler (126, 127, 147).



Şekil 2.3: ROT aracılı hüresel hasar. DER: Düz endoplazmik retikulum, PER: Pürüzlü endoplazmik retikulum – Smith ve ark. (151)'dan alınmıştır.

2.2.3.4. ROT'nin İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

ROT, dokular üzerine gösterdikleri olumsuz etkilerinden dolayı pek çok hastalığın ve patolojik durumun ortaya çıkmasına neden olmaktadır. ROT ile ilişkili bu patolojik durumlar oldukça geniş bir yayılım göstermektedir (tablo 2.7).

Tablo 2.7: ROT ile ilişkili bazı patolojik durumlar ve hastalıklar – Smith ve ark. (151), Valko ve ark. (147), Aruoma (139) ve McCord (131)'dan alınmıştır.

* KARDİYOVASKÜLER HASTALIKLAR	* İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI
- Ateroskleroz - HT - Alkolik kardiyomiyopati	- Adriyaminin kardiyotoksitesi - Keshan Hastalığı (Selenyum Eksikliği)
* NÖROLOJİK HASTALIKLAR	- İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonucu Oluşan İnmeler - İskemi-Reperfüzyon Hasarı Sonucu Oluşan Miyokard İnfarktüsü
* İNFLAMATUVAR/İMMÜN HASAR	* SOLUNUM SİSTEMİ HASTALIKLARI
- Alzheimer Hastalığı - Parkinson Hastalığı - Multiple Skleroz - Hiperbarik Oksijen Tedavisi Toksisitesi	- Amfizem - Hipoksi - Bronşitler - Bronkopulmoner Displazi
- Amiyotrofik Lateral Skleroz - Hipertansif Serebrovasküler Hasar - Kas distrofileri	- Respiratuvar Distres Sendromları - Pnömonozlar - Sigara Dumanı Etkileri - Bleomisin Toksisitesi
* YAŞLANMA	* MALİGN HASTALIKLAR
- Romatoid Artrit - Glomerülonefritler - Vaskülitler	- Otoimmün hastalıklar - Sistemik Lupus Eritematozis
* ERİTROSİT İLE İLGİLİ HASTALIKLAR	- Akciğer Kanseri - Kolon Kanseri - Mide Kanseri
- Fankoni Anemisi - Orak Hücreli Anemi - Sıtma	- Favizm - Protoporfirin Fotooksidasyonu
* DERİ HASTALIKLARI	- Meme Kanseri - Serviks Kanseri - Lösemiler
* BÖBREK HASTALIKLARI	* DİYABETES MELLİTUS
- Akut Böbrek Yetmezliği - Otoimmün Nefrotik Sendromlar	* GÖZ HASTALIKLARI
- Aminoglikozid Nefrotoksitesi - Metal iyonları aracılı nefrotoksiste	- Retrolental Fibroplazi - Oküler Hemoraji - Katarakt Oluşumu - Işık retinopatisi
	- Dejeneratif Retinal Hasar - Prematüre Retinopatisi
	* GASTROİNTESTİNAL SİSTEM HAST.
	- İntestinal İskemi - Alkolik Karaciğer Hastalığı - Gastrik Ülser
	- Oral demir zehirlenmesi - Serbest Yağ Asidi Aracılı Pankreatit

ROT, organizmada gösterdiği olumsuz etkilerinin yanı sıra, bir çok fizyolojik olayda da yer almaktadır. Çeşitli mikroorganizmaların, tümör hücrelerinin ve ortadan kaldırılması gereken diğer hücre ve yapıların, aktive olmuş makrofajlar ve nötrofiller gibi hücrelerce fagosit edildiklerinde meydana gelen solunum patlaması sırasında büyük miktarlarda ROT açığa çıkmaktadır. Ayrıca ROT, hücresel haberciler olarak, hücresel sinyallerin iletiminde, hücrelerin büyüme ve farklılaşmalarında oldukça önemli rollere sahiptirler. Bu duruma ROT ile indüklenmiş MAPK (mitojenle aktive edilmiş protein kinase) sinyal yolları örnek olarak verilebilmektedir. Olumlu etkilerine başka bir örnek de NO'dur. NO bir ROT olmasına karşın, damar tonusunu ayarlama, trombosit kümelenmesini engelleme ve vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmalarını engelleme gibi pek çok olumlu role sahiptir (52, 147, 151).

2.3. Antioksidan Savunma Sistemi

Oksijen toksisitesine karşı savunma sistemlerimiz antioksidan enzimler, besinsel ve endojen antioksidanlar (serbest radikal temizleyicileri), hücresel bölmelendirme, metal sekestrasyonu ve hasarlanmış hücre bileşenlerinin tamiri gibi çeşitli kategorilere ayrılmaktadır. Antioksidan enzimler, ROT'yi ve serbest radikal zincir reaksiyonları sonucu oluşan hücresel ürünleri toksik olmayan ürünlere çevirmek için onlarla reaksiyona girmektedirler. E vitamini ve flavonoidler gibi besinsel antioksidanlar ve ürat gibi endojen antioksidanlar da serbest radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırabilmektedirler (147, 151).

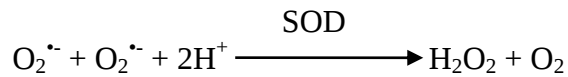
Hücresel bölmelendirmede ise, ROT üretimi, hücre içinde belirli bölgelerde yoğunlaşmaktadır. Örneğin, H₂O₂ üreten enzimlerin çoğu peroksizomlarda toplanmıştır ve peroksizomlar aynı zamanda yüksek miktarda antioksidan enzim içeriğine de sahip bulunmaktadırlar. Metal sekestrasyonu yoluyla ise, metallerin kanda ve hücrelerde çok sayıda proteinle bağlı halde tutularak Fenton reaksiyonuna girmeleri engellenmektedir. Bu duruma demirin, depo proteini olan ferritine sıkıca bağlı olması ve H₂O₂ ile reaksiyona girmesinin engellenmesi örnek olarak verilebilmektedir (127, 151).

Hasarlanmış hücre bileşenlerinin tamirine örnek olarak ise, DNA'da oksidatif hasar sonucu meydana gelen bozuklukların baz eksizyonu (BER- Base Excision Repair), nükleotid eksizyonu (NER-Nucleotide Excision Repair) ve uyumsuzluk onarımı yolu (MMR-Mismatch Repair) gibi yollarla düzeltilmeleri verilebilmektedir. Yine okside yağ asitlerinin membran lipidlerinden uzaklaştırılması ve okside aminoasitlerin protein yıkımı ve yeniden sentez yolları ile devamlı olarak tamir edilmesi de örnek olarak verilebilmektedir (151, 161).

2.3.1. Antioksidan Enzimler

2.3.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD (EC 1.15.1.1), reaktif $O_2^{\bullet-}$ radikalının O_2 'ye dönüşümünü (dismutasyonunu) sağlayan ve daha az reaktif bir molekül olan H_2O_2 oluşumuna neden olan antioksidan bir enzimdir. H_2O_2 de KAT ve GPO gibi antioksidan enzimlerce ortadan kaldırılmaktadır. SOD ile $O_2^{\bullet-}$ temizlenmesi, oksidatif strese karşı "primer savunma" olarak adlandırılmaktadır, çünkü $O_2^{\bullet-}$ 'nin radikalik zincir reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısı olduğu bilinmektedir (151, 162).



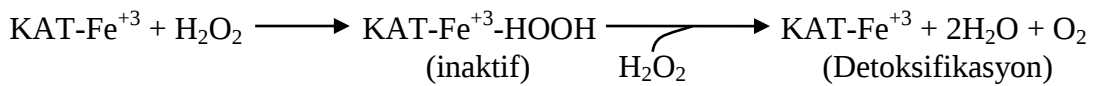
İnsanlarda SOD'nin sitozolik formu (SOD 1) (Cu^+-Zn^{+2} SOD), mitokondriyal formu (SOD 2) (Mn^{+2} SOD) ve ekstraselüler formu (SOD 3) (EC-SOD) olmak üzere üç izoenzimi bulunmaktadır (163). Bunların dışında yapısında demir içeren SOD (Fe-SOD) de bulunmakla beraber, hayvan dokularında varlığı gösterilememiştir, ancak çoğu bakteride ve yüksek düzey bitkilerde bulunduğu bildirilmiştir (127).

Cu^+-Zn^{+2} SOD'nin moleküler ağırlığı 32 kDa'dur ve iki eş alt birimden oluşmaktadır ve antioksidan savunmanın ilk basamağında ana bir role sahip olduğuna inanılmaktadır (162). Cu^+-Zn^{+2} SOD'nin aktivitesinin çeşitli kimyasalların ve hiperbarik oksijen tedavisi gibi çeşitli faktörlerin etkisiyle artan $O_2^{\bullet-}$ varlığında artış gösterdiği tespit edilmiştir (151). Mn^{+2} SOD ise homotetramer yapıda olup,

moleküler ağırlığı 96 kDa'dur ve her bir alt birimi bir adet mangan atomu içermektedir (162). Mitokondri yerleşimli olması nedeniyle Mn^{+2} SOD'nin, mitokondride ROT'ye karşı antioksidan savunmanın ilk basamağında yer aldığına inanılmaktadır ve ayrıca antitümör etkinliğe sahip bir antioksidan enzim olduğu gösterilmiştir (164). Mn^{+2} SOD'yi kodlayan gen 6. kromozom üzerinde bulunmaktadır ve düşük ekspresyonlarının meme kanseri gibi değişik kanser tiplerinin gelişimi ile ilişkili olduğu, yüksek ekspresyonlarında ise bir tümör süpresyon geni gibi davrandığı ve insanlarda kanser büyümesinin inhibisyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (165). Ayrıca, Mn^{+2} SOD'yi eksprese eden gen transferi yapılmış transgenik farelerde, Mn^{+2} SOD ekspresyonunun bu fareleri oksijenle uyarılmış pulmoner hasara ve adriyamin ile uyarılmış kardiyak toksisiteye karşı koruduğu gösterilmiştir (166). EC-SOD ise sekretuar, tetramerik, bakır ve çinko içeren bir glikoproteindir ve heparin ve heparan sülfat gibi belirli glikozaminoglikanlara karşı yüksek bir afiniteye sahiptir ve salınımı oksidanlarca değil de sitokinlerce düzenlenmektedir (162). EC-SOD, dokuların interstisyel aralıklarında ve ekstraselüler sıvılarda bulunmaktadır ve plazma, lenf ve sinoviyal sıvıdaki SOD aktivitesinin büyük çoğunluğundan sorumludur (167, 168).

2.3.1.2. Katalaz (KAT)

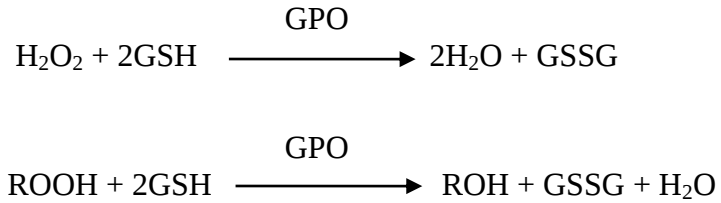
KAT (EC 1.11.1.6), tetramerik yapıda ve her bir alt bileşeninde bir hem grubu içeren, yaklaşık 240 kDa molekül ağırlığına sahip bir hemoproteindir. KAT, H_2O_2 'yi su ve O_2 'ye çevirmektedir. Ayrıca, peroksidaz aktivitesiyle metanol, etanol, formik asit ve fenoller gibi hidrojen verici moleküllerle de reaksiyona girebilmektedir (162).



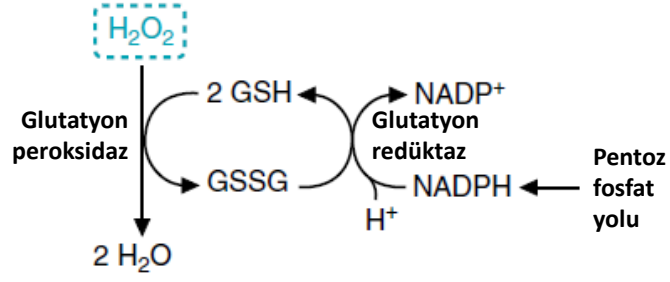
KAT'ın aktif kısmı, hem yapısında bulunan Fe^{+3} -protoporfirindir. KAT, esas olarak peroksizomlarda bulunmaktadır. Ayrıca, hücrenin sitozolik ve mikrozomal bölümlerinde de daha düşük seviyelerde KAT bulunmaktadır. KAT'nin en yüksek aktivite gösterdiği dokular, böbrek ve karaciğer gibi yüksek peroksizom içeriğine sahip dokulardır. İmmün sistem hücrelerinde KAT, hücreleri kendi solunumsal patlama reaksiyonlarında oluşan ROT'ye karşı korumaktadır (126, 151).

2.3.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GPO) ve Glutasyon Redüktaz (GR)

Selenyum içeren peroksidazlar grubundan olan GPO (EC 1.11.1.19), yaklaşık 80 kDa moleküler ağırlığında, dört alt birimden oluşan ve her bir alt birimi enzim aktivitesi için gerekli olan tek bir selenosistein bakiyesi içeren bir enzimdir. Hücrelerde esas olarak sitozol ve mitokondride yer almaktadır ve esas görevi peroksizomlar dışında oluşan H_2O_2 üretimini ortadan kaldırmaktır. GPO, GSH kullanarak, reaktif sülfidril gruplarıyla H_2O_2 'yi suya ve lipid hidroperoksitleri de toksik olmayan alkollere dönüştürmekte ve memeli hücrelerini oksidatif hasara karşı korumaktadır. Bu reaksiyonlar sırasında GSH molekülleri, tek bir molekül olan glutasyon disülfide (GS-SG) dönüşmektedirler. GSH metabolizması en önemli antioksidan savunma mekanizmalarından biridir (151, 162).



Oluşan GS-SG'nin, GSH formuna dönüşmesi bu antioksidan mekanizmanın devamı için zorunludur ve bu dönüşümü GR (EC 1.6.4.2) enzimi katalizlemektedir (şekil 2.4). GR, FAD içermektedir ve NADPH'den aldığı e^- 'ları GS-SG'nin disülfid bağlarına aktararak GSH oluşturmaktadır. Bu nedenle NADPH, ROT ile oluşan hasardan korunmada esansiyel bir moleküldür. Bu reaksiyon için gerekli NADPH'nin ana kaynağı pentoz fosfat yoludur (151, 169).



Şekil 2.4: GSH redoks döngüsü – Smith ve ark. (151)’dan alınmıştır.

2.3.1.4. Glutasyon S-Transferazlar (GST)

GST (EC 2.5.1.18), dimerik yapıda çok fonksiyonlu bir enzim ailesi olup, çok sayıda izoenzimi bulunmaktadır. Esas olarak sitoplazmada yer almaktadırlar ve kofaktör olarak selenyum kullanmamaktadırlar. GST'lerin bazı izoenzimleri GPO aktivitesi göstermekte ve LOOH'lerin metabolizmasını sağlamaktadır. Ayrıca GST'ler, yabancı maddelerin ve endojen ve eksojen çeşitli reaktif metabolitlerin GSH ile konjugasyonunu da sağlamaktadırlar (127, 160, 170).



2.3.2. Enzim Olmayan Antioksidanlar

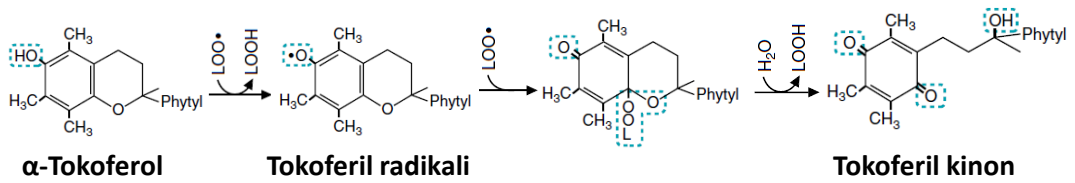
2.3.2.1. Glutasyon (GSH)

Glutamik asit, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan ve sülfidril (-SH) grupları açısından oldukça zengin bir tripeptid olan GSH (γ -glutamil-sisteinil-glisin), hücre için en önemli antioksidan moleküldür ve ROT ve peroksitlerle reaksiyona girerek, hücreleri endojen ve eksojen kaynaklı oksidan hasara karşı korumaktadır. GPO, GR ve GST gibi enzimlerin aktiviteleri için gerekli bir moleküldür. GSH,

zehirsizleştirme tepkimelerine doğrudan katılmaktadır, ayrıca bazı enzimlerin substratı veya kofaktörü olarak da görev yapmaktadır. Özellikle karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek miktarda bulunmaktadır. Proteinlerdeki -SH gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engellemektedir. GSH ayrıca, amino asitlerin membranlardan taşınmasında da rol almaktadır. GSH sentezi, γ -glutamilsistein sentaz ve glutatyon sentetaz adlı iki enzimle oluşmaktadır ve bir tripeptid olmasına rağmen protein sentezi yolları kullanılmamaktadır (126, 160).

2.3.2.2. E Vitamini (α -Tokoferol)

Doğada en yaygın olarak bulunan ve yağda çözünen en güçlü antioksidanlardan biri olan E vitamininin esas görevi, membranları lipid peroksidasyonuna karşı korumaktır. E vitamini, yapısal olarak birbirleriyle bağlantılı, metilasyon paternleri ile birbirlerinden ayrılan bir grup bileşiği (tokoferoller ve tokotrienoller) kapsamaktadır. Bu bileşikler arasında en güçlü antioksidan özelliğe sahip olan ve yiyeceklerimizde yüksek oranda bulunan formu α -tokoferoldür. E vitamini radikal reaksiyonları sırasında zincirleme reaksiyonları kırıcı özellik gösterir ve bu esnada kendisi radikal şekline dönüşür. E vitamininin tekrar eski haline gelmesine GSH, C vitamini ve koenzim Q₁₀ gibi moleküller aracılık etmektedir (151, 160).



Şekil 2.5: E vitamininin (α -tokoferol) lipid peroksil radikallerini (LOO[•]), daha stabil lipid peroksitlere (LOOH) dönüştürmesi – Smith ve ark. (151)’dan alınmıştır.

2.3.2.3. C Vitamini (Askorbik Asit)

C vitamini, suda çözünen en güçlü antioksidan moleküllerdendir ve kollajen sentezi ve başka pek çok reaksiyonda oksidasyon-redüksiyon koenzimi olarak görev almaktadır. İnsanlarda sentezlenemediği için dışarıdan alınması gerekmektedir. İndirgenmiş askorbat, indirgenmiş E vitaminine bir redoks döngüsüyle e^- larını vererek, E vitamini yenilenmesini sağlamakla beraber, $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, H_2O_2 , $HOCl$, $ROO^{\cdot}$, NO_2 ve 1O_2 ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirmektedir. Suda çözünen ve dolaşımında herhangi bir yapıya bağlanmadan taşınan bir molekül olmasına rağmen, yağda çözünen E vitaminini yenileyebilmekte, lipid peroksidasyonunu başlatan radikalleri temizleyebilmekte ve bu yollarla membranları oksidatif hasara karşı korumaktadır. Bu nedenle E vitamini ile birlikte etkili bir biçimde LDL'leri oksidasyona karşı korumaktadır (151, 160).

2.3.2.4. Karotenoidler

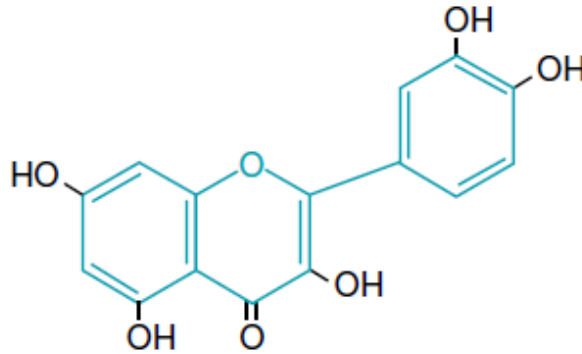
İzopren türevi lipidler, izopren birimlerinin arka arkaya dizilmeleriyle oluşmakta ve terpenler ve steroller olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar. Karotenoidler, terpenler grubunun, tetraterpenler ($C_{40}H_{64}$) alt grubunda, halkalı tetraterpen sınıfına ait olan ve organizmada önemli rolleri bulunan maddelerdir. Karotenoidler, doğada (bitkiler, algler ve fotosentez yapan bakteriler) 600 farklı çeşidi bulunan, yağda çözünen ve insanlardaki depo yağların ve kadınlardaki korpus luteumun (sarı cisim) rengini veren pigmentlerdir. A vitamininin öncülü olan β -karoten bir karotenoiddir. (160). Karotenoidlerin, 1O_2 'yi ve $ROO^{\cdot}$ 'yi temizleme yeteneklerinin olduğu ve bu nedenle ROT'nin zincir reaksiyonlarını kırıcı etkilerinin olduğu gösterilmiştir (136, 151).

Gözde makula luteanın (sarı nokta) sarı renginden sorumlu olan, maküler karotenoidler olarak adlandırılan zeaksantin ve lutein de β -karotenle benzer yapıdadırlar ve halkalarında bulunan farklı fonksiyonel oksijen birimleri ile ayrımları yapılmaktadır. Zeaksantin ve luteinin, retinayı kısa dalgalı görülebilir ışığın fototoksik etkilerinden ve çomak hücrelerinin dış membranlarını oksidatif strese koruduğu gösterilmiştir. Bu moleküllerle yapılan klinik çalışmalarda, bu molekülleri

diyetleriyle alan ya da kanda bu moleküllerin daha yüksek konsantrasyonlarının bulunduğu hastalarda, yaşla ilişkili maküler dejenerasyon görülme insidansında azalma olduğu tespit edilmiştir (151, 171).

2.3.2.5. Fenolik Bileşikler (Polifenoller)

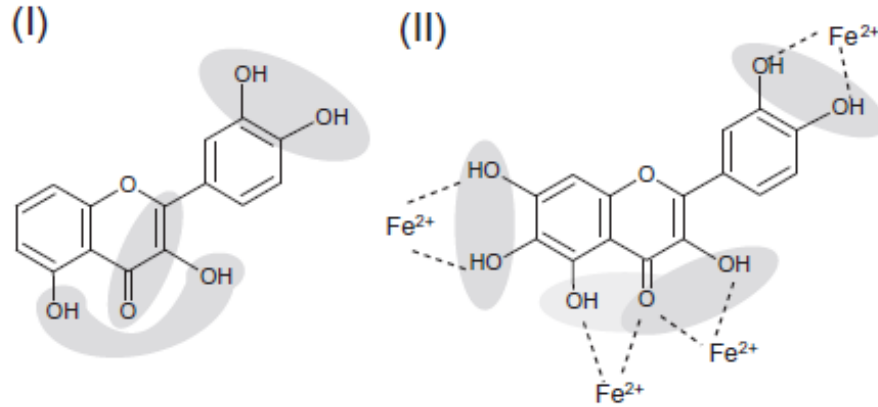
Fenolik bileşikler ya da polifenoller, bitkiler aleminin üyelerinde en çok ve en yaygın bulunan madde gruplarından birini oluşturmaktadırlar ve şu anda bilinen 8000'in üzerinde fenolik bileşik bulunmaktadır (172). Fenolik bileşikler, bitkilerin “pentoz fosfat”, “shikimate” ve “phenylpropanoid” yollarından türemiş ikincil metabolitlerdir (173). Yapısal olarak, fenolik bileşikler aromatik halka yapısı veya yapıları ve bir veya daha fazla sayıda OH grubu içermektedirler (şekil 2.6). Doğal fenolik bileşikler içinde basit moleküller (fenolik asitler gibi) olduğu gibi, oldukça polimerize bileşikler (tanninler gibi) de bulunmaktadır. Fenolik bileşikler, doğada en çok konjuge formda, örneğin bir veya daha fazla şeker bakiyesine bağlı olarak görülmektedirler. Şeker bakiyelerinin dışında, karboksilik asit ve organik asitler, aminler, lipidler ve diğer fenollerle bağlı şekilleri de yaygındır (172).



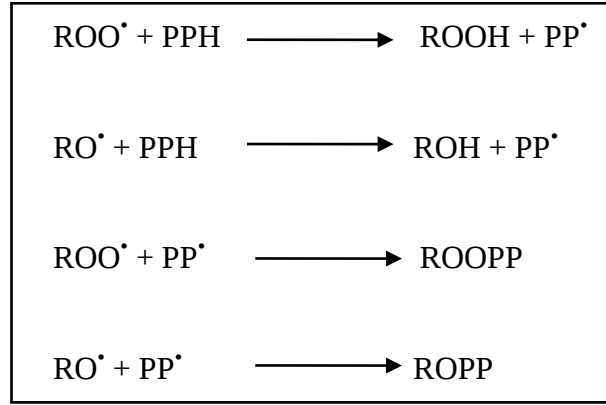
Şekil 2.6: Bir fenolik bileşik olan "Quercetin"in (flavonoid ailesine aittir) moleküler yapısı – Smith ve ark. (151)'dan alınmıştır

Harborne'un yaptığı sınıflamaya göre fenolik bileşikler, temel kimyasal yapılarına göre basit fenoller, benzokinonlar, fenolik asitler, asetofenonlar, fenilasetik asitler, hidroksisinnamik asitler, fenilpropenler, kumarinler, izokumarinler, kromonlar, naftokinonlar, ksantonlar, stilbenler, antrokinonlar, flavonoidler, lignanlar, neolignanlar ve ligninler gibi çok sayıda farklı sınıfa ayrılabilirler (174, 175). Besinlerle alınan ana fenolik bileşik sınıfları; fenolik asitler, flavonoidler ve tanninlerdir (176).

Fenolik bileşiklerin, $O_2^{\bullet-}$ ve $ROO^{\bullet}$ gibi serbest radikalleri temizleyici ve Fe ve Cu gibi metal iyonlarını şelatlayıcı özellikleri bulunmaktadır ve yapılarında bulunan katekol, hidroksil ve karboksil gibi gruplarının kombinasyonları, metal iyonları için yüksek afiniteye sahip merkezler oluşturmaktadır (şekil 2.7). Fenolik bileşikler, oldukça etkili serbest radikal zincir reaksiyonları kırıcısıdır, lipid peroksidasyonunu engelleme yeteneğine sahiptirler ve serbest radikallerle kompleksler oluşturarak onları stabilize hale getirmektedirler (şekil 2.8). Ayrıca bazı fenolik bileşiklerin KO ve NADPH oksidaz gibi $O_2^{\bullet-}$ üretimi yapan enzimleri inhibe ettikleri gösterilmiştir (22, 151, 172, 177).



Şekil 2.7: Fenolik bileşiklerin antioksidan etki mekanizmalarına örnekler: I) Serbest radikal zinciri kırıcı etkisi, II) Metal şelasyonu etkisi – Fraga ve ark. (22)'dan alınmıştır.

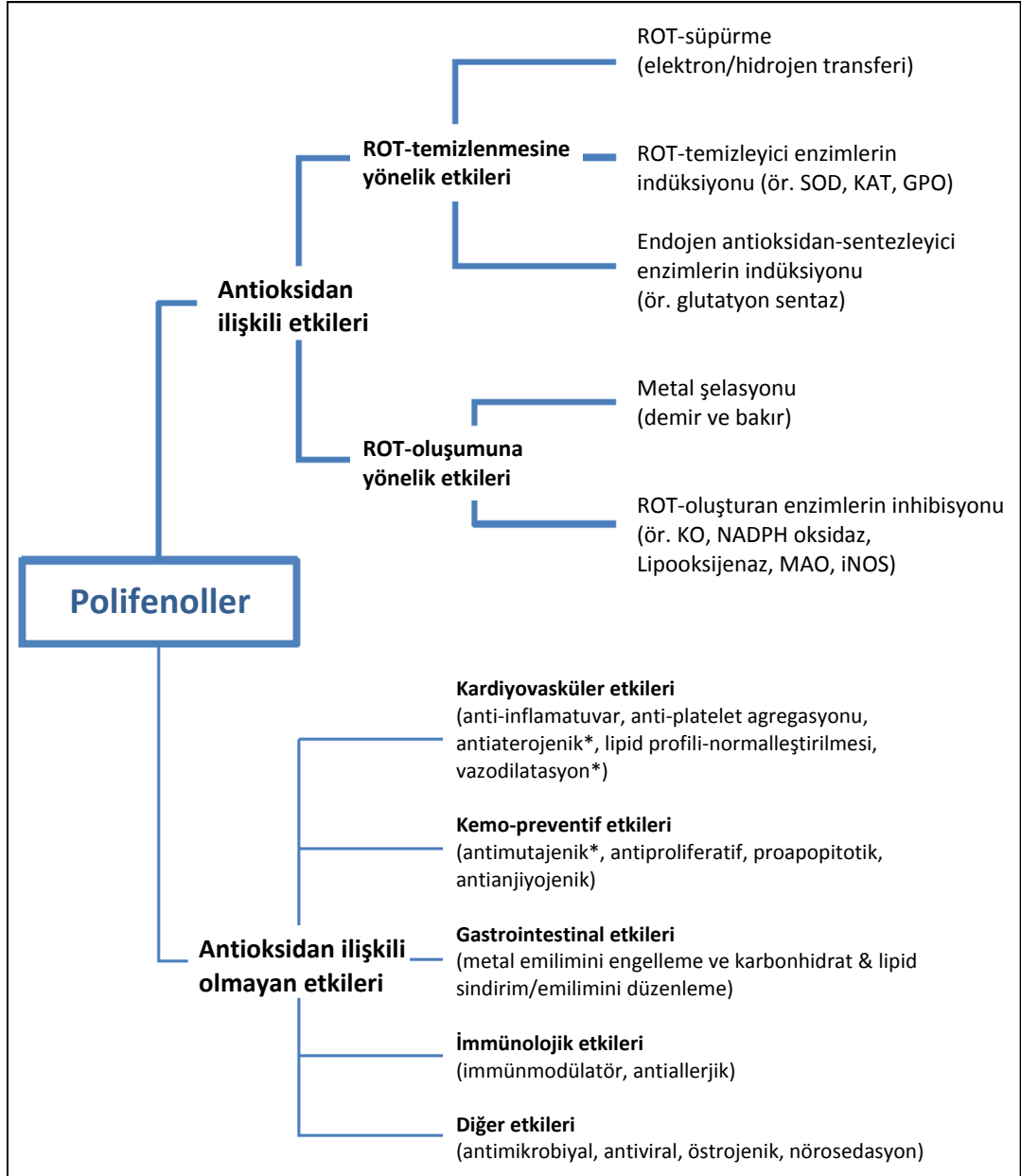


Şekil 2.8: Fenolik bileşiklerin, serbest radikalleri temizleme mekanizmalarına örnekler – Bravo (172)’dan alınmıştır.

Bu reaksiyonlarda, fenolik bileşiklerden (PPH ile gösterilen) oluşan fenoksil ($\text{PP}^\bullet$) radikal ara ürünleri, görece olarak kararlıdırlar ve bu nedenle, yeni bir zincir reaksiyonu kolaylıkla başlanmamaktadır. $\text{PP}^\bullet$ radikal ara ürünleri, ayrıca diğer serbest radikallerle de reaksiyona girerek, serbest radikal temizleyicisi olarak da görev almaktadırlar (172, 178). Fenolik bileşikler, bütün bitki organlarında (yaprak, çiçek, kabuk, tohum) bulunmaktadır ve bu nedenle insan diyetinin ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadırlar. Fenolik bileşiklerin antioksidan özellikleri ve serbest radikal süpürücü yeteneklerinden ve bunların dışında sahip oldukları farklı mekanizmalarla insan sağlığına olan potansiyel olumlu etkilerinden dolayı, son zamanlarda besinsel fenolik bileşiklere olan ilgide büyük bir artış görülmektedir (şekil 2.9) (22, 172, 177).

Fenolik bileşiklerin ateroskleroz üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla yapılan çok sayıda in vivo ve in vitro çalışmada, antioksidan etkilerinin yanı sıra, aterosklerotik plak oluşumunu geciktirici (179-181), kan basıncını düşürücü (15, 23, 182), kan kolesterol seviyelerini düşürücü (15, 16, 26), antiinflamatuvar etkili (24, 183), adezyon moleküllerinin sentezini azaltıcı (24, 184-186), vasküler düz kas hücre proliferasyonunu azaltıcı (16, 27), ateroskleroz oluşumuna aracılık eden çeşitli hücre içi sinyal yollarını baskılayıcı (179, 184, 185), platelet agregasyonunu ve reaktivasyonunu baskılayıcı (16, 187, 188), proinflamatuvar enzimleri düzenleyici ve proinflamatuvar gen transkripsiyonunu azaltıcı (24, 179, 189) etkilerinin olduğu

tespit edilmiştir. Bu araştırmalardan elde edilen sonuçlar, söz konusu bileşiklerle ve bu bileşikleri yapılarında bulunduran bitkilerle, ateroskleroz ile ilgili yapılacak araştırmalar için oldukça teşvik edici görünmektedir.



Şekil 2.9: Fenolik bileşiklerin (polifenoller), iyi bilinen ana biyolojik etkilerinin sınıflandırılması (* ile işaretli durumlarda, antioksidan ilişkili etkilerinin de rolü bulunmaktadır) – Sandoval-Acuña ve ark. (177)’dan alınmıştır.

2.3.2.6. Diğer Antioksidan Bileşikler

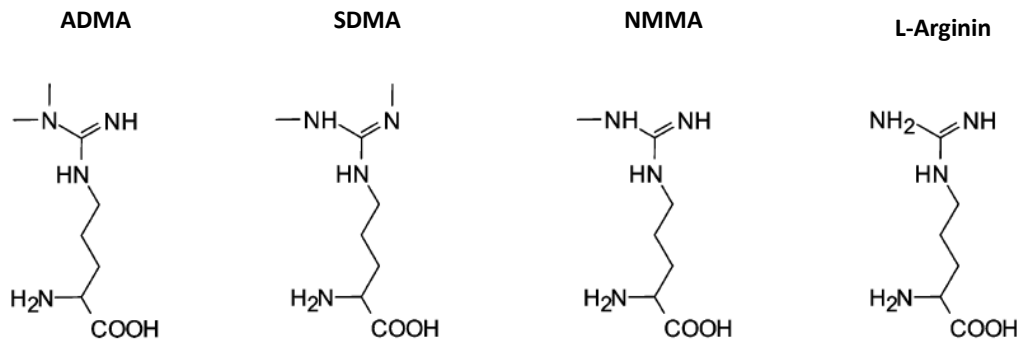
Vücutta endojen olarak sentezlenen, diğer fonksiyonlarının yanı sıra enzimatik olmayan yollarla antioksidan etkinlik gösteren çok sayıda molekül bulunmaktadır. Örnek olarak, pürinlerin yıkım ürünü olan ürik asit; kan, tükürük ve akciğerleri kaplayan sıvılar gibi ekstraselüler sıvılarda bulunmakta ve protein tiyolleri ile birlikte plazmanın ana serbest radikal tutucuları arasında yer almaktadırlar. Özellikle diğer antioksidan bileşiklerin az olduğu üst hava yollarının korunmasında ürik asit önemli bir moleküldür. Ürik asit, $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$ ve $ROO^{\cdot}$ ile hemoglobin birleşmesiyle oluşan oksihem gibi oksidan bileşikler temizlemekte ve demirle birleşerek stabil reaktif olmayan bileşikler oluşturmaktadır (151, 190).

Endojen antioksidan moleküllere bir diğer örnek de melatonindir. Melatonin pineal bezden salgılanan, sirkadiyen ritmin düzenlenmesinden, ışık-karanlık sinyal transdüksiyonundan ve uyku indüksiyonundan sorumlu bir nörohormondur. Bu görevlerine ek olarak, $OH^{\cdot}$, H_2O_2 ve 1O_2 'yi ortadan kaldırmakta, lipid peroksidasyonunu inhibe etmekte ve lipofilik yapıda olduğundan hücre membranlarından çekirdeğe kadar geniş bir alanda etkinliği bulunmaktadır. Ayrıca SOD, KAT, GPO ve GR gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini artırdığı ve hücre içi GSH seviyelerini yükselttiği tespit edilmiştir (151, 191).

Vücudumuzda bu moleküllerin dışında, ubikinon (koenzim Q), N-asetil sistein, α -ketoasitler, bilirubin, selenyum, albümin, cinsiyet hormonları (östradiol, östron ve östriol gibi), serüloplazmin, ferritin, transferrin, laktoferrin, haptoglobulin ve hemopeksin gibi daha çok sayıda ROT temizleyici ve antioksidan özelliği bulunan endojen bileşikler bulunmaktadır. Bu endojen moleküllerin dışında, ksantin oksidaz inhibitörleri (allopurinol ve oksipurinol gibi), demir şelatörleri (deferoksamin ve dimetil tiyoüre gibi), rekombinant h-SOD, H_2 -reseptör blokerleri, barbitüratlar, mannitol, 21-amino steroidler, ebselen, trimetazidin, indapamid ve kaptopril gibi çok sayıda antioksidan etkili ilaçlar da bulunmaktadır (126, 127).

2.4. Asimetrik Dimetil Arginin (ADMA), ROT ve KVH

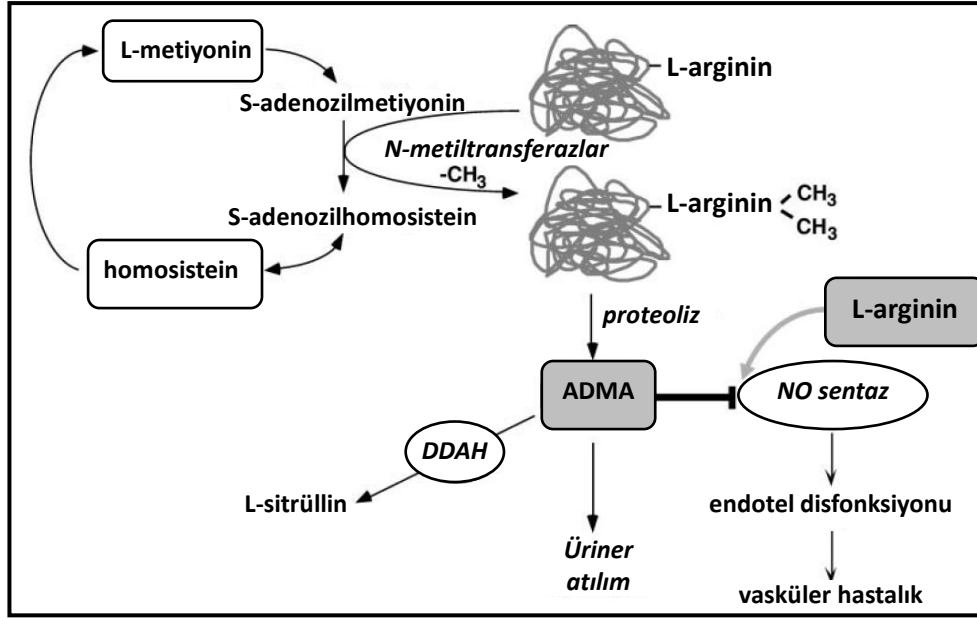
Asimetrik (N^G , N^G) dimetil arginin (ADMA), vasküler endotel hücreleri de dahil bir çok dokuda sentezlenen, insan serum, idrar ve dokularında ölçülebilen endojen bir moleküldür. ADMA ve onun stereoizomeri olan simetrik (N^G , N^G) dimetilarginin (SDMA) (şekil 2.10) ilk kez 1970 yılında insan idrarından izole edilmiştir (192, 193).



Şekil 2.10: L-Arginin, L- N^G -monometilarginin (L-NMMA), ADMA ve onun stereoizomeri olan SDMA'nın moleküler yapıları – Schulze ve ark. (194)'dan alınmıştır.

ADMA ve SDMA, proteinlerde bulunan arginin bakiyelerine, protein metil-arginin transferaz (PRMT) grubu enzimleri tarafından metil gruplarının eklenmesi ve daha sonra bu proteinlerin yıkılması sonucunda oluşan ve önemi giderek artmakta olan metillenmiş arginin türevleridirler (57, 195). PRMT grubu enzimlerinin 2 alt sınıfı tanımlanmıştır (Sınıf 1 ve Sınıf 2). Sınıf 1 PRMT reaksiyonu sonucunda ADMA oluşurken, sınıf 2 PRMT reaksiyonu sonucunda ise SDMA oluşmaktadır. PRMT'nin her iki sınıfı da monometilasyon ile L-NMMA oluşumuna yol açabilmektedir. L-NMMA ve ADMA, NOS'un üç izoformunu da inhibe etmekle beraber, SDMA'nın NOS üzerinde inhibitör etkisi bulunmamaktadır (195, 196). Bununla beraber SDMA, katyonik amino asit taşıyıcılarını (CAT'ler) inhibe ederek, L-argininin hücre içine girişini engellemekte ve kendisiyle beraber ADMA'nın hücre dışına atılımını azaltmakta, bu nedenle NO^* sentezini azaltmaktadır (57). Sınıf 1 PRMT, en çok bulunan PRMT tipidir ve kardiovasküler sistemde kalpte, düz kas hücrelerinde ve endotel hücrelerinde bulunduğu tespit edilmiştir (195, 197). Bu metilasyon

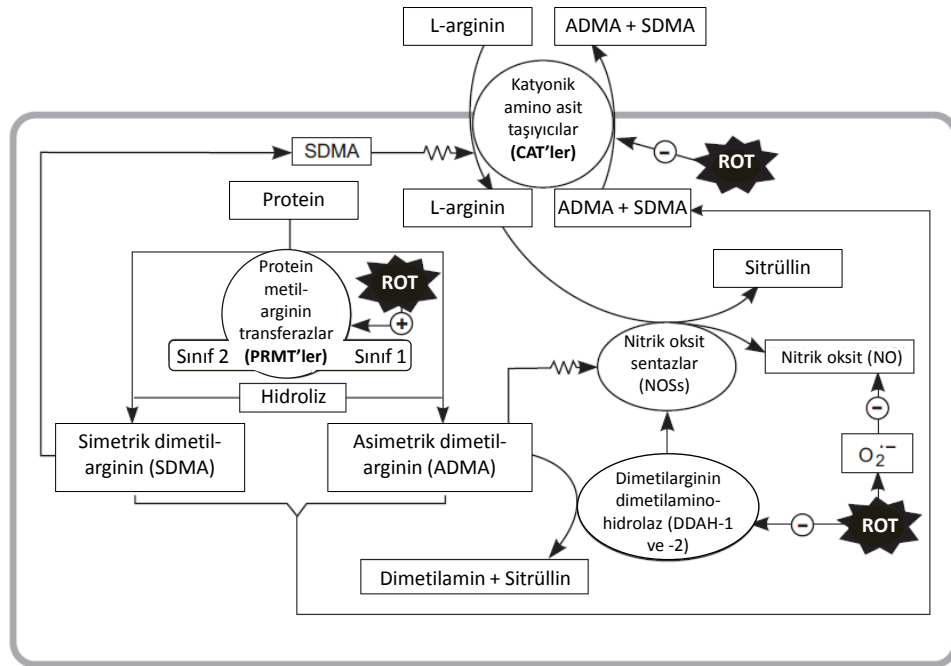
reaksiyonları esnasında PRMT grubu enzimler S-adenozilmetiyonini metil vericisi olarak kullanmakta ve sonuçta ADMA oluşumu arttıkça bu yol üzerinden homosistein oluşumu da artmaktadır (şekil 2.11) (57, 198).



Şekil 2.11: ADMA ile ilgili biyokimyasal yollara genel bir bakış – Böger (198)’den alınmıştır.

ADMA, DDAH enzimi tarafından yıkılmaktadır ve bu enzimi ilk kez Ogawa ve arkadaşları saflaştırmış ve bu isimle adlandırmışlardır. Ogawa, bu enzimin ADMA’yı, sitrüllin ve dimetilamine metabolize ettiğini göstermiştir. İnsanlarda ve ileri organizmalarda, DDAH enziminin DDAH-1 ve DDAH-2 olmak üzere iki alt tipi tanımlanmış bulunmaktadır. DDAH-1 enzimini kodlayan gen 1. kromozomda yer alırken, DDAH-2’yi kodlayan gen 6. kromozomda yer almaktadır. Bu iki alt tip, farklı dokularda dağılım göstermelerine rağmen, aktiviteleri birbirlerine benzerdir. DDAH-1 ekspresyonu ile nNOS arasında, DDAH-2 ile eNOS arasında ilişki bulunmaktadır. Kardiovasküler sistemde, her iki alt tipin de bulunduğu tespit edilmesine rağmen, bu sistemde DDAH-2 ekspresyonunun çok daha fazla olduğu belirlenmiştir. DDAH, ADMA’yı metabolize ederken, SDMA’yı metabolize edememektedir ve yapılan çalışmalarda ADMA’nın SDMA’ya göre daha yaygın bir metabolizmaya sahip olduğu gösterilmiştir (57, 199-201). ADMA, NO[•] oluşumunun

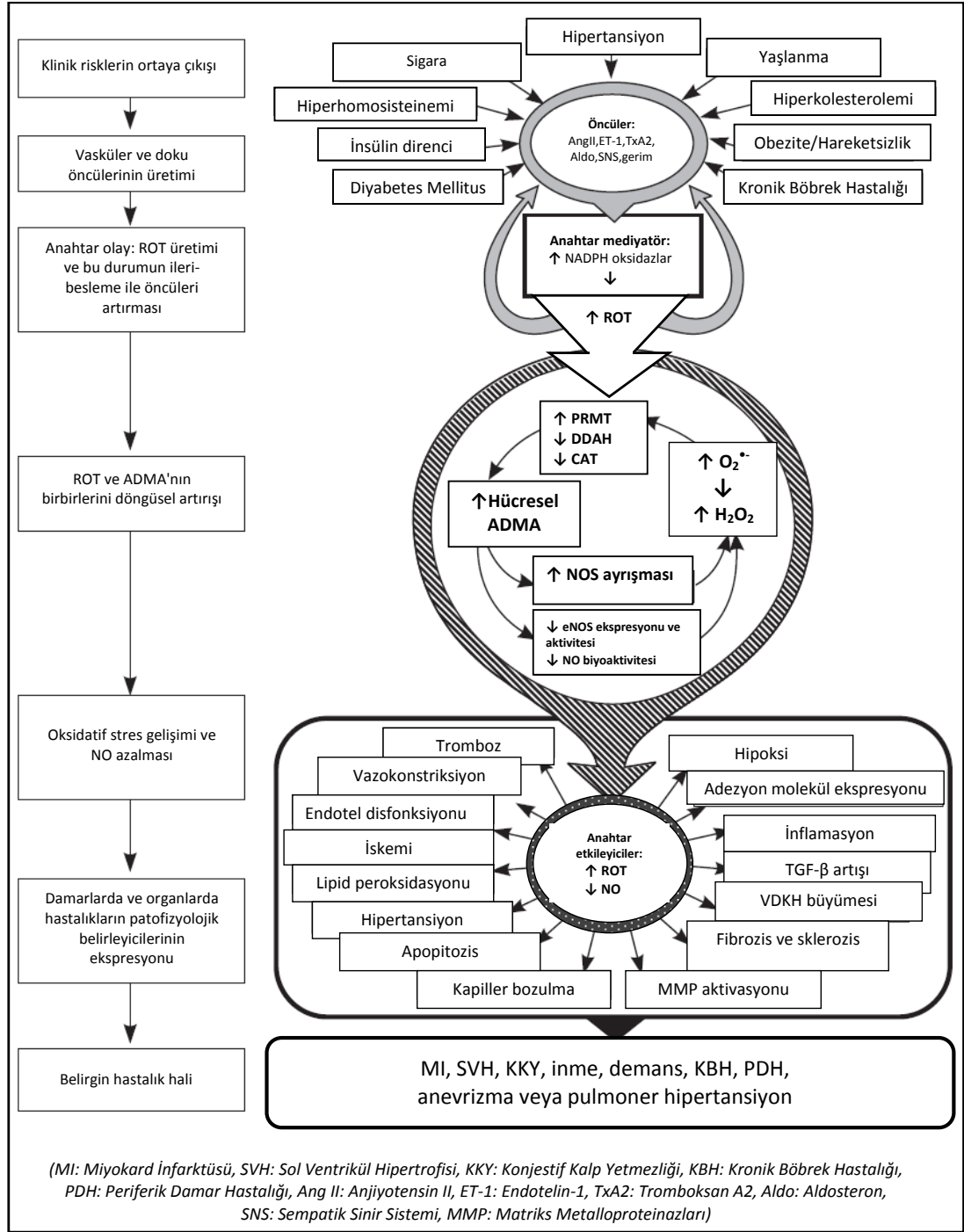
önemli bir inhibitördür ve endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır (57). ADMA, NOS'un üç izoformunun da endojen bir inhibitördür, ayrıca NOS'un üretim ve biyoyararlanımını da azaltmaktadır ve bu durum artmış $O_2^{\cdot-}$ üretimine ve azalmış $NO^{\cdot}$ üretimine neden olmaktadır (56, 195, 202). $O_2^{\cdot-}$ artışı ile birlikte ROT seviyelerinde görülen artış, $NO^{\cdot}$ seviyelerini daha da azalmaktadır. ROT, $NO^{\cdot}$ 'yu, $NO^{\cdot}$ 'nun peroksinitrite biyoinaktivasyonu ve NOS'un kofaktörü olan tetrahidrobiyopterin inaktivasyonu ve oksidasyonu aracılığı ile enzimin ayrışmasıyla ve ayrılmış enzimin $NO^{\cdot}$ yerine ROT oluşumuna yönlendirilmesiyle inhibe etmektedir (57, 203). Ayrıca ROT artışı, ADMA'yı yıkan DDAH aktivitesini azaltarak, ADMA'yı üreten PRMT'lerin aktivitelerini artırarak ve ADMA'yı hücre dışına taşıyarak uzaklaştıran CAT'leri inhibe ederek, hücre içi ADMA seviyelerini artırmakta, artmış ADMA seviyeleri de $NO^{\cdot}$ üretimini daha fazla azaltmaktadır (57). ADMA'nın üretimi, etkisi, metabolizması ve taşınması ile ilgili hücrel mekanizmalar ve ROT ile etkileştiği yerler şekil 2.12 'de gösterilmektedir.



Şekil 2.12: ADMA'nın üretimi, etkisi, metabolizması ve taşınması ile ilgili hücrel mekanizmalar ve ROT ile etkileştiği yerler – Wilcox (57)'tan alınmıştır.

ADMA'nın endotel disfonksiyonuna neden olmasının yanı sıra, periferik ve pulmoner damar direncini de artırdığı gösterilmiştir (57). Ayrıca, insan endotel hücrelerinin LDL ile inkübasyonunun, oxLDL konsantrasyonunu, sınıf 1 PRMT gen ekspresyonunu ve ADMA düzeylerini artırdığı tespit edilmiştir (204). Endotel disfonksiyonuna ve KVH'lara neden olduğu bilinen hiperkolesterolemi, HT, sigara, obezite ve diyabet gibi birçok kardiyovasküler risk faktörünün ADMA seviyeleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (205-208).

Değişik araştırmacılar tarafından yapılan geniş çaplı epidemiyolojik ve ileriye yönelik çalışmalarda, ADMA'nın plazma düzeyleri ile KVH'ların çoğu arasında yakın bir ilişki olduğu saptanmış ve insanlarda ölçülen yüksek plazma ADMA değerinin, gelecekteki KVH riskinin öngörülmesinde bağımsız prediktif bir değişken olduğu, prognostik değerinin olduğu ve tedavi stratejilerini yönlendirebileceği tespit edilmiştir. ROT ve ADMA'nın, KVH'ların, vasküler hastalıkların ve kronik böbrek hastalığının (KBH) oluşumundaki etkileri ve birbirleriyle etkileşimleri şekil 2.13'te gösterilmektedir (57).



Şekil 2.13: ROT ve ADMA'nın, KVH'ların, vasküler hastalıkların ve KBH'nın oluşumundaki etkilerini ve birbirleriyle etkileşimlerini gösteren diyagram – Wilcox (57)'tan alınmıştır.

2.5. *Plantago Major* L. (Büyük Sınırli Ot)

2.5.1. Botanik  zellikleri

Plantago major L. (*P. major*); Plantaginaceae ailesinin, *Plantago* cinsine ait çok yıllık bir bitki türüdür ve ülkemizde "büyük sınırli ot" adıyla bilinmektedir. Çimenlik araziler, meralar, bahçeler, yol kenarları, tarım arazileri ve atık alanları gibi oldukça yaygın bir yerleşim alanı bulunmaktadır. Boyu genellikle 15-30 cm arasında olmakla birlikte, gelişim gösterdiği habitatlara bağlı olarak çok farklı boyutlara ulaşabilmektedir. Genellikle 7,5-18 cm uzunluğunda ve 2,5-5 cm genişliğinde olan koyu yeşil, yumurta şeklindeki yaprakları bir bazal rozet yapısı oluşturmaktadır. Yaprakları genellikle pürüzsüz veya hafif tüylü, dalgalı kenarlı, 5 ila 9 arasında oldukça belirgin, sert ve lifli paralel damarlar içeren bir yapıya sahiptir (şekil 2.14) (32-34, 209).



Şekil 2.14: *Plantago major* L. bitkisinin görünümü – Nazarizadeh ve ark. (34)'dan alınmıştır.

2.5.2. Tarihçesi ve Geleneksel Tıptaki Yeri

Polenler üzerinde yapılan çalışmalarda, *P. major*'un yaklaşık 4000 yıl kadar önce İskandinav ülkelerinde, taş devrindeki ilk tarım arazilerinde ekili bitkilerden biri olduğu tespit edilmiştir ve insanlar tarafından Avrupa'dan tüm dünyaya yayıldığı düşünülmektedir. Kızılderililer, *P. major* için, Avrupalılar'ın geçtikleri her yerde bu bitkiyi buldukları için, "beyaz adamın ayak izi" ("white man's footprint") tabirini kullanmışlardır. *P. major*'un cins ismi olan *planta*, latince "ayak tabanı" anlamına gelmektedir. Pek çok insan *P. major*'u yalnızca yabancı bir ot olarak bilmektedir, ancak bu bitki, yüzyıllardan beri bilinen, tıbbi amaçla kullanılan çok eski bir bitkidir. İskandinavya ülkelerinde bu bitki, genellikle yara iyileştirici özellikleriyle bilinmektedir. *P. major*'un, Norveççe ve İsveççe'deki yaygın ismi "iyileştirici yapraklar" anlamına gelen "groblad"dır (32).

Yara iyileşmesinde *P. major*'un geleneksel tıpta kullanımı çok eskiye dayanmaktadır. Birinci yüzyılda, Dioscorides isimli Yunan hekim tarafından yazılan "De materia medica" isimli tıp kitabında, *P. major*'un köpek ısırıklarının tedavisinde kullanıldığı bilgisi yer almaktadır. *P. major*, 12-13. yüzyıllar arasında yaşamış bir İslam bilgini olan İbn-i El-Baytar tarafından da tanımlanmıştır. 13. yüzyılda yaşamış Danimarka'lı Henrik Harpestreng de, "Liber Harbarum" isimli kitabında, *P. major*'un yara iyileştirici olduğunu ve yağda kaynatılıp içildiğinde ise insan vücudundaki herhangi bir organı iyileştirebileceğini belirtmiştir. Ayrıca 1648 yılında Simon Paulli tarafından yazılan "Flora Danica" isimli kitapta *P. major*, o zamanlarda küçük çocukların bile oldukça iyi bildiği, kullanımı çok yaygın olan bir tıbbi bitki olarak ve çok etkili bir yara iyileştirici ilaç olarak tanımlanmıştır (32).

Bu tarihi verilerin dışında, son zamanlarda yapılan çok sayıda etnofarmakolojik çalışmada, *P. major*'un ülkemiz de dahil olmak üzere, dünyanın bir çok noktasında, deri hastalıklarının, enfeksiyon hastalıklarının, sindirim sistemi, solunum sistemi, dolaşım sistemi ve üreme sistemlerinden kaynaklanan problemlerin ve tümörlerin tedavileri amacıyla kullanıldığı, ayrıca ağrı giderici ve ateş düşürücü olarak da kullanıldığı tespit edilmiştir. Örneğin ülkemizde, *P. major* yapraklarının ve sulu

ekstrelerinin halk arasında, astım tedavisinde ve diş ağrılarını gidermek amacıyla, cilt apselerinin tedavisinde ve yara iyileşmesinde, mide ülserinin tedavisinde ve kardiyovasküler hastalıklarda ödem çözücü olmak üzere pek çok alanda kullanıldığı tespit edilmiştir. *P. major*, ülkemiz dışında da pek çok ülkenin halkları arasında, çok çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Örneğin, Çin tıbbında *P. major*, uzun yıllardan beri soğuk algınlığı ve gripten, viral hepatitlere kadar çok sayıda viral hastalığın tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nin de pek çok yerinde *P. major*, yara iyileşmesinde, eziklerde ve morluklarda, arı sokmalarında, yılan zehirlenmelerinde ve ısırğan otuyla temaslarda, diüretik olarak, ağrı kesici ve ateş düşürücü olarak, ayrıca karın ağrıları ve kabızlığın giderilmesi gibi çok sayıda rahatsızlıkta kullanılmaktadır. Hint tıbbında da, antiinflamatuvar olarak, yanık ve kesik tedavilerinde, yaralarda kanamayı durdurucu olarak, yılan zehirlenmelerinde ve ishal tedavisinde, mide ülseri tedavisinde, diüretik olarak, ateş düşürücü olarak, üriner sistem enfeksiyonlarında ve dizanteri tedavisinde ve daha pek çok rahatsızlığın tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. *P. major*, bu ülkeler dışında da daha pek çok ülkede, halk arasında, çok çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (32, 34, 210, 211).

2.5.3. Kimyasal İçeriği

2.5.3.1. Fenolik Bileşikler

P. major'de fenolik bileşiklerin çok önemli bir alt grubu olan flavonoidlerin pek çok alt tipi bulunmaktadır. *P. major*'un flavonoid içeriği ile ilgili yapılan bir çalışmada çeşitli flavonoidlerin miktarları çoktan aza doğru şöyle sıralanmaktadır: luteolin 7-glukozid > hispidulin 7-glukuronid > luteolin 7-diglukozid > apigenin 7-glukozid $\approx$ nepetin 7-glukozid > luteolin 6-hidroksi 4'-metoksi 7-galaktozid. *P. major*'un yapısında, bunlara ek olarak luteolin, kateşin, kuersetin, rutin, kamferol, krisin, naringenin, plantagin, homoplantagin, baikalein, hispidulin ve skutallarein gibi daha pek çok flavonoidin bulunduğu tespit edilmiştir (30, 32).

P. major'un yapısında, flavonoidler dışında diğer fenolik bileşiklerden de çok sayıda bulunmaktadır. Örneğin hidroksisinnamik asitler alt grubundan kafeik asit, klorojenik asit, plantamajosid, akteosid ve ferulik asit gibi bileşikler, fenolik asitler alt grubundan gallik asit, progallik asit, vanillik asit ve sirenjik asit gibi bileşikler ve diğer fenolik bileşik alt gruplardan katekol, kafein, kumarin, kolşisin, izoromnetin, sakaruntin ve hiperosid gibi çok sayıda fenolik bileşik bulunmaktadır (30, 32). *P. major* L. yaprak ve tohumlarının kuru ağırlık olarak yapılarında bulunan toplam fenolik, toplam flavonoid ve tannin içerikleri (mg/g) tablo 2.8'de gösterilmektedir.

Tablo 2.8: *P. major* L. yaprak ve tohumlarının kuru ağırlık olarak yapılarında bulunan toplam fenolik, toplam flavonoid ve tannin içeriği (mg/g) – Kobeasy ve ark. (30)'dan alınmıştır.

Bileşen	<i>P. major</i> L. yaprakları	<i>P. major</i> L. tohumları
Toplam fenolik içeriği (mg Gallik/g)	13,05 ± 0,10	7,43 ± 0,07
Toplam flavonoid içeriği (mg Kuersetin/g)	6,41 ± 0,04	3,03 ± 0,03
Tanninler (mg Kateşin/g)	5,63 ± 0,06	2,43 ± 0,03

2.5.3.2. Diğer Kimyasal Bileşikleri

P. major yapraklarında rafinoz gibi trisakkaritler, stakiyoz gibi tetrasakkaritler, plantaglusid, pektik asit, galaktoarabinan, galaktan, pektin, tip II arabinogalaktan ve glukomannan gibi çok sayıda polisakkaritler ve miristik asit, palmitik asit, stearik asit, araşidik asit ve behenik asit gibi yağ asitleri bulunmaktadır. Tohumlarında ise glukoz, fruktoz, ksiloz ve ramnoz gibi monosakkaritler, sükroz gibi disakkaritler, planteoz gibi trisakkaritler, nişasta ve asidik heterosiklanlar gibi polisakkaritler ve miristik asit, palmitik asit, stearik asit, oleik asit, linoleik asit, linolenik asit, araşidik asit, behenik asit, lignoserik asit ve 9-hidroksi-cis-11-oktadekenoik asit gibi yağ asitleri bulunmaktadır (30, 32).

P. major'un yapısında, indikain ve plantagonin gibi alkaloidlerin de bulunduğu tespit edilmiştir. Bununla beraber *P. major* yapısında, asperulosid, aucubin, katapol, gardosid, geniposidik asit, majorosid, 10-aktoksimajorosid, 10-hidroksimajorosid ve mellittosid gibi çok sayıda iridoid glukozidi de bulunmaktadır.(32).

P. major, özellikle ilkbaharda bir gıda kaynağı olarak da kullanılmaktadır. Ülkemizde de özellikle Doğu Anadolu Bölgesi'nde salatalarda kullanıldığı tespit edilmiştir. Bu nedenle yapısındaki çeşitli vitaminlerin varlığı yönünden araştırılmış ve β -karoten, askorbik asit ve çeşitli karotenoidlerce zengin olduğu bulunmuştur. Ayrıca, K vitamini seviyesinin diğer bitki türleri ile karşılaştırıldığında, orta seviyede olduğu ve *P. major*'u herbisitlere karşı dayanıklı kıldığı tespit edilmiştir. *P. major* yapraklarında karotenoid türevi terpenoidler dışında, oleanolik asit, ursolik asit ve 18 β -glisirretinik asit gibi terpenoidlerin de bulunduğu gösterilmiştir (32, 212, 213).

2.5.4. *P. Major* Ekstrelerinin Biyolojik Etkileri

2.5.4.1. Antioksidan ve ROT Temizleyici Etkileri

P. major yapraklarının su, % 80 etanol ve % 80 metanolle hazırlanan ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri "DPPH yöntemi" (214) (DPPH (2,2-difenilpikrilhidrazil radikali temizleme deneyi) ile belirlendiğinde, bu üç farklı çözücüyle elde edilmiş ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri (% inhibisyon) sırasıyla sulu ekstrede % 90,3, % 80 etanol ekstresinde % 93,3 ve % 80 metanol ekstresinde % 93,2 gibi oldukça yüksek seviyelerde ROT temizleyici etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (29). DMBA (7,12-dimethylbenz(a)antrasen) ile oksidatif stres oluşturulan ratlarla yapılan bir hayvan çalışmasında, *P. major*'un hazırlanan sulu ekstresinin oral yoldan uygulanmasıyla MDA seviyelerindeki anlamlı düşmeyle ($p<0,01$), KAT ($p<0,05$) ve KA (karbonik anhidraz) ($p<0,01$) enzim aktivitelerindeki ve GSH düzeylerindeki ($p<0,01$) ise anlamlı yükselmelerle, *P. major*'un oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (215). *P. major*'un yapısında bulunan fenolik bileşiklerin de çoğu antioksidan ve ROT temizleme özelliğine sahiptir (32).

2.5.4.2. Antiaterosklerotik Etkileri

P. major'un ateroskleroz üzerine etkileri ile ilgili literatürde oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır ve aterosklerotik hayvan modelleri ile ilgili ise hemen hemen hiç çalışma bulunmamaktadır. Bu alanda literatürde sadece, 1962 yılında hiperkolesterolemik diyetle ateroskleroz oluşturulmuş tavşanlarda kurutulmuş *P. major* yapraklarının direkt etkisinin ve bu yapraklarla hazırlanan ve içeriği ile ilgili bilgi verilmeyen bir ekstresinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada kullanılan YZA ırkından 50 adet tavşan üç gruba ayrılmıştır ve 1. grupta 0,2 g/kg dozunda kolesterol oral yoldan uygulanmış, 2. grupta birinci gruba yapılarına ilave olarak 50 g/gün kurutulmuş *P. major* yaprağı yedirilmiş ve üçüncü gruba ise birinci gruba yapılarına ilave olarak nasıl hazırlandığı açıklanmayan *P. major* yaprağı ekstresinden 1 ml/gün oral yoldan verilmiştir. Deney protokolü sürecinde tavşanlardan 2-4 haftada bir kan alınmış ve serum TK ve lesitin seviyeleri bakılmıştır. Üç aylık süre zarfında, kolesterol grubunda değerler giderek artmakta iken, hem yaprak, hem de ekstre verilen gruplarda, önce ilk ayda hafif bir kolesterol yükselmesi olduğu, ardından üç aylık süre sonunda her ikisinde de başlangıç kolesterol seviyelerine geri gelindiği gösterilmiştir. Deney sonunda ayrıca tavşanların aortlarında, özellikle çıkan aortada olduğu gözlenen aterosklerotik plakların kalitatif özellikleri de incelenmiş ve ikinci ve üçüncü gruplarda birinci gruba oranla plak oluşumunda azalma tespit edilmiştir. Sonuçta hem kolesterol seviyelerinde oldukça anlamlı düşüşlerin olduğunun, hem de aterosklerotik plakların oluşumunda anlamlı fark bulunduğunun gösterilmesiyle, *P. major*'ün bu alanda araştırılmaya değer bir bitki olduğu düşünülmüştür. Ancak, bu tarihten sonra *P. major* ile ilgili bu konuda, daha detaylı bir çalışmanın yapılmamış olduğu görülmektedir (43).

P. major'un yapısında en fazla bulunan flavonoidlerden biri olan luteolin 7-glukozid (L7G) ile yapılan bazı çalışmalarda, bu molekülün antiaterosklerotik özellikler gösterdiği tespit edilmiştir. Sağlıklı ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, oral yoldan uygulanan L7G'nin TK, LDL kolesterol ve plazma glukoz konsantrasyonlarında anlamlı düşüşlere neden olduğu gösterilmiştir (26). Başka bir çalışmada da L7G'nin, ateroskleroz patogeneğinde merkezi bir role sahip olan vasküler düz kas hücre

proliferasyonu üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, hücre kültüründe, izole edilmiş ve PDGF-BB (Platelet-kökenli büyüme faktörü -BB) ile uyarılmış rat aortik vasküler düz kas hücreleri üzerine L7G'nin etkileri araştırılmış ve sonuçta L7G'nin PDGF-BB ile uyarılmış vasküler düz kas hücre proliferasyonunu, hücre sel sitotoksitesiteye ve apoptoza neden olmadan azalttığı gösterilmiştir (27).

2.5.4.3. Diğer Biyolojik Etkileri

P. major'un antioksidan ve antiaterosklerotik özellikleri dışında antiinflamatuvar, antihipertansif, hepatoprotektif, antiülser, immünmodülatör, antinoziseptif, antimikrobiyal ve antitümöral etkinlik gibi birçok farklı özelliğinin bulunduğunu gösteren çok sayıda çalışmanın varlığı da bu bitkiye olan ilgiyi giderek artırmaktadır (31-42).

2.6. Aterosklerotik Tavşan Modelleri

Deneysel ateroskleroz araştırmalarında kullanılan ilk hayvan tavşandır ve ilk kez 1907 yılında Alexander Ignatowski tarafından bu çalışmalar başlatılmıştır. Ignatowski, tavşanları tam yağlı sütten, yumurtalardan ve etten oluşan bir hayvansal diyetle beslemeye başlamış ve sonunda tavşan aortunda belirgin ateroskleroz oluşturmayı başarmıştır. 1912'de Theodor Fahr, Dr. Ignatowski'nin deneysel protokollerini kullanarak 5-8 ay arasında değişen sürelerde aortta erken aterosklerotik lezyonların oluşumunu, 9-10 ay arasında da artmış kan basıncıyla beraber, aortta şiddetli aterosklerotik hasar oluşumunu gözlemlemiştir. Aynı yıl Nikolai Anichkov ve Semen Chalatov, Ignatowski'nin kullandığı yöntemi değiştirip, yerine kolesterol koymuşlardır ve aterosklozun kolesterolle oluştuğunu gözlemlemişlerdir (216).

Tavşanlar, otçul hayvanlar olduklarından, doğaları gereği ateroskleroza yatkın hayvanlar değildirler, ancak kolesterol yüklemelerine oldukça duyarlı oldukları için ve kısa sürede aterosklerotik lezyon geliştirebildikleri için, ateroskleroz modeli olarak oldukça yaygın bir biçimde kullanılmaktadırlar. Tüm tavşan ırkları arasında

ateroskleroz modeli olarak en yaygın kullanılanları YZA ırkından olan tavşanlardır ve erişkin vücut ağırlıkları 2 kg ile 5 kg arasında değişmektedir. Normalde tavşanlar düşük plazma TK seviyelerine sahiptir ve kolesterol alt tipleri arasında baskın olan şekil tavşanlarda HDL'dir. Erişkin erkek tavşanlarda plazma TK seviyeleri 41-70 mg/dl iken, erişkin dişi tavşanlarda 52-65 mg/dl civarındır. Ayrıca, erişkin erkek tavşanlarda plazma TG seviyeleri 36-103 mg/dl iken, erişkin dişi tavşanlarda 28-102 mg/dl civarındır. YZA tavşanları nadiren kendiliğinden aterosklerotik lezyonlar oluşturabilseler de, gerçek manada vasküler lezyonların oluşabilmesi için yüksek kolesterol diyeti gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda dişi tavşanların diyetle indüklenmiş aterosklerotik lezyon oluşumuna erkek tavşanlardan daha az yatkın oldukları gösterildiğinden, bu çalışmalarda genelde erkek tavşanlar kullanılmaktadır. Tavşanlarda, hiperkolesterolemik diyet varlığında, aterosklerotik lezyonlar genelde aortik arkta ve torasik aortta görülmekteyken, insanlarda bunun tam tersi olarak abdominal aortta görülmektedir (217-220).

Tavşanların günlük gıda alımları, vücut ağırlıklarının yaklaşık % 5'i, günlük su alımları da vücut ağırlıklarının yaklaşık % 10'u kadardır. Tavşanlar, deney hayvanları laboratuvarlarında esas olarak tahıllardan ve diğer gıda maddelerinden hazırlanan, ~ % 15 oranında protein, % 40-50 oranında karbonhidrat, % 2 oranında bitkisel yağ ve % 15-25 oranında lif bileşiminden oluşan, homojen pelletler haline getirilmiş standart yemlerle beslenmektedirler. Pellet yem sistemiyle tavşanların yemek ayırt etmeleri önlenmekte ve standart bir beslenme biçimi oluşturulmaktadır (220).

Ateroskleroz modeli oluşturma amacıyla yapılan çalışmaların bazılarında, normal yemle beslenen tavşanlara, 3-6 ay boyunca günlük yemlerinin ağırlıkça % 0,25-1'i oranında (w/w) kolesterol verildiğinde plazma TK konsantrasyonlarının 450 ile 2550 mg/dl aralığında seyrettiği (219), bazılarında da 8 ile 16 hafta boyunca günlük yemlerinin ağırlıkça % 0,5'i ile % 4'ü oranında (w/w) kolesterol verildiğinde plazma TK konsantrasyonlarının > 1000 mg/dl olduğu ve aterosklerotik lezyonların esas olarak makrofaj kaynaklı köpük hücrelerinden oluştuğu gözlenmiştir (221). Tavşan ateroskleroz çalışmalarındaki en önemli problemlerden biri, insanlarda gözlenen aterosklerozla karşılaştırıldığında, daha yağlı ve makrofajlarca zengin lezyonların

görülmesi ve kolesterol seviyelerinin insanlarla karşılaştırılamayacak ölçüde yükselmesidir. TK konsantrasyonları bu yüksek seviyelere vardığında, tavşanlarda bağırsaklar yoluyla kolesterol atılımı ve hepatik mekanizmalarla kolesterol kompensasyonu yetersiz kalmaktadır ve devamlı bir plazma TK yüksekliği durumu oluşmaktadır. Bu durum, damarlarda kolesterol birikimine ve aterosklerotik lezyon oluşumuna neden olmaktadır (219, 220). Bir çalışmada, normal yemle beslenen tavşanlara, kapsül haline getirilmiş kolesterol oral yolla 507 mg/gün miktarında, 47-87 gün boyunca uygulandığında, tavşanların % 71'inde orta şiddette ateroskleroz olduğu gözlenmiştir (221). % 2 (w/w) ve üzeri kolesterol içeren diyetlerle kısa süreli beslenen tavşanlarda insan aterosklerotik lezyonlarıyla uyumsuz özelliklerde, makrofaj kaynaklı köpük hücrelerinden zengin aterosklerotik lezyonlar oluşurken; düşük kolesterol içerikli diyetlerle uzun süre beslenen tavşanlarda ise düz kas hücrelerinden zengin ve kolesterol depolanmaları içeren, insan aterosklerotik lezyonlarına benzer lezyonlar elde edilmektedir (220). Bazı çalışmalarda % 0,25 (w/w) kolesterol içeren diyetle 4 hafta boyunca beslenen tavşanlarda yağlı çizgilenme tarzı lezyonların, % 1 (w/w) kolesterol içeren diyetle 12 hafta boyunca beslenen tavşanlarda makrofaj kaynaklı köpük hücrelerinden ve düz kas hücrelerinden zengin lezyonların ve % 0,25 (w/w) kolesterol içeren diyetle 8 ay boyunca beslenen tavşanlarda ise ileri ateromatöz lezyonların olduğu gözlenmiştir (222-224). % 1-2 (w/w) kolesterol içeren diyetlerle uzun süre beslenilmesinin, tavşanlarda genellikle yüksek mortalite oranlarına yol açtığı gösterilmiştir (220).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. *P. Major* Yaprığı Ekstresinin Eldesi

Öncelikle, *P. major* bitkisinin doğru teşhisinin yapılması amacıyla, bitkinin tüm kısımlarını içeren bir örnek Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryum'da (ANK) 60514 no ile kayıt altına alınmış ve burada yapılan incelemeler sonucunda bitkinin türü *Plantago major* L., *Sp. Pl. 112 (1753) (Sinir otu)* olarak teşhis edilmiştir. Ekstre hazırlanması amacıyla, Balıkesir-Edremit-Şahinderesi bölgesinden toplanıp, karanlık ve rutubetsiz bir ortamda kurutulan *P. major* bitkileri, yapraklarından ayrılmamış bütün halleriyle aktardan satın alındıktan sonra, yaprakları ayrıştırılmış ve kahve değirmeninde öğütüldükten sonra toz haline getirilen bitki örnekleri araştırmada kullanılmıştır. *P. major*'un ekstraksiyon verimini belirlemek amacıyla; 0,2 g bitkisel örnek üzerine 10 ml % 80 (v/v) etanol ilave edilmiştir. Oluşan karışım 24 saat süreyle oda sıcaklığında ve karanlıkta orbital çalkalayıcı ile çalkalandıktan sonra, Genuine Whatman No.41 filtre kağıdından geçirilerek süzölmüştür. Bu şekilde, % 80 etanol ile elde edilen bitkisel ekstraktlar kuru ham ekstrakt elde etmek amacıyla 'rotary evaporatör'de (Buchi marka) 30 C°'nin altında, vakum altında uçurularak kurutulmuştur. Kuru ham ekstrakt, ekstraksiyon verimini hesaplayabilmek amacıyla tartılmış ve kuru ağırlık bazında verimi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ verim} = (A1 \times 100) / A2$$

A1: solventi uzaklaştırılarak kurutulmuş ekstraktın ağırlığı

A2: bitkisel örneğin kuru ağırlığı

Hesaplama sonucunda *P. major* yaprağı ekstresinin kuru ağırlık bazında verimi % 21,4 olarak bulunmuştur. Bundan sonra, çalışma protokolü boyunca kullanılacak *P. major* yaprağı ekstrelerinin eldesi amacıyla, öğütülmüş bitkisel örneklerle, polifenollerin ekstraksiyonunu sağlamak için, Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü bünyesinde bulunan 1000 lt hacimli, maksimum basıncı 760 mmHg olan özel yapım 'rotary evaporatör'de, yukarıda anlatılan oranlar dikkate alınarak hazırlanan % 80'lik (v/v) etanol ve bitki karışımı,

24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiş, ardından 30 C°'nin altında, düşük basınç altında ekstraksiyon işlemi uygulanmış ve elde edilen kuru ham ekstraktlar kullanılacakları ana kadar -20 C°'lik buzdolabında saklanmıştır.

3.2. Deney Hayvanları

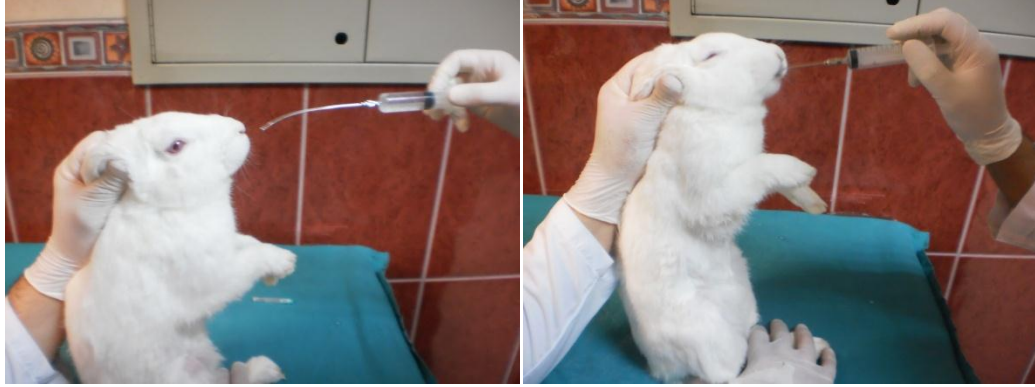
3.2.1. Deney Hayvanlarının Özellikleri ve Bakım Koşulları

T.C. Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından G.Ü.ET-12.091 kod numarasıyla onaylanan bu çalışmaya (Ek 1), deney başlangıcında ağırlık ortalamaları $1.970,33 \pm 159,84$ g olan, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen 30 adet YZA ırkı erkek tavşanla başlanılmıştır. Çalışma Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (GÜDAM) yürütülmüştür. Çalışma sonuna kadar kontrol grubu hariç, tüm gruplardan birer hayvan ölmüş olup, sonuçta ağırlık ortalamaları $2.148,46 \pm 259,24$ g olan 26 hayvanla çalışma tamamlanmıştır. Çalışmada tavşanlar, sabit sıcaklıkta (21-24 C°) ve nem oranının % 30-40 oranında olduğu odalarda, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü altında, standart polikarbonat kafeslerde muhafaza edilmişlerdir. Hayvanların deney boyunca standart pellet yemlerini ve suyu "ad libitum" olarak, serbestçe almaları sağlanmıştır.

3.2.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Hayvanlara Yapılan İşlemler

Tavşanlar beş gruba ayrılmıştır. Beş gruptan birincisi kontrol grubu, diğer dört grup ise deney grubu olarak planlanmıştır. Tüm gruplar başlangıçta altışar hayvandan oluşturulmuştur. Çalışma sonunda 1. grup olan kontrol grubu hariç tüm gruplardan birer hayvanın ölmesi sebebiyle diğer dört grup beşer hayvandan oluşmuştur. Çalışma süresi 12 hafta olarak belirlenmiştir. Hayvanlara oral yolla yapılan gavaj işlemlerinde 16 GA, 3" ebatlarında (1-3 kg'lık tavşanlar için) kıvrımlı, ucu yuvarlak ve tahriş yapmayan özellikte metal beslenme sondası (Commat Ltd) kullanılmıştır.

1. grup (n=6) (kontrol grubu), 12 hafta boyunca standart normal diyetle beslenmiştir ve bu gruba ek olarak sabah 10 cc ve akşam 10 cc olmak üzere toplamda 20 cc serum fizyolojik çözeltisi (SF) (% 0,9 'luk izotonik sodyum klorür çözeltisi), 10'ar cc'lik enjektörlerle, oral gavaj yoluyla uygulanmıştır (şekil 3.1).



Şekil 3.1: Tavşanlara oral gavaj yoluyla SF uygulanması.

2. grupta (n=5) bulunan tavşanlara 12 hafta boyunca standart normal diyetle beraber, 1 g/kg/gün miktarında kolesterol (Ultra Pure Grade-Amresco®), toplam miktar ikiye bölünerek, 10'ar cc'lik enjektörlerle, sabah toplam hacim 10 cc ve akşam toplam hacim 10 cc olacak şekilde SF ile süspansiyon haline getirilerek ve uygulama öncesi enjektörler vortekslenerek, oral gavaj yoluyla verilmiştir (şekil 3.2).



Şekil 3.2: Tavşanlara oral gavaj yoluyla kolesterol süspansiyonu uygulanması.

3. grupta (n=5) bulunan tavşanlara 12 hafta boyunca standart normal diyetle beraber, 2. gruptaki hayvanlara yapılan işlemlerin aynısı yapılırken, ilave olarak *P. major* yaprağı kuru ham ekstresi, kg başına 0,1 g'dan hesaplanıp günlük doz ikiye bölünerek, sabah ve akşam verilen 10 cc'lik kolesterol süspansiyonunun içinde, oral gavaj yoluyla verilmiştir.

4. grupta (n=5) bulunan tavşanlara 12 hafta boyunca standart normal diyetle beraber, 2. gruptaki hayvanlara yapılan işlemlerin aynısı yapılırken, ilave olarak *P. major* yaprağı kuru ham ekstresi, kg başına 0,5 g'dan hesaplanıp günlük doz ikiye bölünerek, sabah ve akşam verilen 10 cc'lik kolesterol süspansiyonunun içinde, oral gavaj yoluyla verilmiştir.

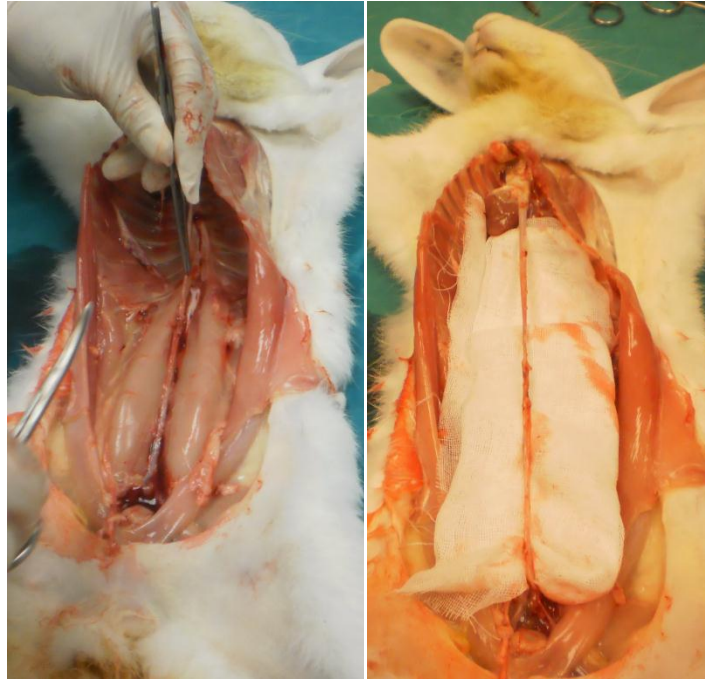
5. grupta (n=5) bulunan tavşanlara 12 hafta boyunca standart normal diyetle beraber, 2. gruptaki hayvanlara yapılan işlemlerin aynısı yapılırken, ilave olarak *P. major* yaprağı kuru ham ekstresi, kg başına 1 g'dan hesaplanıp günlük doz ikiye bölünerek, sabah ve akşam verilen 10 cc'lik kolesterol süspansiyonunun içinde, oral gavaj yoluyla verilmiştir.



Şekil 3.3: Tavşanlara oral gavaj yoluyla kolesterol süspansiyonu ile aynı enjektörde *P. major* yaprağı ekstresi uygulanması.

Gruplardaki bütün hayvanlardan; başlangıçta, 15. günde, deney süresinin ortasında ve ötanazi yapılmadan önce, femoral ven paketlerinden kan örnekleri alınıp serumları

ayrılmış ve -80 C^o'de saklamaya alınmıştır. Deney sonucunda, bütün hayvanlara, genel anestezi altında (Xylazine 5 mg/kg IM, Ketamine 45 mg/kg IM), intrakardiyak kan alınarak ötanazi uygulanmış, kalpten çıkış yerinden başlayarak aortik ark, torasik aort ve abdominal aort kısımları dahil olmak üzere aortları bir bütün halinde çıkartılmış ve diğer organları da alınarak, hepsi uygun şartlarda saklamaya alınmıştır (şekil 3.4).



Şekil 3.4: Tavşanların aortlarının çevre dokulardan uzaklaştırılarak açığa çıkarılması.

Tüm hayvanlardan, ışık mikroskobu ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmek amacıyla, aortik ark ayrımından itibaren 0,5 cm uzunluğunda damar örnekleri alınmıştır. Alınan bu aort parçalarının bir bölümü, histopatolojik incelemenin ışık mikroskopisi aşaması için tespit amacıyla % 10'luk fosfat tamponlu formalin solüsyonuna konularak ayrılmıştır. Bu aort parçalarının 1 mm³ hacmindeki bir kısmı da histopatolojik incelemenin TEM aşaması için % 2,5'luk gluteraldehit içerisine alınmıştır. Geriye kalan aortun, aortik ark ile renal arter ayrımına kadar olan torasik kısmı ise bir bütün halinde, aterosklerotik plakların histolojik boyamalarla, ışık mikroskopisiyle yüzey alanı incelemeleri için kullanılmak üzere % 10'luk fosfat tamponlu formalin solüsyonuna konularak ayrılmıştır. Aortların geriye kalan

abdominal kısımlarının bir bölümü % 10'luk fosfat tamponlu formalin solüsyonuna konularak ayrılmış ve diğer bölümü ise herhangi bir koruyucu kullanmadan, biyokimyasal çalışmaların yapılacağı zamana kadar -80 C°'de saklamaya alınmıştır. Ayrıca hayvanlardan alınan kalp, karaciğer, akciğer, böbrek, testis ve kas dokularından alınan örneklerin bir kısmı % 10'luk fosfat tamponlu formalin solüsyonuna konularak ayrılmış, bir kısmı da herhangi bir koruyucu kullanmadan -80 C°'de saklamaya alınmıştır.

Çalışmada analizi yapılan parametrelerden homosistein, CRP, TK, LDL kolesterol, HDL kolesterol, TG, AST, ALT, BUN ve KREA düzeyleri hayvanların sadece serum örneklerinde çalışılmıştır. Hem serum, hem de aort doku örneklerinde çalışılanlar ise; ADMA, NO*, NOS, GPO, KAT, KO ve MDA düzeyleridir. SOD düzeyi ise sadece aort doku örneklerinde çalışılmıştır.

Dokulardaki çalışmalar için, aort dokuları -80 C°'deki derin dondurucudan çıkarılıp çözöldükten sonra, önce hassas terazide tartılmış ve sonra ağırlıklarının beş katı hacminde (% 20 w/v) SF içinde homojenize edilmiştir. Homojenize etme işleminden sonra, elde edilen doku homojenatları, 4000 devir/dk'da 10 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatant kısımlarında Lowry Yöntemi'yle protein konsantrasyonları belirlenmiş ve en düşük protein düzeyine sahip süpernatant örneği baz alınarak, uygun dilüsyonlarla tüm örneklerdeki protein konsantrasyonları birbirine eşitlenmiş ve dokulardaki analizler bu örneklerde yapılmıştır.

3.3. Gereçler

Cihazlar:

Sanyo Ultra Low MDF-U4086S marka derin dondurucu (-80 C°), Altus AL380 marka buzdolabı (+4 C°), Arçelik marka buzdolabı (+4 C°), hassas elektronik tartı (Sartorius Basic marka), sabit/ayarlanabilir pipetler (Axygen, Socorex ve Brand marka), spektrofotometre (Helios-α, Unicam marka), Sorvall RMC 14 marka

santrifüj, Harrier 18/80 marka soğutmalı santrifüj, Heraeus Labofur 200 marka soğutmalı santrifüj, Heidolph DIAX 900 marka homojenizatör, Whirlmix 20 W vorteks, rotary evaporatör - Buchi marka, rotary evaporator - 1000 lt hacimli - max. 760 mmHg basınçlı (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü bünyesinde), su banyosu (Grant Ins marka), orbital çalkalayıcı (BOECO (OS-20) marka), ELISA okuyucu ve yıkayıcı (ChemWell® 2910 Automated EIA and Chemistry Analyzer), Beckman Coulter Unicell DxC 800 Synchron Clinical System otoanalizör cihazı, HPLC (High-performance liquid chromatography-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) cihazı (Shimadzu, RF-20A model), Leica marka RM 2125RT model mikrotom, Zeiss Axio Scope A1 marka ışık mikroskobu, Canon E 550E marka dijital fotoğraf makinası, LEO 906E marka transmisyon elektron mikroskobu.

Kimyasal maddeler:

Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler Sigma, Merck, Amresco, Fluka, Thermo Fisher Scientific firmalarından temin edilmiştir.

3.4. Protein Miktarı Ölçüm Yöntemi (Lowry Yöntemi)

Aort dokusu homojenatlarının santrifüjünden elde edilen süpernatantlarda, protein konsantrasyonlarının tayin edilmesi işleminde Lowry protein ölçüm yöntemi kullanılmıştır (225). Spektrofotometrik bir ölçüm yöntemi olan deneyin prensibi; fosfomolibdik asit ve fosfotungstik asitin, Cu^{+2} – protein kompleksi ile reaksiyonu sonucunda mavi renk oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu tepkimenin gerçekleşmesinde, proteinlerin triptofan ve tirozin içeren bakiyeleri etkili olmaktadır. Oluşan bu renkli bileşiğin absorbansı (optik dansitesi (OD)), spektrofotometrede; 700 nm dalga boyunda ölçülmektedir. Elde edilen sonuç, protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Lowry protein ölçüm yönteminde kullanılan reaktiflerin içeriği:

A reaktifi: 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ile 1 g sodyum sitratın 100 ml distile suda çözülmesiyle elde edilmektedir.

B reaktifi: 0,1 N 1 L NaOH içinde, 20 g Na_2CO_3 çözülerek elde edilmektedir.

C reaktifi: 1 ml A reaktifi ile 50 ml B reaktifi karıştırılarak elde edilmektedir.

D reaktifi: 10 ml Folin-Ciocalteu reaktifine, 10 ml distile su ilave edilmesiyle hazırlanmaktadır.

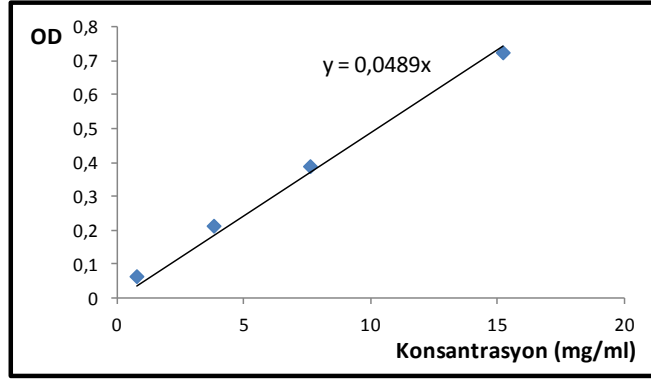
Folin-Ciocalteu reaktifi: 700 ml distile suda, 25 g sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 100 g sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) çözülür. Ardından 100 ml derişik HCl ve 50 ml o- fosforik asit (% 85'lik) ilave edilir. Sonra 10 saat süreyle hafif ateşte kaynatılır. Kaynatma işleminden sonra 150 g lityum sülfat (Li_2SO_4) ve 50 ml H_2O eklenir. Üç damla brom damlatıldıktan sonra, karışım 15 dk süreyle kaynatılır. Soğutma işleminin ardından karışım distile suyla 1 lt'ye tamamlanır.

Tablo 3.1: Lowry protein ölçüm yöntemine ait protokol.

	KÖR	NUMUNE (N)
SÜPERNATAN	-	10 µl
DİSTİLE SU	500 µl	490 µl
C REAKTİFİ	2,5 ml	2,5 ml

10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 0,25 ml D reaktifi, numune ve kör tüplerine ilave edilir. Karışım tekrar 30 dk süreyle oda ısısında bekletilir. Ardından spektrofotometrede 700 nm dalga boyunda kör ve numunenin absorbansı distile suya karşı okunur. Bu deney için hazırlanan albümin standartlarının optik dansite değerlerinden yararlanılarak çizilen 'Standart grafiği' kullanılır (şekil 3.5). Buna göre hesaplanan 'Faktör' değeri 20'dir ve protein konsantrasyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanır.

$$\text{Protein konsantrasyonu (mg/ml)} = (\text{OD}_N - \text{OD}_{\text{Kör}}) \times 20$$



Şekil. 3.5: Lowry protein standart grafiği. Bu grafikten faydalanılarak faktör değeri 20 olarak alınmıştır.

3.5. Serumda ve Aort Dokusunda Ölçümü Yapılan Çeşitli Parametrelere Ait Yöntemler

3.5.1. Malondialdehid (MDA) Miktarı Ölçüm Yöntemi

MDA, lipid peroksidasyonunun son ürünü olduğu için, oksidatif stres göstergesi olarak sıkça kullanılan bir parametredir. MDA, tiyobarbitürik asit (TBA) ile yüksek sıcaklık altında asidik ortamda tepkimeye girerek pembe renkli bir bileşik oluşturmaktadır. Bu bileşiğin optik dansitesi 532 nm dalga boyunda ölçülerek MDA düzeyi hesaplanmaktadır. MDA dışında çeşitli maddeler de bu tepkimeyi verebileceğinden TBA ile tepkimeye giren maddeler anlamında TBARS olarak da isimlendirilmektedir (226).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu (pH 6; 100 mM): 2,13 g Na_2HPO_4 ve 11,56 g KH_2PO_4 tartılarak distile suda çözüldükten sonra hacim distile suyla 1 L'ye tamamlanır.

Trikloroasetik asit (TCA; % 20 w/v): 500 mL 0,6 N HCl içinde 100 g katı TCA çözülerek hazırlanır.

TBA çözeltisi (% 2 w/v): 200 mg katı TBA 10 mL distile suda çözülür.

Etil alkol (% 95; v/v).

Tablo 3.2: MDA ölçüm yöntemine ait protokol.

	NUMUNE	KÖR
SÜPERNATAN	100 µl	100 µl
ETİL ALKOL	1 ml	1 ml
FOSFAT TAMPUNU	1 ml	1 ml
TCA	1 ml	1 ml
TBA	1 ml	-

30 dakika boyunca kaynar suda inkübe edilen deney tüpleri 4000 devirde 20 dk süreyle santrifüj edilir. Spektrofotometrik ölçüm sırasında kör tüplerine 1 ml TBA çözeltisi konulur. 532 nm dalga boyunda numune ve kör tüplerindeki çözeltilerin absorbansları distile suya karşı spektrofotometrik olarak ölçülür.

Bu ölçümde MDA standardı olarak tetraetoksipropan (TEP) kullanılır (% 96; d=0,92; MA= 220,3).

TEP molaritesinin hesaplanması:

$0,92 \times 1000 = 920 \text{ g}$ (TEP çözeltisinin 1 litresinin ağırlığı)

$920 : 100 \times 96 = 883,2 \text{ g}$ (1 litre çözeltideki TEP miktarı)

$883,2 : 220,3 = 4 \text{ mol TEP}$ (1 litre çözeltide 4 mol TEP olduğu için, çözeltideki TEP'in konsantrasyonu 4 molar (M)'dır.

4 M'lık çözelti etil alkolle 400.000 kat dilüe edilerek, 10 µM'lık standart çözelti elde edilir. Aynı deney protokolü standart ve standart körü için uygulanır ve spektrofotometrede absorbanslar okunur. Buna göre 'Faktör' değeri aşağıda görüldüğü şekilde 161,3 olarak hesaplanır.

Standartın optik dansitesi (OD_S) = 0,152

Standart körünün optik dansitesi = 0,090

$\Delta OD_S = 0,062$

MDA konsantrasyonu (nmol/ml) = $\Delta OD_N \times \text{Standartın konsantrasyonu} / \Delta OD_S$

= $\Delta OD_N \times 10 \text{ µM} / 0,062$

= $\Delta OD_N \times 161,3$

Elde edilen MDA değeri "nmol/ml" olarak belirtilir. Dokular için kullanılacak formül için ise protein konsantrasyonuna (protein kons.) bölünür ve ölçüm sonucu "nmol/mg" olarak belirtilir.

$$\text{MDA (nmol/ml)} = \Delta\text{OD} \times 161,3$$

$$\text{MDA (nmol/mg)} = \Delta\text{OD} \times 161,3 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

Çalışmamızda serum ve süpernatantlar 100 µl yerine 200 µl olarak alınmıştır. Buna göre hesaplama serumda ve aort dokusunda aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

$$\text{MDA (nmol/ml)} = \Delta\text{OD} \times 161,3 \times (1/2)$$

$$= \Delta\text{OD} \times 80,65$$

$$\text{MDA (nmol/mg)} = \Delta\text{OD} \times 161,3 \times (1/2) / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

$$= \Delta\text{OD} \times 80,65 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

3.5.2. Ksantin Oksidaz (KO) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

KO enzimi ksantini yıkıma uğratarak ürik asit meydana getirmektedir. Bu ölçüm yönteminin prensibi KO enzim aktivitesi sonucunda açığa çıkan ürik asidin optik dansitesinin 293 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Birim zamanda oluşan ürik asit miktarı üzerinden KO aktivitesi hesaplanır (227).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu (pH 7,5; 0,5 mM Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA); 50 mM fosfat): 93 mg EDTA (disodyum tuzu, dihidrat), 3 g Na₂HPO₄ ve 0,5 g KH₂PO₄ distile suda çözülür ve hacim 500 ml'ye tamamlanır.

Ksantin çözeltisi (2 mM): 25 ml fosfat tamponunda 7,6 mg ksantin çözülür.

Tablo 3.3: KO aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol.

FOSFAT TAMPONU	2,8 ml
KSANTİN ÇÖZELTİSİ	0,1 ml
SÜPERNATAN	0,1 ml

Tablo. 3.3'te gösterilmiş olan deney protokolü hazırlandıktan sonra örneklerin optik dansitesi 293 nm dalga boyunda kuvartz küvet kullanılarak distile suya karşı oda sıcaklığında 1. ve 20. saat sonunda ölçülür. 1. ve 20. saatler arasındaki ölçümler arasındaki optik dansite farkı (ΔOD) ve ürik asitin molar absorpsiyon katsayısından faydalanılarak aşağıdaki formüle göre KO enzim aktivitesi hesaplanır:

$$\epsilon_{\text{ürik asit}}: 10^4 \text{ L x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1}$$

$$\Delta OD_{\text{ürik asit}} = \epsilon_{\text{ürik asit}} \times C_{\text{ürik asit}} \times l$$

$$C_{\text{ürik asit}} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} / (\epsilon_{\text{ürik asit}} \times l)$$

$$C_{\text{ürik asit}} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} / (10^4 \text{ L x mol}^{-1} \text{ x cm}^{-1} \times 1 \text{ cm})$$

$$C_{\text{ürik asit}} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} / 10^4 \text{ L/mol} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} \times 10^{-4} \text{ mol/L}$$

$$C_{\text{ürik asit}} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} \times 10^2 \text{ } \mu\text{mol/L}$$

1 IU KO aktivitesi, IU'nun tanımı gereği 1 $\mu\text{mol/dk}$ ürik asit oluşmasını sağlayan enzim aktivitesi olduğundan 1 IU/L KO = 1 $\mu\text{mol}/(\text{dk} \times \text{L})$ ürik asit oluşumuna karşılık gelmektedir.

$$KO \text{ (IU/L)} = \Delta OD_{\text{ürik asit}} \times 10^2 \text{ } \mu\text{mol/L} \times [1/t \text{ (dakika}^{-1})] \times 30 \text{ (Seyreltme Oranı)}$$

Tepkime süresi 1140 dk (1 ve 20. saatler arası) olduğundan; serumda ve dokuda KO aktiviteleri şu formüllere göre hesaplanır:

$$KO \text{ (mIU/mL)} = (\Delta OD/1140) \times 3000$$

$$KO \text{ (mIU/mg)} = (\Delta OD/1140) \times 3000 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

3.5.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

SOD, $O_2^{\bullet-}$ radikalini substrat olarak kullanmaktadır. Bu deneyin prensibi; ksantin-ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan $O_2^{\bullet-}$ radikalinin ortamda bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğini indirgeyerek, menekşe renkli formazan bileşiği oluşturması esasına dayanmaktadır. Bu bileşik spektrofotometrede 560 nm dalga boyunda maksimum absorbands vermektedir. Reaksiyon ortamına ilave edilen (doku homojenatında bulunan) SOD enzimi, oluşan $O_2^{\bullet-}$ radikallerini ortamdaki uzaklaştırarak, aktivitesiyle doğru orantılı olarak NBT'nin inhibisyonunu engellemektedir. Ortama SOD ilave edilerek bulunan absorbands değeri, enzimin ilave edilmediği kör deneyinin absorbandsıyla karşılaştırılarak enzim aktivitesi hesaplanmaktadır (228, 229).

Kullanılan reaktiflerin içeriği:

Ksantin oksidaz çözeltisi: 3,2 M, 1 ml amonyum sülfat içinde, 10 µl KO çözülür.

$CuCl_2$ çözeltisi: 100 ml distile suda 108 mg $CuCl_2$ çözülür.

Reaktif 1: Aşağıdaki çözeltiler ayrı ayrı hazırlandıktan sonra birleştirilir. Toplam hacim 490 ml'dir.

9,1 mg ksantin, 1 N NaOH'den birkaç damla distile su içine damlatıldıktan sonra bu çözeltiliye ilave edilerek çözülür, daha sonra distile su ile hacim 200 ml'ye tamamlanır.

100 ml distile suda 25 mg EDTA çözülür.

100 ml distile suda 12,3 mg NBT çözülür.

30 ml distile suda 30 mg sığır albümini çözülür.

60 ml distile suda 2,54 g Na_2CO_3 çözülür.

En son işlem olarak tüm bu çözeltiler birleştirilerek Reaktif 1 elde edilir.

Tablo 3.4: SOD aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol.

	NUMUNE (N)	KÖR
REAKTİF 1	2,75 ml	2,75 ml
SÜPERNATAN	100 µl	-
KO	50 µl	50 µl

Tüpler oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir.

CuCl ₂	100 µl	100 µl
SÜPERNATAN	-	100 µl

Bir SOD ünitesi (U), NBT'nin indirgenmesini % 50 oranında inhibe eden enzim aktivitesi olarak tanımlanmaktadır. Kör ve numunelere ait absorbanlar spektrofotometrede 560 nm'de distile suya karşı okunduktan sonra SOD aktivitesi şu şekilde hesaplanır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(OD_{\text{Kör}} - OD_{\text{N}}) / OD_{\text{Kör}}] \times 100$$

$$\begin{aligned} \text{SOD aktivitesi (U/ml)} &= \% \text{ İnhibisyon} / (50 \times 0,1) \\ &= [(OD_{\text{Kör}} - OD_{\text{N}}) / OD_{\text{Kör}}] \times 100 / (50 \times 0,1) \\ &= [(OD_{\text{Kör}} - OD_{\text{N}}) / OD_{\text{Kör}}] \times 20 \end{aligned}$$

SOD'nin dokuya özgül aktivite formülü ise şöyledir:

$$\text{SOD aktivitesi (U/mg)} = [(OD_{\text{Kör}} - OD_{\text{N}}) / OD_{\text{Kör}}] \times 20 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

3.5.4. Katalaz (KAT) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

KAT, H_2O_2 'yi substrat olarak kullanır. Bu deneyin prensibi; KAT enziminin katalizlediği reaksiyon sırasında H_2O_2 'nin parçalanmasına eşlik eden absorbans azalmasının 240 nm'de spektrofotometrik olarak takip edilmesi esasına dayanır (230).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu: KH_2PO_4 ve Na_2HPO_4 kullanılarak 50 mM, pH 7 olan fosfat tamponu hazırlanır.

H_2O_2 çözeltisi: Stok H_2O_2 çözeltisinden (% 30 v/v) 0,2 ml alınır, 100 ml fosfat tamponu ile seyreltilir.

2,99 ml H_2O_2 çözeltisi, 0,01 ml serum (doku çalışmalarında süpernatant) ve 0,01 ml fosfat tamponu, kuvarz küvete konulur. Spektrofotometrede 240 nm dalga boyunda absorbans 1 dakika süreyle izlenir. Ortaya çıkan absorbans farkı (ΔOD) hesaplandıktan sonra KAT aktivitesi H_2O_2 'nin molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak hesaplanır. Buna göre, 'Faktör' değeri 7320 olarak bulunur.

$$\text{KAT aktivitesi (IU/ml)} = (\Delta OD/dk) \times 7320$$

Çalışmamızda serumlar 0,01 ml yerine 0,05 ml olarak alınmıştır. Süpernatant hacimlerinde değişiklik yapılmamıştır. Buna göre hesaplama serumda ve aort dokusunda aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

$$\text{KAT aktivitesi (IU/ml)} = (\Delta OD/dk) \times 7320 \times (1/5)$$

$$\text{KAT aktivitesi (IU/mg)} = (\Delta OD/dk) \times 7320 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

3.5.5. Glutasyon Peroksidaz (GPO) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

GPO; $2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$ reaksiyonunu katalizlemektedir. Döngünün devam edebilmesi için yükseltgenmiş GSH'nin tekrar indirgenmesi gerekmektedir. Glutasyon redüktaz enzimi, yükseltgenmiş GSH'ı indirgerken aynı zamanda NADPH'ı yükseltgeyerek, NADP'ye dönüşümünü sağlamaktadır (231). Spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda NADPH absorbans vermektedir. NADP'ye dönüşüm nedeniyle absorbanstaki azalma GPO aktivitesinin ölçümüne olanak sağlamaktadır.

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Fosfat tamponu: 2,08 g EDTA, 4,2 g Na_2HPO_4 ve 2,72 g KH_2PO_4 1 litre distile suda çözülerek hazırlanır.

Glutasyon çözeltisi: 250 mg glutasyon 5 ml fosfat tamponunda çözülür.

NADPH: 15 mg NADPH 2,5 ml fosfat tamponunda çözülür.

Glutasyon redüktaz enzimi: 3,2 M, 1 ml amonyum sülfatta, 10 µl glutasyon redüktaz enzimi seyreltilir.

H_2O_2 çözeltisi: 5 ml fosfat tamponuna, 15 µl H_2O_2 stok çözeltisi (% 30 v/v) ilave edilir.

Sodyum azid: 5 ml fosfat tamponunda 65 mg sodyum azid çözülür.

Tablo 3.5: GPO aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol.

FOSFAT TAMPONU	2,5 ml
GSH	100 µl
NADPH	50 µl
GSH REDÜKTAZ	100 µl
SODYUM AZİD	100 µl
SÜPERNATAN	100 µl

Spektrofotometre 340 nm dalga boyuna ayarlanır ve fosfat tamponuyla sıfırlanır. Protokoldeki maddeler küvete konulduktan sonra 1 dakika süreyle absorbans takip edilir ve böylece kör değeri elde edilir. Aynı işlem 100 µl H₂O₂ çözeltisi eklenerek tekrar edilir ve bu kez numune değeri bulunur. Numune ile 1 dk'da elde edilen ΔOD değerinden, kör ile 1 dk'da elde edilen ΔOD değeri çıkarılarak absorbans farkı (ΔOD) hesaplandıktan sonra GPO aktivitesi NADPH'ın molar absorpsiyon katsayısı (ε = 6,22.10³ L/(mol.cm)) kullanılarak hesaplanır. Buna göre, Faktör değeri 4800 olarak bulunur.

GPO aktivitesi (IU/L) :

$$\Delta OD \times (1/\epsilon_{NADPH}) \times (V_{toplaml}/V_{numune}) \times (1/zaman (dk)) \times \text{Seyreltme Faktörü}$$

$$\text{GPO aktivitesi (IU/L)} = (\Delta OD/dk) \times 4800$$

$$\text{GPO aktivitesi (mIU/mg)} = (\Delta OD/dk) \times 4800 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

3.5.6. Nitrik Oksit (NO') Miktarı Ölçüm Yöntemi

Deneyin prensibi; NO'nun asidik ortamda, sülfanilik asiti diazotizasyonu ve takiben naftiletilendiamin ile reaksiyona girmesi esasına dayanmaktadır. Sonuçta ortaya çıkan renkli bileşiğin absorbansı, spektrofotometrede 540 nm'de okunur. Ölçülen değer NO konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (232, 233).

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Sülfanilik asit çözeltisi: 10 ml distile suda 180 mg sülfanilik asit çözülür.

Naftiletilendiamin çözeltisi: 10 ml distile suda 162 mg naftiletilendiamin çözülür.

Hidroklorik asit (HCl): 10 ml distile suda 50 µl HCl çözülür.

200 µl numuneye % 20'lik 20 µl TCA eklenir, 5 dakika süreyle beklenir. Daha sonra 200 µl distile su ilave edilir. 5 dakika süreyle 5000 devirde santrifüj edildikten sonra süpernatant alınır ve içine kadmiyum (Cd) metali konulur. 24 saat bekletildikten sonra aşağıdaki protokol uygulanır.

Tablo 3.6: NO[•] ölçüm yöntemine ait protokol.

	KÖR	NUMUNE
SÜZÜNTÜ	100 µl	100 µl
HCl	250 µl	250 µl
SÜLFANİLİK ASİT	250 µl	250 µl
NAFTİETİLENDİAMİN	-	250 µl
DİSTİLE SU	250 µl	-

Son işlemden sonra tüpler 10 dk oda sıcaklığında bekletilir ve daha sonra spektrofotometrede, 540 nm’de distile suya karşı okunur. NO[•] konsantrasyonu, hazırlanan standartla elde edilen OD değerinden yararlanılarak hesaplanır. Buna göre bulunan 'Faktör' değeri 250'dir.

$$\text{NO}^{\bullet} \text{ konsantrasyonu (mM)} = (\text{OD}_N - \text{OD}_{\text{Kör}}) \times 250$$

3.5.7. Nitrik Oksit Sentaz (NOS) Aktivitesi Ölçüm Yöntemi

Nitrik oksit, L-argininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla oluşmaktadır. Bu deneyin prensibi, NO[•] deneyinde olduğu gibi L-argininden oluşan NO[•]’nun asidik ortamda sülfanilik asiti diazotizasyonu ve naftietilendiamin ile reaksiyona girmesi esasına dayanmaktadır (232, 233). Reaksiyonda oluşan renkli çözeltinin absorbansı spektrofotometrede, 540 nm dalga boyunda okunur. Ölçülen değer NO[•] konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Birim zamanda oluşan NO[•] miktarı üzerinden NOS aktivitesi hesaplanır.

Deneyde kullanılan reaktiflerin içeriği:

Substrat çözeltisi: 10 ml distile suda 700 mg arginin çözülür.

Sülfanilik asit çözeltisi: 10 ml distile suda 180 mg sülfanilik asit çözülür.

Naftietilendiamin çözeltisi: 10 ml distile suda 162 mg naftietilendiamin çözülür.

HCl: 10 ml distile suda 50 µl HCl çözülür.

Tablo 3.7: NOS aktivitesi ölçüm yöntemine ait protokol.

	KÖR	NUMUNE	STANDART KÖRÜ	STANDART
STANDART	-	-	-	100 µl
NUMUNE	100 µl	100 µl	-	-
ARGİNİN	-	100 µl	-	-
DİSTİLE SU	100 µl	-	200 µl	100 µl

Tüpler oda sıcaklığında 1 saat bekletilir.

% 20 TCA	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl
ARGİNİN	100 µl	-	100 µl	100 µl
DİSTİLE SU	-	100 µl	-	-

Tüpler oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir ve 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alınır ve içine Cd konulan tüpler 24 saat bekletilir ve Cd'lar çıkartıldıktan sonra çalışmaya aşağıdaki şekilde devam edilir.

SÜZÜNTÜ	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl
HCl	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
SÜLFANİLİK ASİT	250 µl	250 µl	250 µl	250 µl
NAFTİETİLENDİAMİN	-	250 µl	250 µl	250 µl
DİSTİLE SU	250 µl	-	-	-

Son işlemten sonra tüpler oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilir. Daha sonra spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda absorbanlar okunur. Standart olarak sodyum nitroprussid kullanılır. NOS aktivitesi standardın optik dansite değerinden yararlanılarak ve bir saatlik inkubasyon süresi dikkate alınarak hesaplanır. Buna göre Faktör değeri 37,5 olarak bulunur.

$$\text{NOS aktivitesi (IU/ml)} = (\Delta\text{ODN} - \Delta\text{ODKör}) \times 37,5$$

$$\text{NOS aktivitesi (IU/mg)} = (\Delta\text{ODN} - \Delta\text{ODKör}) \times 37,5 / \text{Protein kons. (mg/ml)}$$

3.5.8. ADMA Miktarı Ölçüm Yöntemi

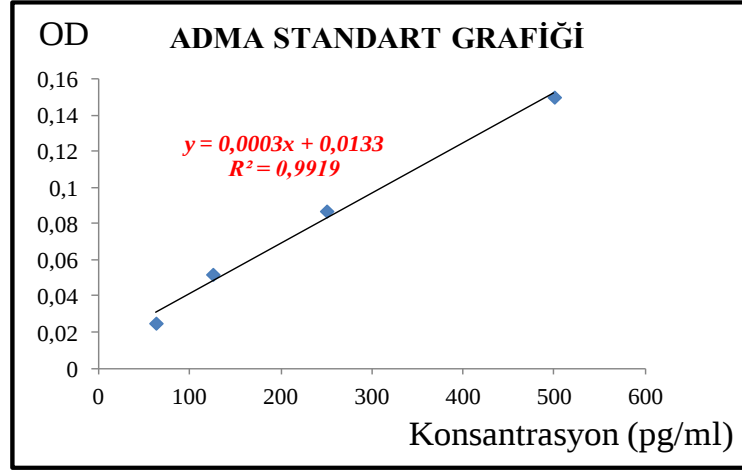
'Rabbit Asymmetrical Dimethylarginine (ADMA) ELISA Kit' (Cusabio®) ile, tavşanların serum ve aort dokusunda ELISA yöntemiyle kit prospektüsüne uygun olarak çalışılmıştır. Bu kitin ADMA saptama aralığı: 62,5 - 4.000 pg/ml'dir.

Kitin çalışma içi (intra-assay) kesinliği : % CV < % 8

Kitin çalışmalar arası (inter-assay) kesinliği : % CV < % 10

Yöntem, yarışmalı inhibisyonlu enzim immün ölçüm tekniğine dayanmaktadır. Bu kitte bulunan, kuyucuklardan oluşan mikrotitrasyon plakası ADMA ile önceden kaplanmış bir haldedir. Standartlar veya örnekler kendilerine ait kuyucuklara, ADMA'ya özgül antikorlarla konjuge edilmiş HPR ('Horseradish' Peroksidaz) ile birlikte konulur. Hemen ardından kuyucuklarda, önceden kaplanmış ADMA ile örnekte bulunan ADMA arasında yarışmalı bir inhibisyon reaksiyonu başlar. Sonra, kuyucuklara, HPR için bir substrat olan TMB (3',5,5'-Tetramethylbenzidine) solüsyonu eklenir ve örnekte bulunan ADMA miktarı ile ters orantılı olacak şekilde bir renk oluşumu gerçekleşir. Daha sonra kuyucuklara eklenen durdurma solüsyonu ile renk oluşumu durdurulur ve oluşan renk yoğunluğunun optik dansitesi mikropilaka okuyucu ile 450 nm'de ölçülür.

Deney sonunda, elde edilen standart optik dansiteleri ve kitte belirtilen karşılık konsantrasyonları kullanılarak ADMA standart grafiği çizilmiştir (şekil 3.6). Bu standart grafiğinden de faydalanarak örnek optik dansiteleri, pg/ml'ye çevrilerek, örneklerin ADMA konsantrasyonları tespit edilmiştir.



Şekil. 3.6: ADMA standart grafiğı.

3.6. Biyokimyasal Parametrelerin Analizi

Tavşanların serumlarında, TK, LDL kolesterol, HDL kolesterol, TG, AST, ALT, BUN, KREA ve CRP seviyeleri, 'Beckman Coulter Unicell DxC 800 Synchron Clinical System' cihazında, homosistein seviyeleri ise HPLC (High-performance liquid chromatography-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) cihazında (Shimadzu, RF-20A model) çalışılmıştır. Kullanılan kitlerin prospektüslerine göre çalışılan parametrelerin prensipleri şu şekildedir:

TK ölçümü: Reaksiyonda, kolesterol esterase (CE) kolesterol esterlerini serbest kolesterol ve yağ asitlerine hidrolizler. Serbest kolesterol, kolesterol oksidaz (CO) ile kolesten-3-on ve hidrojen peroksida yükseltgenir. Peroksidaz, renkli bir kuinonimin ürünü üretmek için hidrojen peroksidin 4-aminoantipirin (4-AAP) ve fenol ile reaksiyonunu katalize eder. Cihaz, uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 100 kısım reaktiftir. Sistem 520 nm'deki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki TK konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından TK konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

LDL kolesterol ölçümü: Bu direkt LDL kolesterol ölçümü yöntemi, çalışma dışı ön muamele veya santrifüj adımları gerektirmeyen homojen bir testtir. Yöntem sadece LDL olmayan lipoprotein partiküllerini çözündüren ve renksiz bir reaksiyon oluşturmak için kolesterol esteraz ve kolesterol oksidazla reaksiyona girmesi için HDL kolesterolü serbest bırakan bir deterjana dayanmaktadır. İkinci bir deterjan kalan LDL partiküllerini çözdürür ve bir kromojenik bağlayıcı renk oluşumunu sağlar. LDL reaktifi, kolesterol konsantrasyonunun bir zamanlı bitiş noktası yöntemiyle ölçülmesinde kullanılır. Cihaz, uygun LDL kolesterol numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 93 kısım reaktiftir. Sistem 560 nm'deki absorbanstaki değişikliği takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki LDL kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından LDL kolesterol konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

HDL kolesterol ölçümü: Bu direkt HDL kolesterol ölçümü yöntemi, çalışma dışı ön muamele veya santrifüj adımları gerektirmeyen homojen bir testtir. Yöntem sadece HDL lipoprotein partiküllerini çözündüren ve renkli bir ürün veren kromojenlerin varlığında kolesterol esteraz ve kolesterol oksidazla reaksiyona girmesi için HDL kolesterolü serbest bırakan bir deterjana dayanmaktadır. Bu deterjan aynı zamanda kolesterol enzimlerinin LDL, VLDL ve şilomikronlarla olan reaksiyonunu, onların yüzeylerine tutunarak inhibe eder. Reaksiyonda bulunan bir polianyon; LDL, VLDL ve şilomikronlarla kompleks oluşturarak HDL kolesterol testi için seçiciliği artırır. HDL reaktifi, kolesterol konsantrasyonunun bir zamanlı bitiş noktası yöntemiyle ölçülmesinde kullanılır. Cihaz, uygun HDL kolesterol numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 93 kısım reaktiftir. Sistem 560 nanometredeki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından HDL-kolesterol konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

TG ölçümü: Numune içindeki TG, lipazın etkisiyle gliserol ve serbest yağ asitlerine hidroliz olur. Gliserol kinaz (GK), gliserofosfat oksidaz (GPO) ve horseradish peroksidaz (HPO) kullanılan birleştirilmiş üç enzimatik adımdan bir seri 3,5-dikloro-2-hidroksibenzensülfonik asidin (DHBS) 4-aminoantipirin ile oksidatif birleşmesine neden olup, kırmızı bir kuinonimin boya oluşur. Cihaz, uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 100 kısım reaktiftir. Sistem 520 nm'deki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki TG konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve Sistem tarafından TG konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

AST ölçümü: Test reaksiyonunda, AST; L-aspartat ve alfa-ketoglutaratın oksaloasetat ve L-glutamata tersine çevrilebilir transaminasyonunu katalize eder. Daha sonra oksaloasetat β -Nikotinamid Adenin Dinükleotidin (indirgenmiş formu) (NADH) β -Nikotinamid Adenin Dinükleotide (NAD) eş zamanlı yükseltgenmesi ile birlikte malat dehidrojenaz (MDH) varlığında malata indirgenir. Cihaz, uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 11 kısım reaktiftir çözeltilidir. Sistem sabit bir zaman aralığı içinde 340 nanometredeki absorbans değişikliğini hızını takip eder. Absorbanstaki değişikliğin hızı numunedeki AST aktivitesi ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından AST aktivitesinin hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

ALT ölçümü: Reaksiyonda, alanin aminotransferaz; L-alanin ve alfa-ketoglutaratın piruvat ve L-glutamata tersine çevrilebilir transaminasyonunu katalize eder. Daha sonra piruvat indirgenmiş β -nikotinamid adenin dinükleotidin (NADH) β -nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) eş zamanlı yükseltgenmesi ile birlikte laktat dehidrojenaz (LDH) varlığında laktata indirgenir. Cihaz, uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 11 kısım reaktiftir. Sistem 340 nanometredeki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki ALT aktivitesi ile doğru orantılıdır ve Sistem tarafından ALT aktivitesinin hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

BUN ölçümü: Reaksiyonda, üre üreaz ile amonyak ve karbon dioksit hidroliz olur. Glutamat dehidrojenaz (GLDH) indirgenmiş β -nikotinamid adenin dinükleotittin (NADH) β -nikotinamid adenin dinükleotide (NAD) yükseltgenmesine eşlik eden amonyak ve α -ketoglutaratın glutamata yoğunlaşmasını katalize eder. Cihaz, uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde orantılar. Kullanılan oran serum veya plazma için bir kısım numuneye 100 kısım reaktiftir. Sistem 340 nm'deki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki üre azot konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından üre azot konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

Kreatinin ölçümü: Kreatinin reaktifi, kreatinin konsantrasyonunun modifiye edilmiş Jaffé yöntemiyle ölçülmesinde kullanılır. Reaksiyonda, kreatinin kreatinin-pikrat kompleksini oluşturmak için alkali çözelti içinde pikratla birleşir. Cihaz, uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran serum için bir kısım numuneye 11 kısım reaktiftir. Sistem 520 nm'deki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki kreatinin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından kreatinin konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

CRP ölçümü: CRP reaktifi, CRP konsantrasyonunun bir türbidimetrik yöntemle ölçülmesinde kullanılır. Reaksiyonda CRP, çözünmez antijen-antikor komplekslerini oluşturmak için spesifik antikorla birleşir. Cihaz, uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 26 kısım reaktiftir. Sistem 340 nm'deki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki CRP konsantrasyonu ile orantılıdır ve sistem tarafından CRP konsantrasyonunun tek noktalı ayarlanmış, önceden belirlenmiş kalibrasyon eğrisinde hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

3.7. Aort Dokusunun Histopatolojik Değerlendirmesi

Işık Mikroskobu (IM) İncelemeleri İçin Yapılan Çalışmalar:

Kontrol ve çalışma gruplarından alınan dokular tespit amacıyla % 10'luk fosfat tamponlu formalin solüsyonunda 24-72 saat süreyle fikse edilmiştir. Fikse olan dokuların takip işlemleri aşağıdaki protokole göre yapılmıştır:

% 10'luk Tamponlu Formalin İçin Uygulanan Takip Protokolü: Dehidratasyon işleminden sonra ksilen ile şeffaflaştırılan dokular iki değişim sıvı parafınle 60 C°'lik etüvde 3 saat inkübe edilmiştir. Sıvı parafın infiltrasyonunu takiben doku örnekleri sert parafın bloklara gömülmüştür. Parafın bloklar buzdolabı alt rafında (+4 C°) kesit alınana kadar bekletilmiştir. Kesit işlemine başlamadan önce -18 C°'ye alınan bloklardan Leica RM 2125RT model sliding mikrotom ile 4 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Sıcak su banyosundan lam üzerine alınan kesitler 60 C°'lik etüvde deparafinizasyon amacıyla 1 saat bekletilmiştir. Histolojik boyamaya hazır hale getirilen doku kesitlerine Hematoksilen-Eozin ve Mallory Azan boyaları uygulanmıştır.

Hematoksilen-Eozin (H-E) Boyama Protokolü:

- Ksilen ile deparafinizasyon
- % 100, % 96 ve % 75 etanol serisi ile hidratasyon
- Yıkama (çeşme suyunda)
- Hematoksilen solüsyonu, 1 dk
- Yıkama (çeşme suyunda)
- Eozin solüsyonu, 1 dk
- Yıkama (çeşme suyunda)
- % 75, % 96 ve % 100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan kullanarak lamelle kapama

Mallory Azan (M-A) Boyama Protokolü:

- Ksilen ile deparafinizasyon
- % 100, % 96 ve % 75 etanol serisi ile hidrasyon
- Yıkama (çeşme suyunda)
- % 0,1 Azokarmin G solüsyonu (60 C° etüvde 1 saat)
- Suda yıkama
- % 1 anilin alkolde farklıdırma
- % 1 asetik alkolde durulama
- % 5 fosfotungustik asitle mordanlama
- Suda yıkama
- % 0,25 anilin mavisi - % 1 Orange G solüsyonu (1 saat)
- Suda yıkama
- % 75, % 96 ve % 100 etanol serisi ile dehidrasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan kullanarak lamelle kapama

Boyanan preparatlar, Zeiss Axio Scope A1 marka ışık mikroskopuyla incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

İntima /Media kalınlık ölçümleri:

Her bir grup için H-E ile boyanan ve aterosklerotik plak oluşumu gözlenen bölgeden elde edilen örneklerin intima ve media tabakalarına ait ölçümler Axiovision bilgisayar programı kullanılarak ölçülmüş, intima/media oranları hesaplanmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Aterosklerotik Lezyon Alanının Analizi:

Torasik aorta örneğinin adventisya tabakasındaki yağ dokuları disseke edilmiş ve longitudinal olarak damar açılmıştır. Açılan damar Sudan IV boyası ile boyanmıştır.

Sudan IV Boyama Protokolü:

- Distile su, 2-3 dk
- % 80'lik etil alkol, 5 dk
- Boyama solüsyonu, 5-7 dk
- % 70'lik etil alkol, 3 dk
- Distile su, 5 dk

İşlemlerini takiben toplu iğne ile strafor tablaya düzgün şekilde açılan damar yüzeyinde Sudan IV ile kırmızı renge boyanan alanlar Canon E 550E marka dijital fotoğraf makinası ile görüntülenmiştir. Görüntüler Adobe Photo Shop CS5 programında standart image size ayarlarında kaydedilmiş ve Axiovision bilgisayar yazılım programı yardımıyla her görüntüde bulunan boyalı alanların yüzey ölçümleri yapılmıştır. Her bir damar için elde edilen veriler toplanarak total damar yüzey alanına oranlanmış ve yüzde olarak ifade edilmiştir.

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) İncelemeleri İçin Yapılan Çalışmalar:

Kontrol ve çalışma gruplarına ait aort dokularından 1 mm³ hacmindeki parçalar % 2,5'luk gluteraldehit içerisine alınmıştır. TEM için tespit ve takip işlemleri aşağıdaki sıra ile uygulanmıştır:

- 1. Tespit (ön tespit): 0,2 M fosfat tamponu içerisinde % 2,5 gluteraldehit ve % 2 paraformaldehit (pH= 7,2 - 7,4) (+4 C°'de 2-4 saat)
- 1. Yıkama: 0,1 M fosfat tamponunda (2 x 15 dk, rotatorda)
- 2. Tespit: 0,1 M fosfat tamponunda % 1 OsO₄ (rotatorda ve karanlıkta, 2 saat)
- 2. Yıkama: 0,1 M fosfat tamponunda (3 x 20 dk)
- Distile su ile yıkama
- Blok boyama: % 70 etanolde % 0,05 uranil asetat ve % 1 fosfotungustik asit (rotatorda ve karanlıkta, 2 saat)
- Dehidratasyon: % 70, % 96, % 100 etanol, propilenoksit

- 1:1 propilen / Araldite (rotatorda 1 saat)
- Araldite (2 saat)
- Bloklama: blok kalıbı içersine aort örnekleri konulmuş, üzerine araldite eklenmiştir.
- Polimerizasyon: hazırlanan bloklar 80 C°'de 1 gece süre ile tutulmuş, sonrasında etüv kapatılarak bloklar kendi halinde soğumaya bırakılmıştır.

Yarı İnce Kesit Boyama Protokolü:

- Ultramikrotom ile 700-1000 nm kalınlığında kesitler alınmıştır
- Kesitler ısıtıcıda kurutulmuştur
- Distile su içinde Toluidin mavisi / Azur II boyası (% 1 boraks, % 1 Toluidin mavisi, % 1 Azur II) ile boyanmıştır (50 – 60 C° ısıtıcıda boya kuruyana kadar)
- Distile su ile yıkanmıştır
- Kesitler tekrar ısıtıcıda bekletilmiştir
- Kurutma ve soğutma işlemleri uygulanmıştır
- Entellan ile kapatılmıştır.

Boyanan preparatlar kuruduktan sonra Zeiss Axio Scope A1 marka ışık mikroskopuyla incelenmiş ve fotoğraflanmıştır.

İnce Kesit Boyama Protokolü:

- Ultramikrotom ile 70 – 90 nm kalınlığında kesitler alınmıştır
- Kesitler boyama setine yerleştirilmiştir
- Distile suda 1-2 dk
- % 8'lik uranil asetatta 45 dk
- Distile suda 1-2 dk
- 0,1 N NaOH içerisinde yıkanmıştır
- % 0,7 kurşun sitrat / % 0,9 sodyum sitrat solüsyonunda 20 dk
- 0,1 N NaOH içerisinde yıkanmıştır
- Distile suda 1-2 dk

Boyanarak hazırlanan gridler kurumaları için kurutma kağıdına alınmış, daha sonra grid kutusuna yerleştirilmiştir. İncelemeler LEO 906E marka TEM ile yapılmıştır. Görüntülemeler Sharpeye CCD ve Image SP (Germany) dijital görüntüleme sistemi programı ile gerçekleştirilmiştir.

3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçların istatistiksel analizi ‘SPSS 15.0 for Windows’ paket programıyla yapılmıştır.

Parametrik test varsayımları sağlanmadığında, tanımlayıcı istatistikler; dağılımı normal olmayan değişkenler için median (min – maks) olarak gösterilmiştir. Gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkların önemliliği Kruskal Wallis Varyans Analizi testiyle araştırılmıştır. Kruskal Wallis Varyans Analizi ile ortancaların eşit olmadığı saptandığında “post - hoc” çoklu karşılaştırma yöntemi olarak, yanılma düzeyi aşağı çekilerek, Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Deney başlangıcındaki ve sonundaki, grup içi zamanlar arasında fark araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Wilcoxon testi uygulanmıştır. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Parametrik test varsayımları sağlandığında, tanımlayıcı istatistikler; dağılımı normal olan değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma olarak gösterilmiştir. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkların önemliliği ANOVA testiyle araştırılmıştır. ANOVA testinde, gruplar arasındaki farklılığı hangi grubun ortaya çıkardığını bulabilmek için “post-hoc” testlerinden Bonferroni yöntemi kullanılmıştır. Deney başlangıcındaki ve sonundaki, grup içi zamanlar arasında fark araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Paired t testi uygulanmıştır. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

Tablo 4.1: Aort dokusunda ADMA ve NO[•] seviyeleri ile NOS enzim aktiviteleri ve gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi.

		ADMA (pg/ml)	NO [•] (mM)	NOS (IU/mg)
		ort ± ss	ort ± ss	ort ± ss
1.G (n=6)		287,90 ± 62,49	20,04 ± 5,82	1,38 ± 0,20
2.G (n=5)		193,34 ± 23,80	24,95 ± 4,14	1,45 ± 0,25
3.G (n=5)		144,81 ± 83,10	29,20 ± 11,09	1,62 ± 0,28
4.G (n=5)		182,64 ± 47,54	33,65 ± 24,44	1,44 ± 0,21
5.G (n=5)		116,27 ± 27,13	14,25 ± 4,45	1,69 ± 0,33
p	1 vs 2	0,088	0,144	0,272
	1 vs 3	0,003		
	1 vs 4	0,042		
	1 vs 5	0,000		
	2 vs 3	1,000		
	2 vs 4	1,000		
	2 vs 5	0,350		
	3 vs 4	1,000		
	3 vs 5	1,000		
	4 vs 5	0,658		

Aort dokusunda; ADMA, NO[•] ve NOS testleri için gruplar arasında ortalamalar yönünden farkların önemliliği ANOVA testiyle araştırılmıştır. ADMA testi için ANOVA testinde, gruplar arasındaki farklılığı hangi grubun ortaya çıkardığını bulabilmek için “post-hoc” testlerinden Bonferroni yöntemi kullanılmıştır.

3., 4. ve 5. gruplardaki ADMA seviyeleri, en düşük 5. grupta olmak üzere, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük (p<0,05) bulunmuş ve tüm gruplar arasında

da en düşük ADMA değerine 5. grubun sahip olduğu tespit edilmiştir. NO[•] seviyelerinde ise tüm gruplar arasında en yüksek değere 4. grubun sahip olduğu, NOS seviyelerinde ise 5. grubun en yüksek değere sahip olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.2: Aort dokusunda SOD, KAT, GPO ve KO enzim aktiviteleri ile MDA seviyeleri ve gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi.

	SOD (U/mg)	KAT (IU/mg)	GPO (mIU/mg)	MDA (nmol/mg)	KO (mIU/mg)
	ort ± ss	ort ± ss	ort ± ss	medyan (min-maks)	ort ± ss
1.G (n=6)	4,60 ± 0,84	56,52 ± 22,01	32,29 ± 6,02	0,703 (0,370-0,851)	0,033 ± 0,005
2.G (n=5)	4,76 ± 0,37	52,38 ± 14,94	32,15 ± 4,29	1,036 (0,444-1,036)	0,033 ± 0,011
3.G (n=5)	4,29 ± 0,43	53,05 ± 10,46	32,59 ± 7,53	0,592 (0,444-0,888)	0,030 ± 0,020
4.G (n=5)	3,97 ± 0,25	53,73 ± 14,64	33,02 ± 5,39	0,851 (0,296-1,295)	0,024 ± 0,014
5.G (n=5)	4,05 ± 0,53	44,32 ± 4,98	24,22 ± 7,78	0,555 (0,518-0,851)	0,013 ± 0,017
p	0,140	0,744	0,178	0,467	0,169

Aort dokusunda; SOD, KAT, GPO ve KO testleri için gruplar arasında ortalamalar yönünden farkların önemliliği ANOVA testiyle, MDA seviyeleri için gruplar arasında medyan değerler yönünden farkların önemliliği ise Kruskal Wallis Varyans Analizi testiyle araştırılmış ve tüm bu parametreler açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. SOD seviyelerinde, gruplar arasında herhangi bir farklılık saptanmamıştır. KAT seviyelerinde kontrol grubu dışında, en yüksek değere 4. grubun sahip olduğu, GPO seviyelerinde ise tüm gruplar arasında en yüksek değere 4. grubun sahip olduğu gözlenmiştir. MDA ve KO seviyelerinde ise, gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmazken, bu parametrelerin her ikisinde de tüm gruplar arasında en düşük değere sahip grubun 5. grup olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.3: Serum GPO ve KAT enzim aktiviteleri ve gruplar ve zamanlar arasındaki farklılıkların incelenmesi.

GPO (IU/L)				KAT (IU/ml)			
	İLK SONUÇLAR	SON SONUÇLAR	<i>p</i>		İLK SONUÇLAR	SON SONUÇLAR	<i>p</i>
	Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)			ort ± ss	ort ± ss	
1.G (n=6)	36,00 (24,00-43,20)	76,80 (43,20-144,00)	0,028	1.G (n=6)	4,39 ± 2,62	9,52 ± 2,74	0,050
2.G (n=5)	33,60 (14,40-62,40)	81,60 (57,60-105,60)	0,043	2.G (n=5)	5,27 ± 2,66	5,85 ± 3,59	0,689
3.G (n=5)	38,40 (28,80-57,60)	76,80 (62,40-91,20)	0,042	3.G (n=5)	5,27 ± 3,04	12,59 ± 5,91	0,038
4.G (n=5)	24,00 (14,40-62,40)	86,40 (62,40-105,60)	0,043	4.G (n=5)	4,39 ± 1,47	9,37 ± 6,84	0,119
5.G (n=5)	43,20 (28,80-57,60)	86,40 (24,00-96,00)	0,080	5.G (n=5)	6,15 ± 4,56	15,23 ± 7,29	0,123
p	0,404	0,990		p	0,869	0,114	

Serum GPO enzim aktivitesi için, grup içi zamanlar arasında fark araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Wilcoxon testi uygulanmıştır. Gruplar arasında ortalanca değerler yönünden farkların önemliliği Kruskal Wallis Varyans Analizi testiyle araştırılmıştır. Çalışma sonu GPO değerlerinde, tüm gruplarda başlangıç seviyelerine göre artış tespit edilmiştir. Çalışma sonunda, GPO değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamakla birlikte, en yüksek değerlere 4. ve 5. grupların sahip oldukları gözlenmiştir.

Serum KAT enzim aktivitesi için, grup içi zamanlar arasında fark araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Paired t testi kullanılmıştır. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkların önemliliği ANOVA testiyle araştırılmıştır. Çalışma sonu KAT değerlerinde, tüm gruplarda başlangıç seviyelerine göre artış tespit edilmiştir. Çalışma sonunda, KAT değerlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamakla birlikte, en yüksek değere 5. grubun sahip olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.4: Serum NO[•] seviyeleri ve NOS enzim aktiviteleri ve gruplar ve zamanlar arasındaki farklılıkların incelenmesi.

NO [•] (mM)				NOS (IU/ml)			
	İLK SONUÇLAR	SON SONUÇLAR	p		İLK SONUÇLAR	SON SONUÇLAR	p
	Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)			Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)	
1.G (n=6)	74,63 (20,50-136,25)	19,00 (13,25-31,25)	0,028	1.G (n=6)	18,00 (3,94-28,46)	6,15 (2,96-11,29)	0,116
2.G (n=5)	64,75 (45,00-80,25)	26,75 (19,75-85,75)	0,225	2.G (n=5)	4,58 (3,86-13,91)	25,05 (13,54-58,65)	0,043
3.G (n=5)	91,50 (56,75-118,00)	28,75 (17,50-81,50)	0,080	3.G (n=5)	6,41 (3,86-23,59)	44,33 (40,05-74,10)	0,043
4.G (n=5)	73,50 (67,00-99,00)	204,00 (28,25-307,50)	0,080	4.G (n=5)	4,88 (2,51-9,53)	48,94 (41,18-80,63)	0,043
5.G (n=5)	51,25 (35,50-67,25)	105,25 (42,50-244,75)	0,080	5.G (n=5)	3,45 (2,85-10,43)	33,98 (14,93-42,79)	0,043
p	1 vs 2	0,083	0,126	p	1 vs 2	0,152	0,004
	1 vs 3		0,177		1 vs 3		0,004
	1 vs 4		0,009		1 vs 4		0,004
	1 vs 5		0,004		1 vs 5		0,004
	2 vs 3		0,690		2 vs 3		0,056
	2 vs 4		0,032		2 vs 4		0,056
	2 vs 5		0,095		2 vs 5		0,841
	3 vs 4		0,056		3 vs 4		0,548
	3 vs 5		0,056		3 vs 5		0,032
	4 vs 5		0,310		4 vs 5		0,016

Serum NO[•] seviyeleri için, grup içi zamanlar arasında fark araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Wilcoxon testi uygulanmıştır. Gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkların önemliliği Kruskal Wallis Varyans Analizi testiyle araştırılmıştır. Kruskal Wallis Varyans Analizi ile ortancaların eşit olmadığı saptandığında “post - hoc” çoklu karşılaştırma yöntemi olarak Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Çalışma sonu NO[•] değerlerinde, başlangıç değerlerine göre ilk 3 grupta düşüş görülürken, 5. grupta yaklaşık iki kat ve 4. grupta ise yaklaşık üç kat artış olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonunda, NO[•] değerlerinde gruplar arasında en yüksek

değere 4. grubun sahip olduğu ve ilk üç gruba göre yaklaşık 10 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. 5. grupta da NO⁺ seviyelerinin ilk üç gruba göre yaklaşık 5 kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Serum NOS enzim aktiviteleri için, grup içi zamanlar arasında fark araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Wilcoxon testi uygulanmıştır. Gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkların önemliliği Kruskal Wallis Varyans Analizi testiyle araştırılmıştır. Kruskal Wallis Varyans Analizi ile ortancaların eşit olmadığı saptandığında “post - hoc” çoklu karşılaştırma yöntemi olarak Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Çalışma sonu NOS seviyelerinde, başlangıç değerlerine göre en yüksek artışların 4. ve 5. grupta olduğu ve her iki grupta da yaklaşık 10 katlık bir artış olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonunda gruplar arasında en yüksek NOS değerine 4. grubun sahip olduğu ve kontrol grubuna göre yaklaşık 8 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.5: Serum MDA seviyeleri ve KO enzim aktiviteleri ve gruplar ve zamanlar arasındaki farklılıkların incelenmesi.

KO (mIU/ml)				MDA (nmol/ml)			
	İLK SONUÇLAR	SON SONUÇLAR	<i>p</i>		İLK SONUÇLAR	SON SONUÇLAR	<i>p</i>
	ort ± ss	ort ± ss			Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)	
1.G (n=6)	0,094 ± 0,024	0,041 ± 0,027	0,010	1.G (n=6)	1,291 (0,403-2,178)	0,565 (0,323-2,661)	0,893
2.G (n=5)	0,140 ± 0,020	0,038 ± 0,011	0,001	2.G (n=5)	1,532 (1,048-1,936)	1,613 (0,807-5,000)	0,686
3.G (n=5)	0,137 ± 0,025	0,063 ± 0,052	0,032	3.G (n=5)	1,532 (0,484-1,613)	2,339 (1,855-3,307)	0,043
4.G (n=5)	0,132 ± 0,027	0,060 ± 0,044	0,026	4.G (n=5)	1,452 (1,048-2,500)	1,129 (0,887-2,823)	0,893
5.G (n=5)	0,131 ± 0,035	0,052 ± 0,033	0,031	5.G (n=5)	1,855 (0,968-2,420)	2,661 (1,532-4,516)	0,273
<i>p</i>	0,05	0,72		<i>p</i>	0,827	0,128	

Serum KO enzim aktiviteleri için, grup içi zamanlar arasında fark araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Paired t testi kullanılmıştır. Gruplar arasında ortalamalar yönünden farkların önemliliği ANOVA testiyle araştırılmıştır. Çalışma sonu serum KO seviyelerinde, tüm gruplarda başlangıç değerlerine göre istatistiksel

olarak anlamlı düşüşler olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir. Çalışma sonu KO seviyelerinde, ekstre grupları arasında en düşük değere 5. grubun sahip olduğu tespit edilmiştir.

Serum MDA seviyeleri için, grup içi zamanlar arasında fark araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Wilcoxon testi uygulanmıştır. Gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkların önemliliği Kruskal Wallis Varyans Analizi testiyle araştırılmıştır. Çalışma sonu serum MDA seviyelerinde, kontrol grubu hariç, tüm gruplar arasında en düşük değere 4. grubun sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.6: Serum ADMA ile homosistein seviyeleri ve gruplar ve zamanlar arasındaki farklılıkların incelenmesi.

ADMA (pg/ml)				Homosistein ($\mu\text{mol/L}$)			
	İLK SONUÇLAR	SON SONUÇLAR	<i>p</i>		İLK SONUÇLAR	SON SONUÇLAR	<i>p</i>
	Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)			Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)	
1.G (n=6)	97,00 (43,47-264,71)	70,24 (25,63-136,25)	0,345	1.G (n=6)	10,55 (7,60-12,30)	13,00 (11,90-18,80)	0,028
2.G (n=5)	129,11 (29,20-143,39)	75,59 (36,34-143,39)	0,893	2.G (n=5)	13,00 (7,60-15,10)	13,60 (11,70-39,10)	0,893
3.G (n=5)	47,04 (22,06-111,27)	125,54 (25,63-154,09)	0,345	3.G (n=5)	10,00 (9,60-14,40)	18,00 (12,20-27,30)	0,138
4.G (n=5)	139,82 (100,57-239,73)	61,32 (14,93-100,57)	0,043	4.G (n=5)	12,40 (9,50-14,10)	22,4 (13,90-27,80)	0,080
5.G (n=5)	47,04 (22,06-132,68)	79,16 (29,20-107,70)	0,686	5.G (n=5)	13,70 (10,00-16,50)	21,40 (15,40-34,40)	0,043
<i>p</i>	0,122	0,418		<i>p</i>	0,312	0,184	

Serum ADMA seviyeleri için, grup içi zamanlar arasında fark araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Wilcoxon testi uygulanmıştır. Gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkların önemliliği Kruskal Wallis Varyans Analizi testiyle araştırılmıştır. Çalışma sonunda serum ADMA seviyelerinde, başlangıç seviyelerine göre en büyük düşüşün 4. grupta olduğu ($p<0,05$) belirlenmiştir. Çalışma sonu serum

ADMA seviyelerinde, tüm gruplar arasında en düşük değere 4. grubun, en yüksek değere ise 3. grubun sahip olduğu tespit edilmiştir.

Serum Homosistein seviyeleri için, grup içi zamanlar arasında fark araştırılırken karşılaştırma yöntemi olarak Wilcoxon testi uygulanmıştır. Gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkların önemliliği Kruskal Wallis Varyans Analizi testiyle araştırılmıştır. Çalışma sonunda gruplar arasında serum Homosistein seviyeleri yönünden istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmamıştır.

Tablo 4.7: Deney sonu serum BUN, KREA, AST ve ALT seviyeleri ve gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi.

	BUN (mg/dl)	KREA (mg/dl)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
	Medyan (min-maks)	ort $\pm$ ss	Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)
1.G (n=6)	18,50 (14-23)	0,97 $\pm$ 0,03	37,00 (26-83)	61,50 (37-114)
2.G (n=5)	15,00 (10-19)	0,87 $\pm$ 0,27	47,00 (38-63)	38,00 (34-58)
3.G (n=5)	17,00 (14-21)	1,05 $\pm$ 0,15	120,00 (35-226)	97,00 (57-108)
4.G (n=5)	20,00 (19-25)	1,23 $\pm$ 0,24	53,00 (48-87)	58,00 (43-116)
5.G (n=5)	15,00 (13-32)	1,20 $\pm$ 0,34	49,00 (36-73)	57,00 (53-71)
<i>p</i>	0,085	0,103	0,103	0,072

Serum BUN, AST ve ALT seviyeleri için, gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkların önemliliği Kruskal Wallis Varyans Analizi testiyle araştırılmıştır. Serum KREA seviyeleri için, gruplar arasında ortalamalar yönünden farkların önemliliği ANOVA testiyle araştırılmıştır.

Çalışma sonunda serum BUN ve KREA seviyeleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Serum AST ve ALT seviyeleri açısından da gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmamakla birlikte, 3. grupta diğer gruplara kıyasla AST ve ALT seviyelerinin yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.8: Deney sonu serum TG, TK, LDL ve HDL kolesterol seviyeleri ve gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi.

		TG (mg/dl)	TK (mg/dl)	LDL KOLESTEROL (mg/dl)	HDL KOLESTEROL (mg/dl)
		ort ± ss	Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)	Medyan (min-maks)
1.G (n=6)		93,33 ± 16,15	181,50 (124-233)	93,50 (69-104)	55,00 (19-79)
2.G (n=5)		701,40 ± 569,492	1277,00 (1213-1830)	629,00 (471-72)	188,00 (170-532)
3.G (n=5)		880,60 ± 339,909	2089,00 (1832-2213)	872,00 (751-904)	440,00 (410-471)
4.G (n=5)		666,40 ± 273,984	1896,00 (1683-2100)	938,00 (566-1065)	353,00 (248-524)
5.G (n=5)		552,20 ± 281,709	1334,00 (1189-2097)	577,00 (447-994)	339,00 (223-558)
P	1-2	0,071	0,004	0,004	0,004
	1-3	0,009	0,004	0,004	0,004
	1-4	0,104	0,004	0,004	0,004
	1-5	0,352	0,004	0,004	0,004
	2-3	1,000	0,008	0,016	0,151
	2-4	1,000	0,032	0,056	0,151
	2-5	1,000	1,000	0,690	0,095
	3-4	1,000	0,151	0,151	0,151
	3-5	1,000	0,056	0,151	0,151
	4-5	1,000	0,095	0,222	0,841

Serum TG seviyeleri ve HDL/LDL oranları için, gruplar arasında ortalamalar yönünden farkların önemliliği ANOVA testiyle araştırılmıştır. ANOVA testinde, gruplar arasındaki farklılığı hangi grubun ortaya çıkardığını bulabilmek için “post-hoc” testlerinden Bonferroni yöntemi kullanılmıştır. Serum TK, LDL kolesterol, HDL kolesterol seviyeleri ve LDL/TK, HDL/TK oranları için, gruplar arasında ortanca değerler yönünden farkların önemliliği Kruskal Wallis Varyans Analizi testiyle araştırılmıştır. Kruskal Wallis Varyans Analizi ile ortancaların eşit olmadığı saptandığında “post - hoc” çoklu karşılaştırma yöntemi olarak Mann-Whitney U testi uygulanmıştır.

Çalışma sonunda kontrol grubu hariç en düşük serum TG seviyesine 5. grubun, en yüksek TG seviyesine ise 3. grubun sahip olduğu görülmektedir. Ekstre grupları arasında, 3. gruptan 5. gruba doğru TG seviyelerinin giderek azaldığı ve 5. grupta

kolesterol grubunun da altına düştüğü gözlenmiştir. Kontrol ve kolesterol grupları hariç en düşük serum TK seviyesine 5. grubun, en yüksek TK seviyesine ise 3. grubun sahip olduğu görülmektedir. Ekstre grupları arasında, 3. gruptan 5. gruba doğru TK seviyelerinin giderek azaldığı ve 5. grupta kolesterol grubuyla hemen hemen aynı seviyeye geldiği gözlenmiştir. Kontrol grubu hariç en düşük serum LDL kolesterol seviyesine 5. grubun sahip olduğu ve kolesterol grubundan da düşük olduğu tespit edilmiştir. Kontrol grubu hariç en yüksek HDL seviyesine 3. grubun sahip olduğu, ekstre grupları arasında ise en düşük HDL seviyesine 5. grubun sahip olduğu gözlenmiştir. Serum LDL/TK ve HDL/LDL oranları açısından gruplar arasında herhangi bir farklılık bulunmazken, HDL/TK oranında ise yalnızca 1. ve 2. grup arasında, 2. grupta daha fazla olmak üzere fark olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada, hayvanların tamamında, bakılan tüm CRP seviyeleri ise, <1 mg/L olarak bulunmuştur.

Tablo 4.9: Deney sonu serum LDL/TK, HDL/TK ve HDL/LDL oranları ve gruplar arasındaki farklılıkların incelenmesi.

		LDL/TK	HDL/TK	HDL/LDL
		Medyan (min-max)	Medyan (min-max)	ort ± ss
1.G	(n=6)	0,45 (0,42-0,81)	0,31 (0,15-0,34)	0,59 ± 0,23
2.G	(n=5)	0,43 (0,38-0,53)	0,15 (0,14-0,29)	0,40 ± 0,17
3.G	(n=5)	0,41 (0,40-0,42)	0,23 (0,19-0,24)	0,52 ± 0,05
4.G	(n=5)	0,50 (0,34-0,55)	0,18 (0,15-0,25)	0,44 ± 0,17
5.G	(n=5)	0,43 (0,37-0,49)	0,23 (0,19-0,34)	0,60 ± 0,19
P	1-2	0,255	0,030	0,292
	1-3		0,082	
	1-4		0,052	
	1-5		0,329	
	2-3		0,151	
	2-4		0,222	
	2-5		0,095	
	3-4		0,548	
	3-5		0,548	
	4-5		0,222	

Tablo 4.10: Çalışma sonunda en yüksek NO[•], NOS ve en düşük ADMA seviyelerine sahip gruplar.

		SERUM					
		NO [•]	NOS	ADMA			
<i>Başlangıç Seviyesine Göre Durum</i>	En Yüksek	4. grup (~ 3 kat ↑)	4. grup (~ 10 kat ↑)				
	En Düşük			4. grup (~ 2,5 kat ↓)			
		SERUM			AORT		
		NO [•]	NOS	ADMA	NO [•]	NOS	ADMA
<i>Çalışma Sonunda Gruplar Arasındaki Durum</i>	En Yüksek	4. grup * (~ 10 kat ↑)	4. grup ** (~ 8 kat ↑)		4. grup	5. grup	
	En Düşük			4. grup			5. grup

* İlk üç gruba göre, ** Kontrol grubuna göre

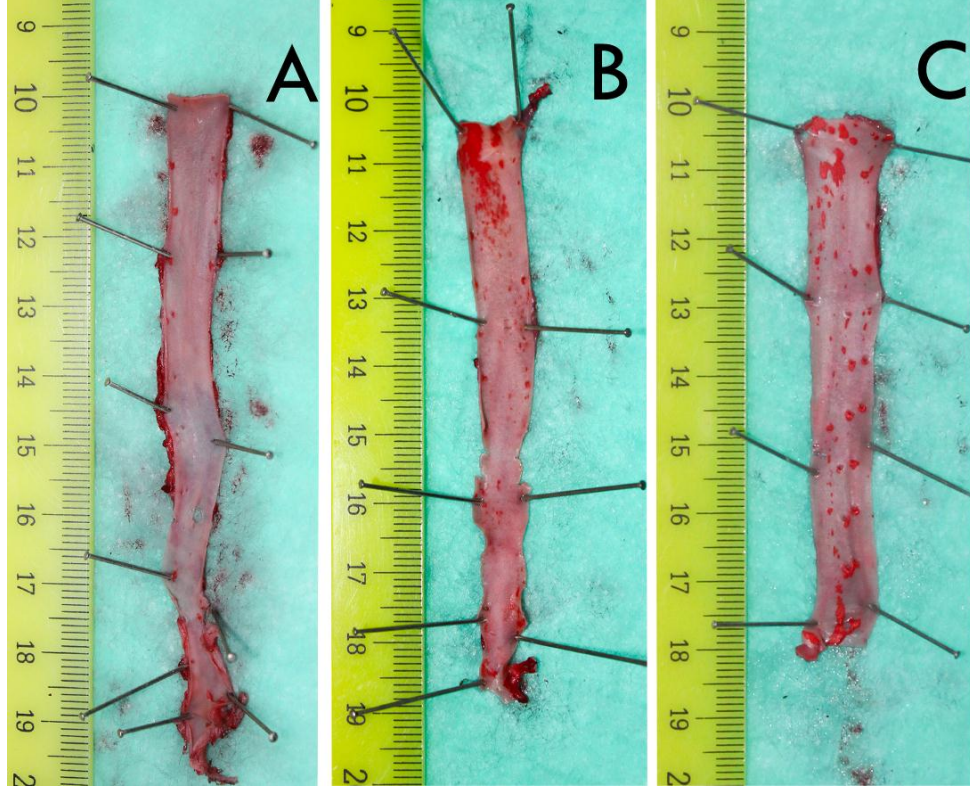
Tablo 4.11: Çalışma sonunda en yüksek KAT, GPO ve en düşük KO, MDA seviyelerine sahip gruplar.

		SERUM			
		KAT	GPO	KO	MDA
<i>En Yüksek</i>		5. grup	4. ve 5. gruplar		
<i>En Düşük</i>				5. grup*	4. grup**
		AORT			
		KAT	GPO	KO	MDA
<i>En Yüksek</i>		4. grup**	4. grup		
<i>En Düşük</i>				5. grup	5. grup

* Ekstre grupları arasında, ** Kontrol grubu dışında

Aterosklerotik Lezyon Alanlarının Değerlendirilmesi:

Sudan IV boyaması yapılan aort kesitlerine ait fotoğraflar ve istatistiksel veriler şekil 4.1, şekil 4.2 ve tablo 4.10'da görülmektedir.



Şekil 4.1: Sudan IV boyaması yapılan aort kesitlerine ait fotoğraflar - 1. A: 1. gruba ait fotoğrafta aort kesitinde Sudan IV boyası ile boyanma olmamıştır. B: 2. grup ve C: 3. gruba ait fotoğraflarda Sudan IV boyası ile kırmızı boyanan aterom plakları gözlenmektedir.

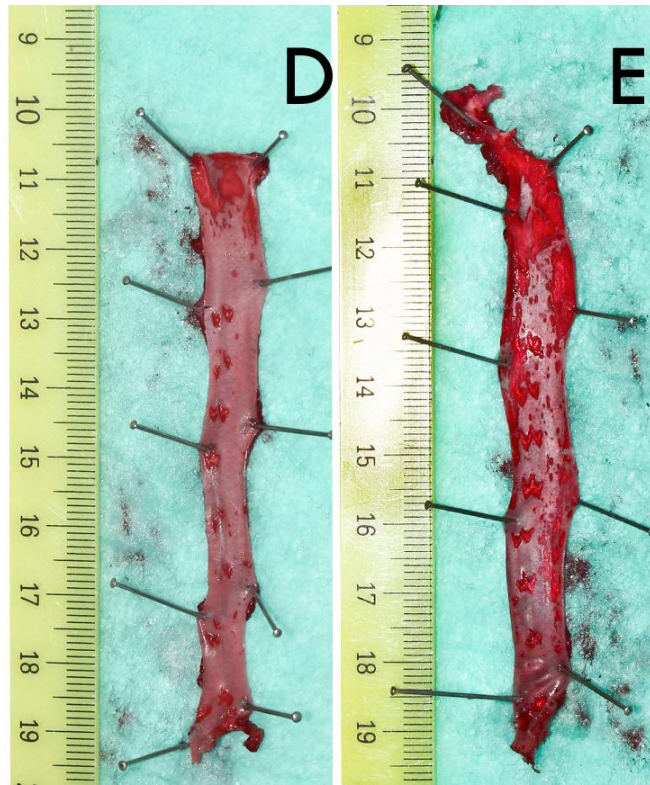
Sudan IV boyaması sonrası aterosklerotik plaklar kırmızıya boyanırken, 1. gruba ait aort kesitinde boyanma gözlenmemiştir (şekil 4.1-A). 2. grupta (kolesterol grubu), aterosklerotik plakların tüm alana oranı $\% 6,8 \pm 4,4$ (şekil 4.1-B) iken, ekstre verilen 3., 4. ve 5. gruplarda bu oranlar sırasıyla $\% 5,7 \pm 4,5$, $\% 8,2 \pm 5,5$ ve $\% 19,9 \pm 12,9$ olarak bulunmuştur (şekil 4.1-C ve şekil 4.2-D, E).

Tablo 4.12: Sudan IV boyaması yapılan aort bölümlerinde, aterosklerotik plak alanlarının tüm yüzey alanına oranla yüzdeleri.

	1. G. (%)	2. G (%)	3. G (%)	4. G (%)	5. G (%)	<i>p</i>					
	ort ± ss	ort ± ss	ort ± ss	ort ± ss	ort ± ss	2-3	2-4	2-5	3-4	3-5	4-5
Plak Alanları / Tüm Yüzey Alanı	*	6,8 ± 4,4	5,7 ± 4,5	8,2 ± 5,5	19,9 ± 12,9	1	1	0,094	1	0,059	0,171

* I. Grupta boyanma olmamıştır.

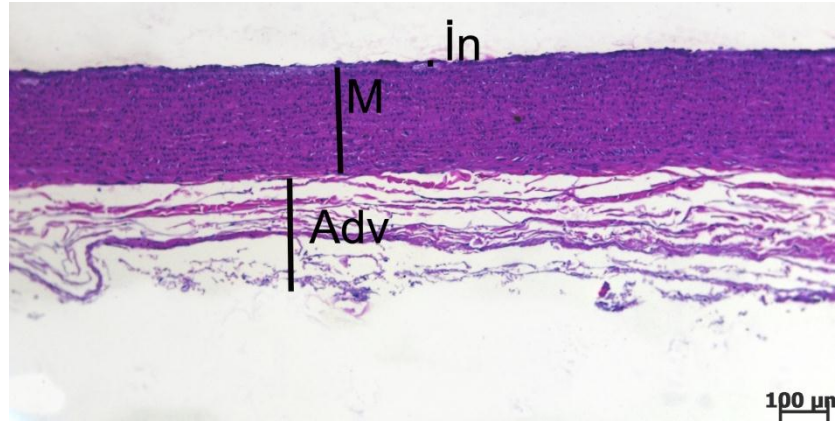
Buna göre kontrol grubu hariç, diğer gruplarda Sudan IV boyaması sonucunda plak alanları/tüm yüzey alanı oranları açısından istatistiksel bir farklılık saptanmazken, en büyük orana 5. grubun sahip olduğu gözlenmiştir.



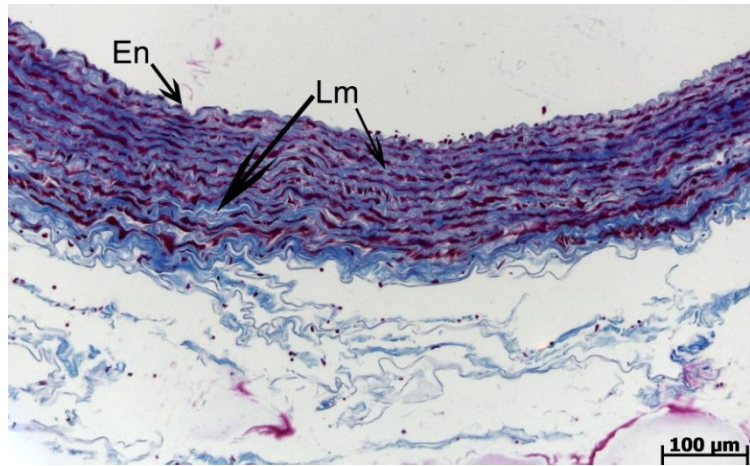
Şekil 4.2: Sudan IV boyaması yapılan aort kesitlerine ait fotoğraflar - 2. D: 4. grup ve E: 5. gruba ait fotoğraflarda Sudan IV boyası ile kırmızı boyanan aterom plakları gözlenmektedir.

Işık Mikroskobu Bulguları:

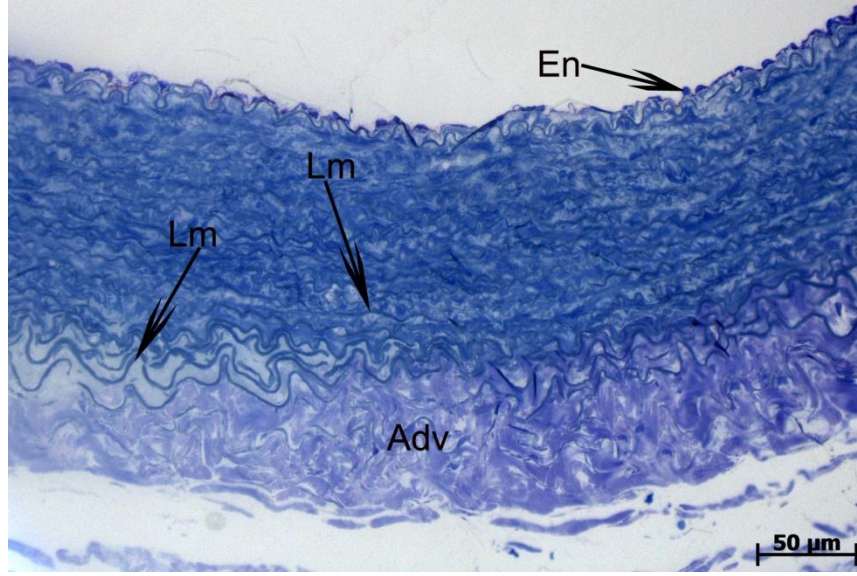
H-E, M-A ile boyanan parafin doku kesitlerinin ve toluidin mavisiyle boyanan yarı ince kesitlerin ışık mikroskobu gözlemlerinde; 1. gruba ait aort kesitlerinde tunika intimada, yüzeyde endotel hücrelerinin sağlam ve olağan görünümde olduğu, endotel altında ince bir subendotel tabakasının bulunduğu, tunika medyada elastik liflerin ve vasküler düz kas hücrelerinin iyi organize olduğu izlenmiştir (şekil 4.3, 4.4 ve 4.5).



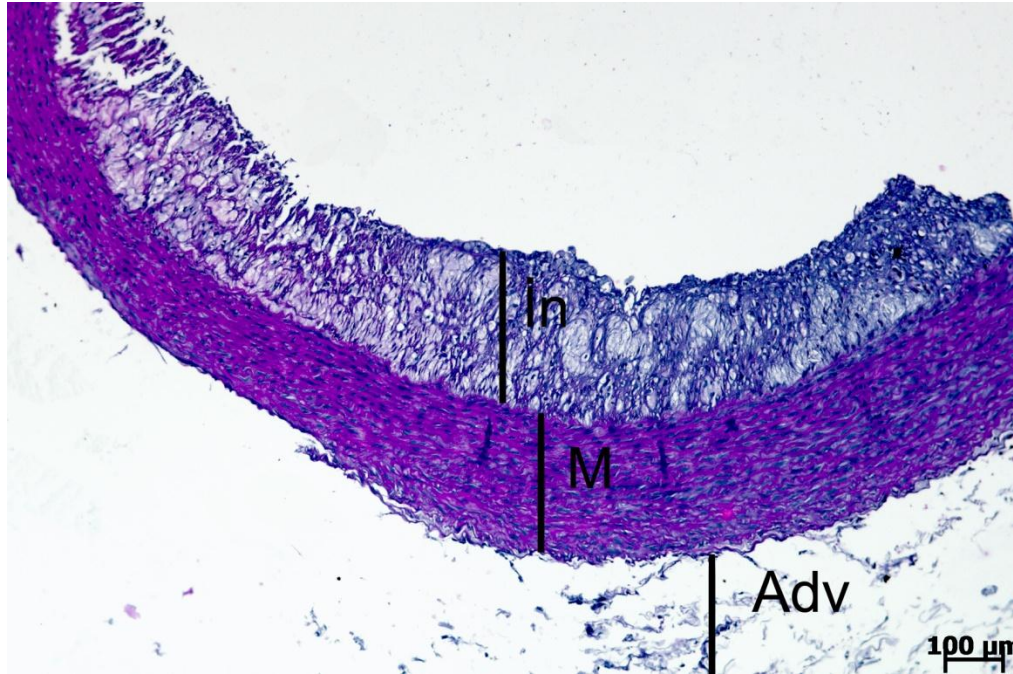
Şekil 4.3: 1. gruba ait aort kesiti. İn: Tunika intima, M: Tunika mediya, Adv: Tunika adventisya. H-E, 100 µm.



Şekil 4.4: 1. gruba ait aort kesitinde tunika intimada endotel ve çok ince bir subendotel izlenmektedir. Tunika mediya ve tunika adventisya doğal görünümündedir. En: Endotel hücreleri, Lm: Elastik lameller. Mallory-Azan, 100 µm.

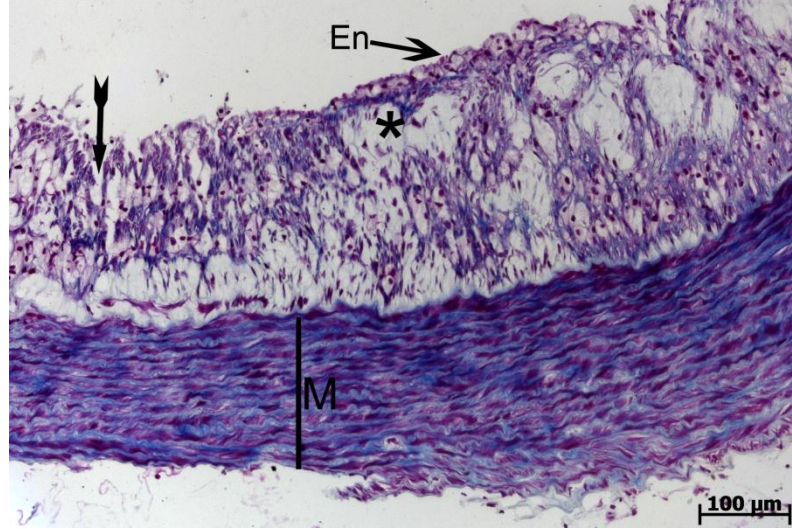


Şekil 4.5: 1. gruba ait yarı ince kesitte endotel hücreleri ve altında ince intima tabakası doğal görünümde izlenmektedir. Tunika media tabakasında elastik lameller birbirine paralel yerleşimde görülmekte. En: Endotel hücreleri, Lm: Elastik lameller, Adv: Tunika adventisya. Toluidin mavisi, 50 µm.

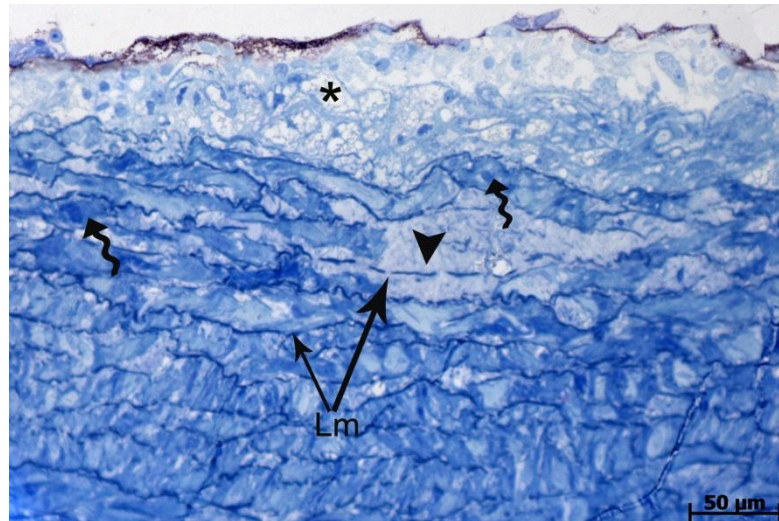


Şekil 4.6: 2. gruba ait aort kesiti. İntima tabakasında İn: Tunika intima, M: Tunika media, Adv: Tunika adventisya. H-E, 100 µm.

2. grupta, intima tabakasında belirgin kalınlaşma, endotel hücrelerinde ayrılma ve subendotelyal alanda köpük hücrelerinin sayısında belirgin artış ile yer yer intimada hasar gözlenmiştir. Mediya tabakasında elastik lamellerde düzensizlik ve kırılmalar, yer yer ekstraselüler matriks artışı izlenmiştir (şekil 4.6, 4.7 ve 4.8).



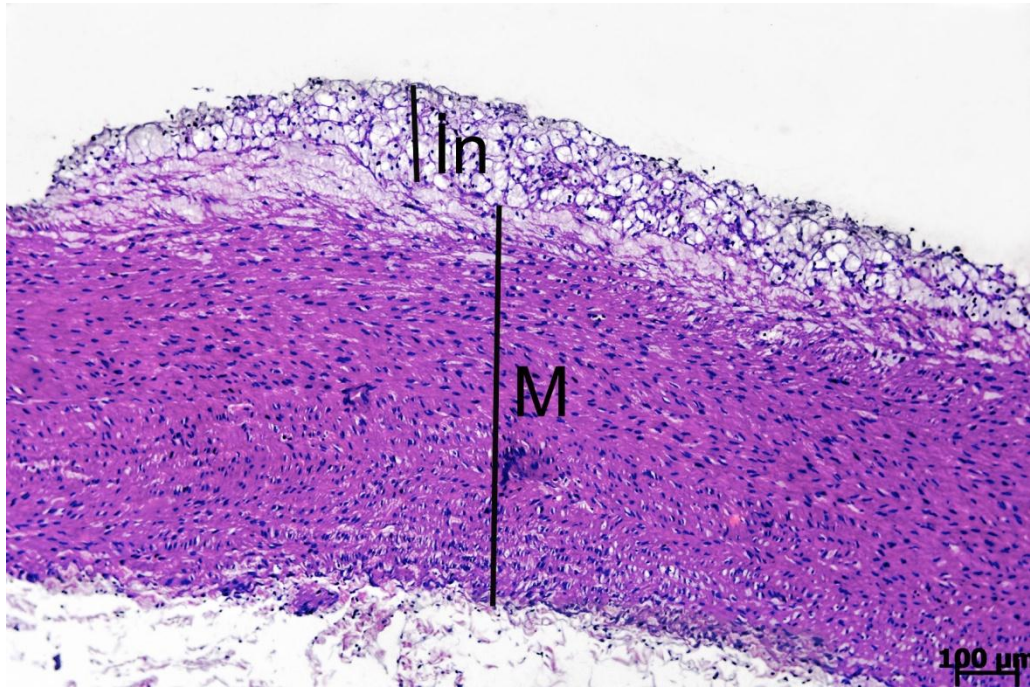
Şekil 4.7: 2. gruba ait aort kesitinde tunika intima yüzeyinde hasar ve köpük hücreleri görülmektedir. En: Endotel hücreleri, *: Köpük hücreleri, M: Tunika mediya, kuyruklu ok: Tunika intima hasarı. Mallory-Azan, 100 µm.



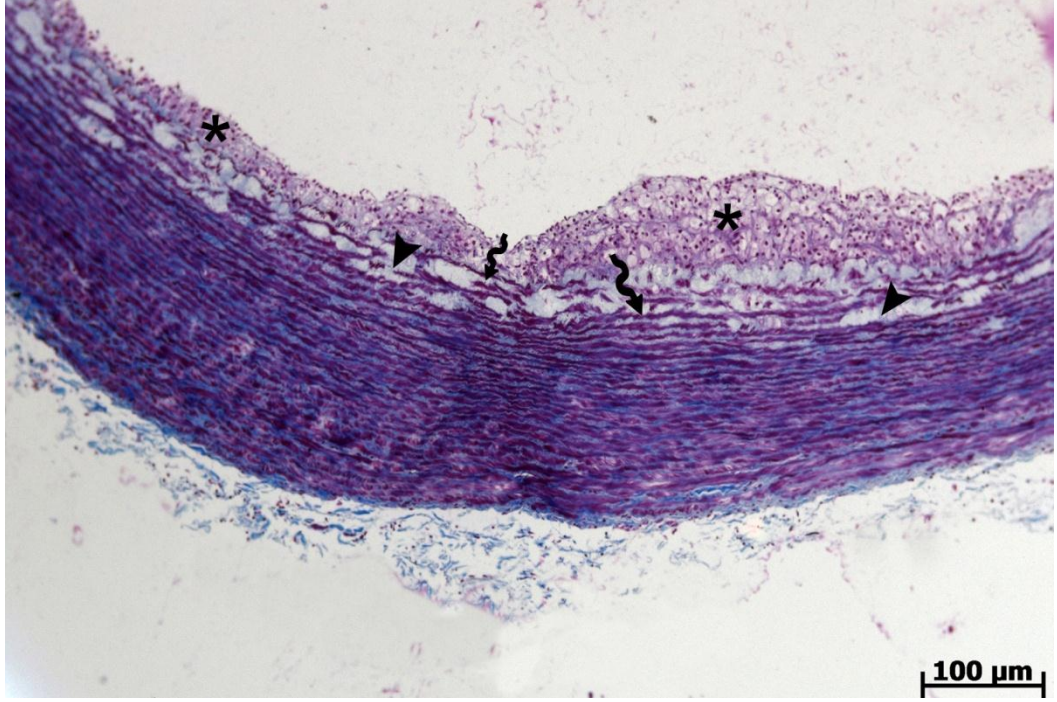
Şekil 4.8: 2. gruba ait yarı ince kesitte intima tabakasının köpük hücreleriyle dolu olduğu görülmektedir. Mediya tabakasında elastik lamellerde düzensizlik ve

kırılmalar, yer yer ekstrasellüler matriks artışı gözlenmekte. *: Köpük hücreleri, ok başı: Ekstrasellüler matriks artışı, Lm: Elastik lamellerde kırılma ve düzensizlik, kıvrık ok: Elastik lameller arasında bulunan vasküler düz kas hücreleri. Toluidin mavisi, 50 µm.

3. gruba ait örneklerde intimada kalınlaşma ve köpük hücrelerinde belirgin sayı artışı yanında tunika intima-media sınırına yakın alanda vasküler düz kas hücreleri arasında ekstrasellüler matriks artışı izlenmiştir (şekil 4.9 ve 4.10).

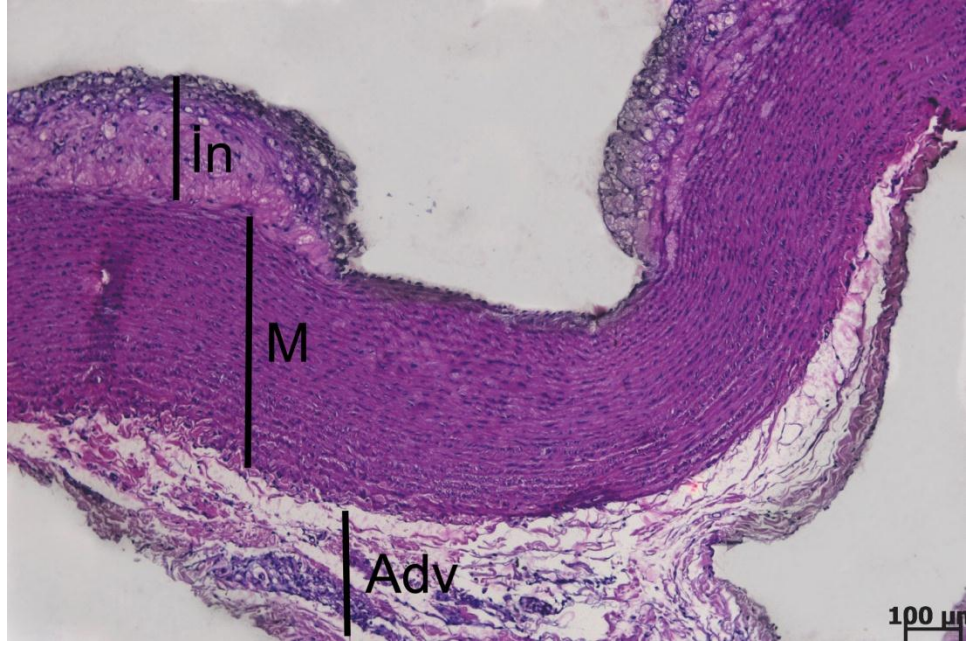


Şekil 4.9: 3. gruba ait aort kesiti. İn: Tunika intima, M: Tunika mediya. H-E, 100 µm.

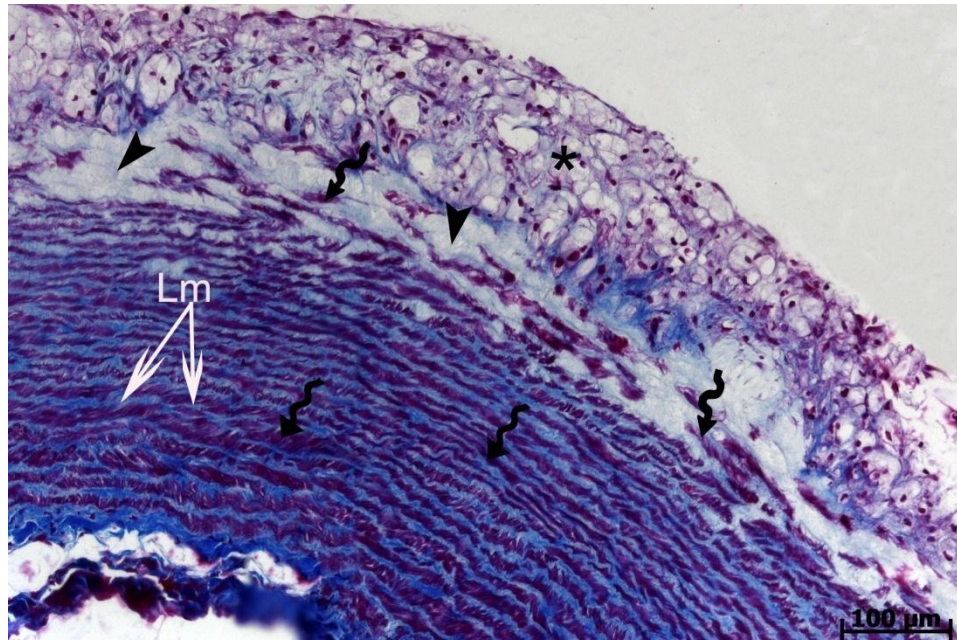


Şekil 4.10: 3. gruba ait aort kesitinde tunika intimada köpük hücreleri görülmekte, vasküler düz kas hücrelerinin arasında ekstrasellüler matriks artışı izlenmektedir. *: Köpük hücreleri, kıvrık ok: Vasküler düz kas hücreleri, ok başı: Ekstrasellüler matriks artışı. Mallory-Azan, 100 µm.

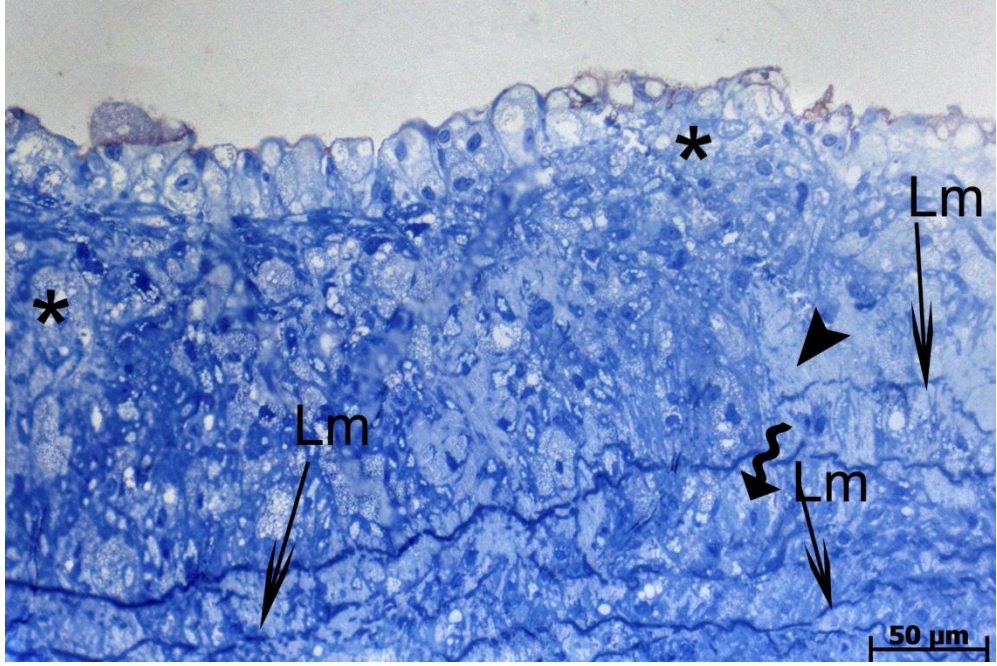
4. gruba ait aort örneklerinde intimada kalınlaşma ve köpük hücrelerinde belirgin sayı artışı yanında tunika intima-media sınırında ve intimada ekstrasellüler matriks artışı, tunika media'da elastik lamellerde düzensizlik ve kırılma, vasküler düz kas hücrelerinde köpükleşme dikkat çekmiştir (şekil 4.11, 4.12 ve 4.13).



Şekil 4.11: 4. gruba ait aort kesiti. İn: Tunika intima, M: Tunika mediya, Adv: Tunika adventisya.H-E, 100 µm.

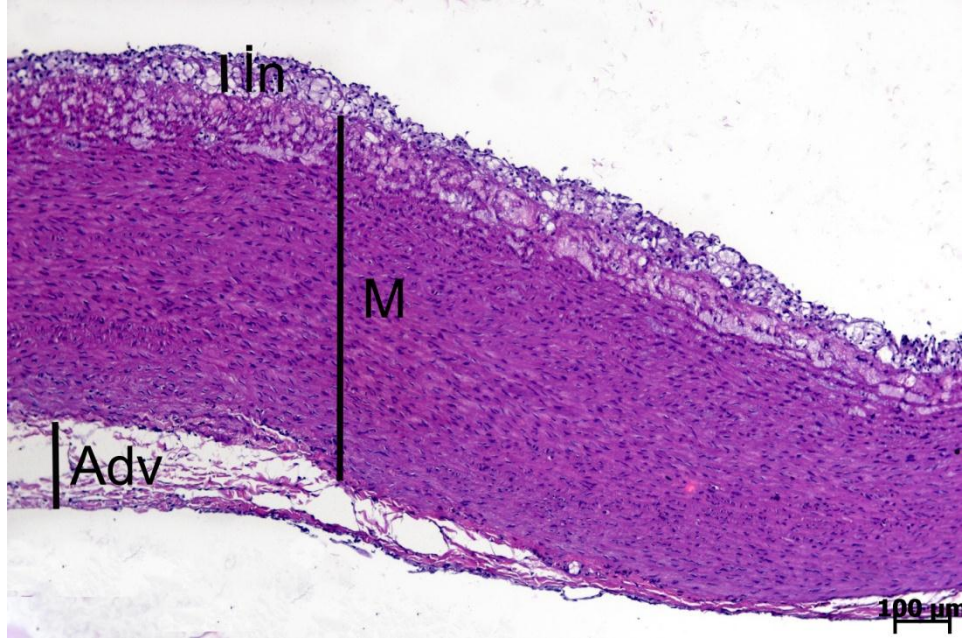


Şekil 4.12: 4. gruba ait aort kesitinde tunika intimada kalınlaşma, köpük hücreleri, elastik lamellerde bozulma, intima-media sınırında ekstraselüler matriks artışı izlenmektedir. *: Köpük hücreleri, ok başı: Ekstraselüler matriks artışı, kıvrık ok: Vasküler düz kas hücreleri, Lm: Elastik lameller. Mallory-Azan, 100 µm.

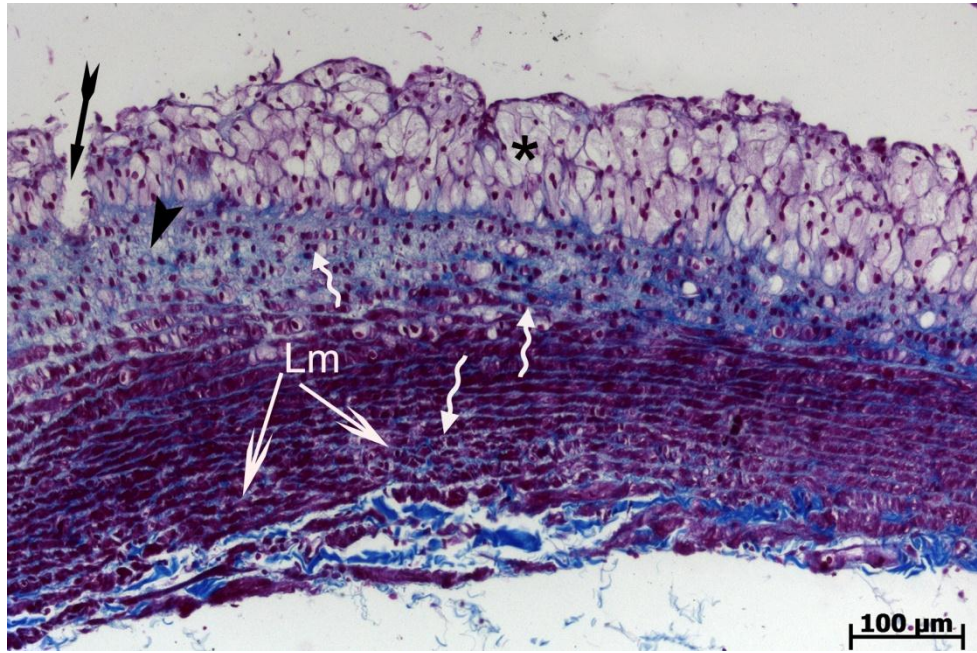


Şekil 4.13: 4. gruba ait yarı ince kesitte intima tabakasında kalınlaşma, ekstraselüler matriks artışı ve köpük hücreleri dikkat çekmektedir. Elastik lamellerde düzensizlik ve kırılma, vasküler düz kas hücrelerinde köpükleşme görülmekte. *: Köpük hücreleri, ok başı: Ekstraselüler matriks artışı, Lm: Elastik lamellerde kırılma ve düzensizlik, kıvrık ok: Vasküler düz kas hücrelerinde köpükleşme. Toluidin mavisi, 50 µm.

5. gruba ait aort örneklerinde intimada endotel hücrelerinde ayrılma, subendotel tabakasında köpük hücrelerinde artış, intima tabakasında kalınlaşma ve yüzey hasarı gözlenmiştir. İntima-mediya sınırında vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyon ve ekstraselüler matrikste artış, elastik lamellerde düzensizlik ve kırılmalar izlenmiştir (şekil 4.14 ve 4.15).



Şekil 4.14: 5. gruba ait aort kesiti. İn: Tunika intima, M: Tunika mediya, Adv: Tunika adventisya. H-E, 100 µm.



Şekil 4.15: 5. gruba ait aort kesitinde tunika intimada kalınlaşma ve köpük hücreleri izlenirken, yüzeyde intima hasarı görülmektedir. İntima-media sınırında vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyon ve ekstrasellüler matrikste artış gözlenmekte, elastik

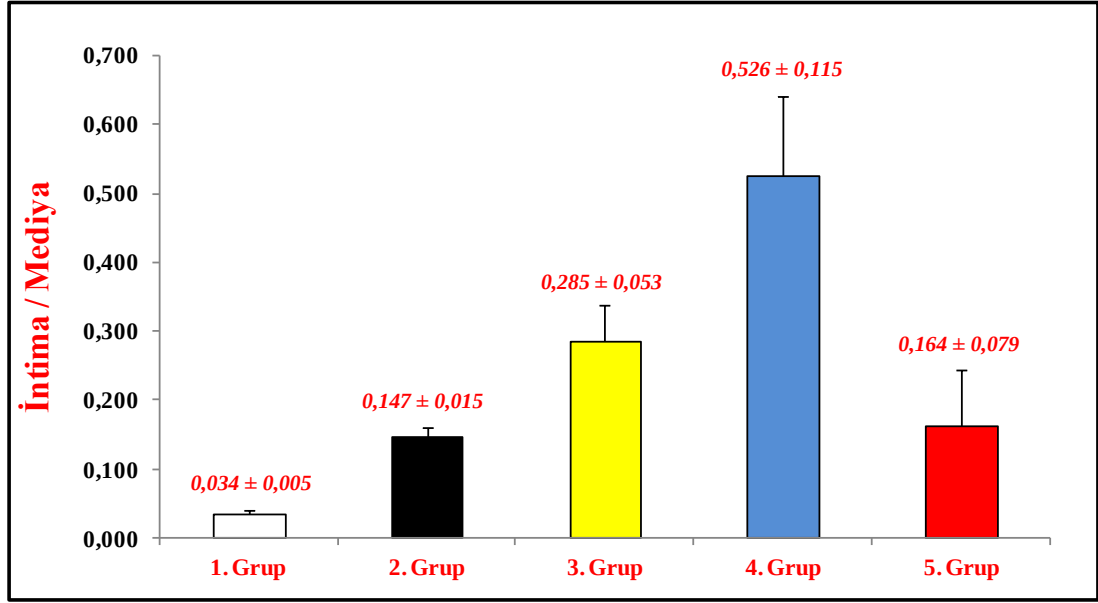
lamellerde düzensizlik ve kırılmalar dikkat çekmektedir. *: Köpük hücreleri, kuyruklu ok: Tunika intima hasarı, kıvrık ok: Vasküler düz kas hücresi, ok başı: Ekstraselüler matriks artışı, Lm: Elastik lameller. Mallory-Azan, 100 µm.

H-E ile boyalı preparatlardan yapılan tunika intima, tunika mediya tabakalarının kalınlık ölçümleri ile intima/mediya oranları Tablo 4.11'de görülmektedir. Ayrıca şekil 4.16'da intima/mediya oranları kutu grafiği şeklinde de gösterilmektedir.

Tablo 4.13: Tunika intima ve tunika mediya tabakalarının kalınlık ölçümleri ile intima/mediya oranları.

		İNTİMA	MEDİYA	İNTİMA /MEDİYA
		medyan (min-maks)	medyan (min-maks)	ort ± ss
	1.G (n=6)	7,31 (6,12-9,69)	213,59 (202,42-265,91)	0,034 ± 0,005
	2.G (n=5)	69,11 (46,68-78,14)	458,72 (380,68-480,86)	0,147 ± 0,015
	3.G (n=5)	170,34 (111,23-180,34)	546,34 (511,02-698,12)	0,285 ± 0,053
	4.G (n=5)	237,05 (206,03-273,05)	412,76 (402,65-649,09)	0,526 ± 0,115
	5.G (n=5)	60,10 (39,38-133,37)	484,10 (302,79-582,43)	0,164 ± 0,079
p	1 vs 2	0,004	0,004	0,099
	1 vs 3	0,004	0,004	0,000
	1 vs 4	0,004	0,004	0,000
	1 vs 5	0,004	0,004	0,037
	2 vs 3	0,008	0,008	0,032
	2 vs 4	0,008	0,841	0,000
	2 vs 5	1,000	0,310	1,000
	3 vs 4	0,008	0,095	0,000
	3 vs 5	0,016	0,095	0,083
	4 vs 5	0,008	0,690	0,000

Kontrol grupları dışında, en kalın intima tabakasının 4. grupta, en ince intima tabakasının 5. grupta olduğu; en kalın mediya tabakasının 3. grupta, en ince mediya tabakasının da 4. grupta olduğu tespit edilmiştir. En düşük intima/mediya oranları ise sırasıyla kontrol ve kolesterol grubunda gözlenirken, ekstre grupları arasında en düşük intima/mediya oranının 5. grupta olduğu, en yüksek intima/mediya oranının da 4. grupta olduğu tespit edilmiştir.



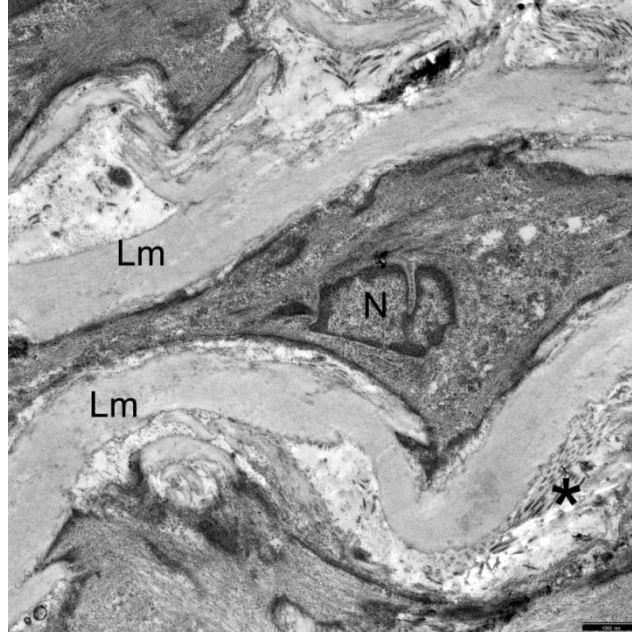
Şekil 4.16: İntima/mediya oranlarının kutu grafiği şeklinde gösterilmesi.

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Bulguları:

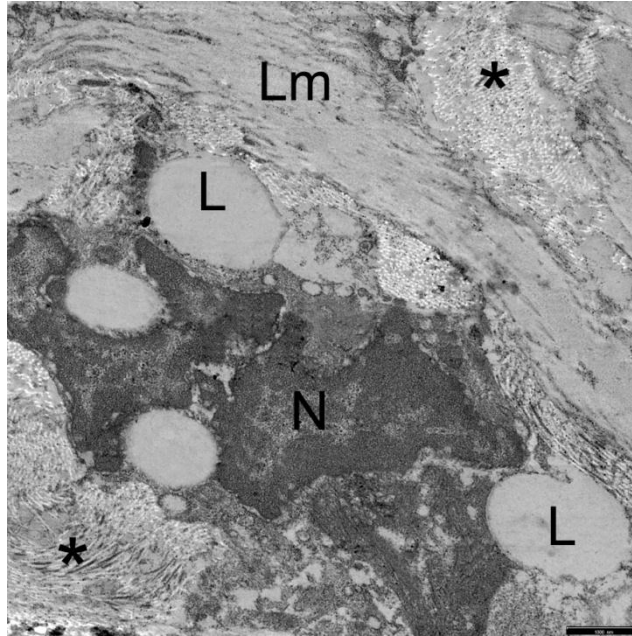
1. gruba ait ince kesitlerin elektron mikroskobu incelemesinde düzenli dizilim gösteren elastik lameller arasında vasküler düz kas hücreleri izlenmiştir. Kas hücrelerinin çevresinde ve elastik lameller arasında kollajen lifler görülmüştür (Şekil 4.17).

2. gruba ait aort örneğinden alınan ince kesitte vasküler düz kas hücresi sitoplazmasında ve ekstraselüler matrikste birikim gösteren lipid damlacıkları izlenmiştir (Şekil 4.18).

3., 4. ve 5. gruplara ait TEM incelemelerinde benzer bulgular tespit edilmiştir. 4. gruba ait aort örneğinin elektron mikroskobu incelemesinde vasküler düz kas hücresi sitoplazmasında, 2. gruba oranla daha fazla lipid damlacıkları gözlenmiştir. Ayrıca yine 2. gruptan farklı olarak elastik lamellerde bozulma dikkat çekmiştir (Şekil 4.19).

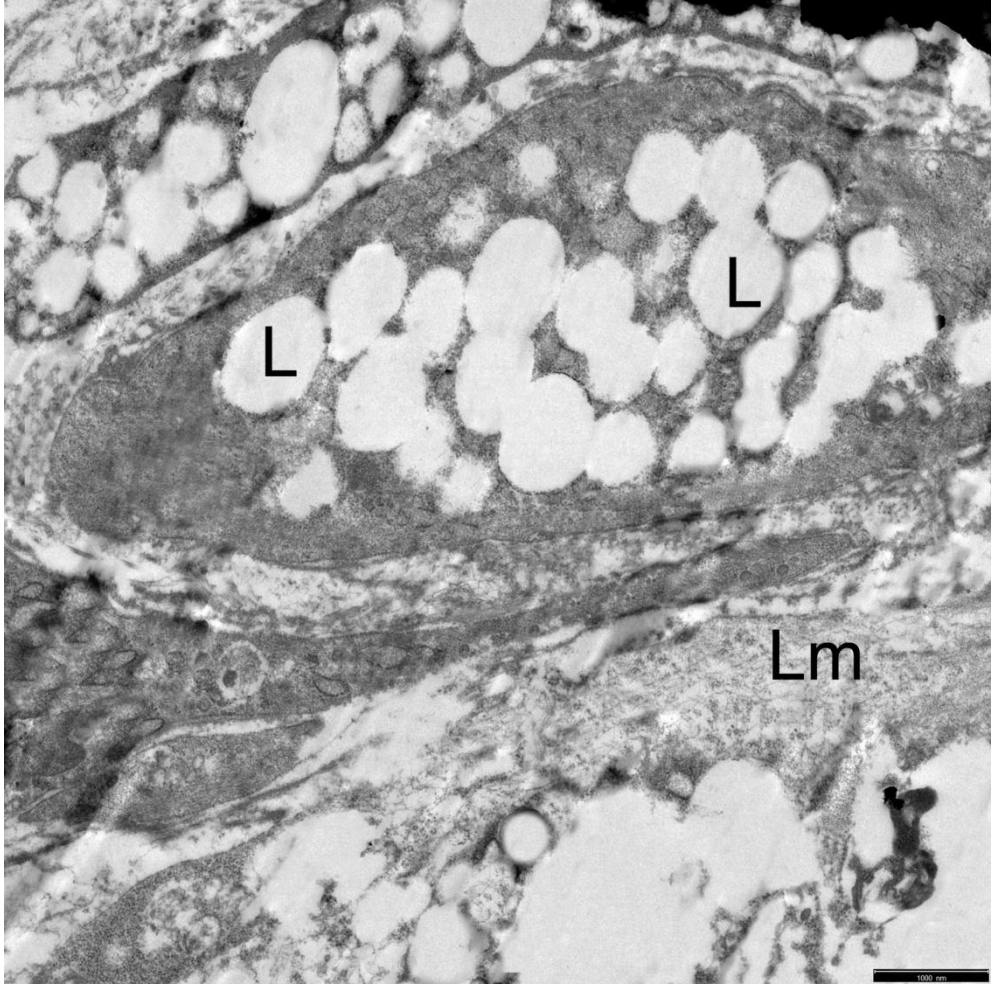


Şekil 4.17: 1. gruba ait TEM mikrografı. Elastik lameller arasında yerleşmiş vasküler düz kas hücresi izlenmektedir. N: Vasküler düz kas hücresi çekirdeği, Lm: Elastik lameller, *: Kollajen lifler. X 7750.



Şekil 4.18: 2. gruba ait TEM mikrografı. Vasküler düz kas hücresi sitoplazmasında ve ekstraselüler matrikste birikim gösteren lipid damlacıkları görülmektedir. N:

Vasküler düz kas hücresi çekirdeği, Lm: Elastik lameller, *: Kollajen lifler, L: Lipid damlacıkları. X10.000.



Şekil 4.19: 4. gruba ait TEM mikrografı. Vasküler düz kas hücresi sitoplazmasında lipid damlacıkları gözlenmektedir. Elastik lamellerde bozulma dikkat çekmektedir. Lm: Elastik lameller, L: Lipid damlacıkları. X 10.000.

5. TARTIŞMA

DSÖ'nün yayınladığı raporlara göre, tüm dünyada insanlarda görülen ölüm sebepleri arasında birinci sırada yer alan KVVH'ların ortaya çıkmasının ana sorumlusunun ateroskleroz olduğu tespit edilmiştir (1-4). KVVH'lardan korunma adına birçok bitki ve onlardan elde edilen ekstratlarla ilgili çok sayıda bilimsel araştırma yapılmış ve insan sağlığı ile ilgili olumlu etkilerinin olduğuna ve olabileceğine dair oldukça fazla sayıda veri elde edilmiştir (9, 14, 28, 38). Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, fenolik bileşiklerin ve bu molekülleri yapısında bulunduran bitkilerin ve bitki ekstratlarının ateroskleroza karşı çeşitli mekanizmalarla koruyucu etkiler gösterebileceklerine dair veriler elde edilmiştir (16, 23-28, 43). Bu bitkilerden biri de, yapısında yüksek oranda fenolik bileşik bulunduran, yüksek antioksidan ve serbest radikal temizleme yeteneğine sahip olan ve geleneksel tıpta; solunum ve gastrointestinal sistem rahatsızlıkları gibi oldukça geniş bir yelpazedeki hastalık ve rahatsızlıkların tedavisinde, çeşitli amaçlar için yaygın bir biçimde kullanılmakta olan *P. major*'dur (29-34).

"*P. major* yaprağı ekstre"lerinin (PMYE), ateroskleroz üzerine etkileri ile ilgili ve aterosklerotik hayvan modelleri ile ilgili literatürde sadece, Angarskaya ve Sokolova tarafından 1962 yılında yapılan, hiperkolesterolemik diyetle ateroskleroz oluşturulmuş tavşanlarda *P. major* yapraklarının direkt etkilerinin ve içeriğı ile ilgili bilgi verilmeyen bir ekstrelerinin etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunabilmiştir (43). Çalışmada kullanılan YZA ırkından 50 adet tavşan üç gruba ayrılmıştır ve 1. grupta 0,2 g/kg dozunda kolesterol oral yoldan uygulanmış, 2. grupta birinci gruba yapılarına ilave olarak 50 g/gün kurutulmuş *P. major* yaprağı yedirilmiş ve üçüncü gruba ise birinci gruba yapılarına ilave olarak nasıl hazırlandığı açıklanmayan *P. major* yaprağı ekstrelerinden 1 ml/gün oral yoldan verilmiştir. Üç aylık süre boyunca, kolesterol grubundaki TK değerleri giderek artmakta iken, hem yaprak, hem de ekstre verilen gruplarda, önce ilk ayda hafif bir TK yükselmesi olduğu, ardından üç aylık süre sonunda her ikisinde de başlangıç TK seviyelerine geri geldiğı gösterilmiştir. Deney sonunda ayrıca tavşanların aortlarında, özellikle çıkan aortada olduğu gözlenen aterosklerotik plakların kalitatif özellikleri de incelenmiş ve ikinci

ve üçüncü gruplarda birinci gruba oranla plak oluşumunda azalma tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise kolesterol grubundaki serum TK seviyelerindeki artış, en düşük, orta ve en yüksek dozda ekstre alan gruplardaki artışın gerisinde kalmakla beraber, literatür bilgileriyle uyumlu bir seyir göstermiştir (219). Çalışmamızda PMYE alan grupların, Angarskaya ve Sokolova'nın sonuçlarının aksine, ekstre gruplarında kolesterol grubuna göre daha yüksek serum TK seviyelerine sahip oldukları, ancak ekstre miktarının en az olduğu 3. gruptan, en yoğun olduğu 5. gruba doğru serum TK seviyelerinin giderek azaldığı ve 5. grupta kolesterol grubuyla hemen hemen eşitlendiği tespit edilmiştir. Çalışmamızda tavşanlara verilmek üzere, 10 cc'lik enjektörlerde hazırlanan kolesterol süspansiyonlarının içine PMYE eklenerek uygulamalar yapılırken, ekstre gruplarının kolesterolü, ekstre miktarıyla doğru orantılı olarak daha çözünür kıldığı görülmüştür. Tavşanların mide hacimleri küçük olduğundan, uygulamalarımızda verilen süspansiyon hacmini, sabah 10 cc ve akşam 10 cc olacak şekilde ikiye ayırarak uygulamak durumunda kaldık. PMYE ile kolesterol, tavşanlara aynı enjektörde verildiğinden bu durum, PMYE'nin, yapısındaki lipofilik moleküller nedeniyle kolesterol emilimini artırmış olabileceğini veya bilinmeyen başka bir mekanizmayla kolesterol seviyelerini artırmış olabileceğini düşündürmektedir.

Angarskaya ve Sokolova'dan farklı olarak lipid parametreleri incelemelerinde serum TG ve LDL kolesterol seviyelerine de bakılmıştır. Çalışma sonunda kontrol grubu hariç en düşük serum TG seviyesine 5. grubun, en yüksek TG seviyesine ise 3. grubun sahip olduğu gözlenmiştir. Ekstre grupları arasında, 3. gruptan 5. gruba doğru TG seviyelerinin giderek azaldığı ve 5. grupta kolesterol grubunun da altına düştüğü gözlenmiştir. Kontrol grubu hariç en düşük serum LDL kolesterol seviyesine de 5. grubun sahip olduğu ve kolesterol grubundan da düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu bulguların, Angarskaya ve Sokolova'nın gösterdiği, *P. major*'un kolesterol düşürücü etkinliği ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

Yine Angarskaya ve Sokolova'dan farklı olarak, bizim çalışmamızda aterosklerotik plakların Sudan IV ile yapılan boyamaları sonucunda, ekstre grupları arasında boya tutan plak alanlarının tüm damar yüzey alanına oranları açısından en büyük orana, en

fazla ekstre miktarına sahip 5. grubun, en düşük orana ise en düşük ekstre miktarına sahip 3. grubun sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durum, bu iki grubun serum TK seviyeleri ve LDL kolesterol seviyeleri ile plak alanları/tüm yüzey alanı oranları arasında ters bir ilişki olduğunu göstermiştir. Bunun bir sebebi olarak, 5. grupta gözlenen plak alanları/tüm yüzey alanı oranlarının oldukça yüksek standart sapmaya ($19,9 \pm 12,9$) sahip olması, bazı hayvanlarda az boyanma gözlenmekle beraber (% 4, % 15, % 17), bazılarında yüksek boyanma gözlenmiş olması (% 24,3, % 39,2 gösterilebilir. Ayrıca, bu konuda eskiden yapılan çalışmalarda bazı tavşanların, spontan olarak çok yüksek kolesterol seviyelerine ulaşabildikleri ve yüksek aterom plağı seviyeleri gösterebildikleri tespit edilmiştir (219, 234). Bu kadar az sayıda hayvanla yapılan çalışmalarda bu durum, çalışma sonuçlarının yanlış yorumlanmasına neden olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca rakamsal olarak en yüksek orana 5. grubun sahip olduğu gözlenirken, istatistiksel olarak ise gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmemektedir. Hayvan sayılarımız çok az olduğundan, bu durumun gerçek durumu tam olarak yansıtmayı yansıtmadığı şüphelidir. Ayrıca kontrol grubu hariç, tüm gruplardaki tavşanlarda, normal serum seviyelerinin kat kat üstünde, aşırı TK ve LDL kolesterol seviyeleri gözlenmiştir. Bu kadar yüksek kolesterol değerlerinin, gruplarda daha sağlıklı değerlendirilebilmesi için oldukça fazla sayıda hayvana ve çok daha fazla aralıkta ekstre miktarlarıyla çalışma yapılmasına gereksinim bulunmaktadır. İntima/mediya oranları açısından ise ekstre grupları arasında, 3. ve 4. gruptan oldukça düşük seviyelere sahip olmak üzere, en düşük TK değerlerine sahip 5. grubun, en düşük intima/mediya oranına ve tüm gruplar içerisinde de en düşük intima kalınlığına sahip olduğu gözlenmiştir. En yüksek TK seviyeleri ise 3. grupta görülmesine rağmen, en yüksek intima kalınlığına ve intima/media oranına sahip grubun 4. grup olduğu gözlenmiştir. 3. ve 4. grupların TK seviyeleri arasında istatistiksel bir farklılığın bulunmadığı ve TK değerlerinin, 3. grupta biraz daha fazla olmak üzere, birbirlerine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Bu yüzden, hem kolesterol seviyelerinin birbirlerine yakın ve oldukça yüksek seviyelerde bulunması, hem de hayvan sayılarının azlığı göz önüne alındığında, 4. gruptaki bu intima/media oranı yüksekliğini açıklayabilmek için daha fazla veriye ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda ayrıca, endotel disfonksiyonu ve ateroskleroz oluşumu ile ilgili en önemli parametrelerden olan NO[•], NOS ve ADMA seviyeleri, ayrıca hem NO[•]-NOS sistemini bozmaları, hem ADMA sentezini artırmaları, hem de ateroskleroz oluşumunun diğer bir ana nedeni olan LDL oksidasyonuna neden olmalarından dolayı oksidan sistem elemanları da incelemeye tabi tutulmuştur. Endotel disfonksiyonu, aterosklerozun tüm basamaklarında etkili olan ve inflamatuvar, proliferatif ve koagülasyona yatkınlık durumları ile beraberlik gösteren, ateroskleroz oluşumunun ana mekanizmalardan biridir (47, 50). Endotel disfonksiyonunun en önemli nedenlerinden biri, NO[•] ile ilişkili vasküler reaktivitede görülen bozulmalardır (50). NO[•]'nun, damar tonusunu ayarlama, trombosit kümelenmesini engelleme ve vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmalarını engelleme gibi pek çok fonksiyonu bulunmaktadır (52). Çeşitli farmakolojik ve hemodinamik uyarılara endotel hücrelerince yetersiz NO[•] cevabının oluşması, aterosklerozun gözlenen ilk fizyolojik bulgusudur (54, 55). Sonuçta NO[•]-NOS sistemindeki bozukluklar sonucu oluşan endotel disfonksiyonu neticesinde, lökositlerin arter duvarına adezyonu, subendotel alana geçişleri, vasküler düz kas hücrelerinin göçü ve proliferasyonu tetiklenmiş olur.

ADMA ve NO[•]-NOS sistemi ile ROT'lerine yönelik yaptığımız oksidan/antioksidan sistem parametreleri ile ilgili çalışmalarda, hazırladığımız PMYE'nin verdiğimiz miktarları arasında, ADMA seviyelerinde en düşük ve NO[•]-NOS sisteminde de en yüksek değerlere sahip grubun 0,5 g/kg miktarında PMYE verilen 4. grup olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma sonunda, aort dokusunda, tüm gruplar arasında en yüksek NO[•] seviyesine 4. grubun sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, çalışma sonunda serum NO[•] değerlerinde de tüm gruplar arasında en yüksek değere 4. grubun sahip olduğu ve ilk üç gruba göre yaklaşık 10 kat daha yüksek olduğu ve çalışma başlangıcına göre ise 3 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Gomez-Flores ve arkadaşlarının yaptığı in vitro bir çalışmada, *P. major* yaprağı ekstrelerinin makrofajlardan, doz bağımlı bir biçimde NO[•] salınımını artırdığı gösterilmiştir ve bu durumun bizim çalışmamızda da gösterilen NO[•] artışıyla uyumlu bulunduğu tespit edilmiştir (235). Çalışma sonu

serum NOS seviyelerinde ise, başlangıç değerlerine göre en yüksek artışın 4. grupta olduğu ve yaklaşık 10 katlık bir artış olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışma sonunda gruplar arasında en yüksek serum NOS değerine de 4. grubun sahip olduğu ve kontrol grubuna göre yaklaşık 8 kat daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Serum ADMA seviyelerinde de, başlangıç seviyelerine göre en büyük düşüşün 4. grupta olduğu belirlenmiştir. Çalışma sonu serum ADMA seviyelerinde de, tüm gruplar arasında en düşük değere 4. grubun sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışma sonunda, oksidasyona maruziyetin bir göstergesi olan serum MDA seviyelerinde ise, kontrol grubu hariç, tüm gruplar arasında en düşük değere 4. grubun sahip olduğu tespit edilmiştir.

Çalışma sonunda, 1 g/kg miktarında PMYE verilen 5. grubun ise, aort dokusunda en düşük ADMA ve en yüksek NOS seviyelerine sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, 5. grupta serum NO^{*} seviyelerinin, ilk üç gruba göre yaklaşık 5 kat daha yüksek olduğu ve serum NOS seviyelerinde ise en yüksek ikinci değere sahip olduğu ve başlangıç seviyelerine göre 10 kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, 5. grubun, aort dokusunda oksidan sistem elemanlarından olan MDA ve KO seviyeleri açısından da en düşük değerlere sahip olduğu gözlenmiştir. Serumda da KO seviyeleri açısından, ekstre grupları arasında en düşük değere 5. grubun sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, çalışma sonunda, antioksidan bir enzim olan, serum KAT değerlerinde de, en yüksek değere 5. grubun sahip olduğu gözlenmiştir. Yakın zamanda Öztürk ve Şimşek tarafından yürütülen bir TÜBİTAK Projesi çalışmasında, *P. major* yapraklarının su, % 80 etanol ve % 80 metanolle hazırlanan ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri (% inhibisyon), sırasıyla sulu ekstrede % 90,3, % 80 etanol ekstresinde % 93,3 ve % 80 metanol ekstresinde % 93,2 gibi oldukça yüksek seviyelerde bulunmuş ve *P. major*'un güçlü ROT temizleyici etkilerinin bulunduğu gösterilmiştir (29). DMBA (7,12-dimethylbenz(a)antrasen) ile oksidatif stres oluşturulan ratlarla yapılan bir hayvan çalışmasında da, *P. major*'un hazırlanan sulu ekstresinin oral yoldan uygulanmasıyla MDA seviyelerindeki anlamlı düşmeyle ($p<0,01$), KAT ($p<0,05$) ve KA (karbonik anhidraz) ($p<0,01$) enzim aktivitelerindeki ve GSH düzeylerindeki ($p<0,01$) ise anlamlı yükselmelerle, *P. major*'un oksidatif strese ve lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağladığı gösterilmiştir (215). Rat karaciğerlerinde in

vitro yapılan bir çalışmada da, *P. major*'un etanolle hazırlanmış ekstrelerinin, güçlü $O_2^{\cdot-}$ radikali temizleme özelliğine sahip olduğu ve MDA seviyelerini önemli ölçüde düşürdüğü tespit edilmiştir (236). Bu çalışmaların bulgularıyla, bizim çalışmamızdaki KO enzim aktivitesi ve MDA seviyeleri ile ilgili elde ettiğimiz bulguların uyumlu oldukları gözlenmiştir.

Çalışma sonunda, tüm gruplarda, serum AST, ALT, BUN ve KREA seviyeleri gibi karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri ile serum CRP ve homosistein seviyeleri yönünden ise istatistiksel olarak herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Bu çalışmada PMYE'nin karaciğer ve böbrek üzerine toksik bir etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir. *P. major* ile daha önceden yapılan toksisite çalışmaları da mevcuttur. Yapılan çeşitli çalışmalarda, *P. major*'un oral yolla ve periton içi uygulamalarının, ratlarda çok düşük toksisiteye sahip olduğu gösterilmiştir (237). Fareler gibi daha küçük hayvanlarda yapılan akut toksisite çalışmalarında ise, *P. major* yaprağı ekstresinin oral yolla uygulanması sonucunda, in vivo LD₅₀ dozunun 182,54 mg/kg gibi fareler için oldukça yüksek miktarlarının toksik etkili olduğu bulunmuştur (238). Türel ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı çalışmalarda, *P. major*'un ratları, CCl₄ ile uyarılmış hepatotoksisiteye karşı koruduğu ve ayrıca güçlü antiinflamatuvar etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir (239). Ayrıca, ratlarda ayak ödemi üzerine yapılan bir çalışmada, *P. major* yapraklarının sulu ekstrelerinin oral yolla uygulanmasıyla da, *P. major*'un antiinflamatuvar ve analjezik etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir (240). Yapılan bu çalışmalar, PMYE'nin farelerde, ratlarda ve tavşanlarda oral toksisitesinin düşük olduğunu göstermektedir. İnsanlarda, hipertansiyon üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla, *P. major*'un tüm bitki bileşenlerinin kurutularak tabletler halinde, günde toplamda 9 g olarak 12 hafta boyunca uygulandığı bir çalışmada, sistolik ve diyastolik tansiyon değerlerinin $150 \pm 2,58 / 98 \pm 1,33$ mmHg seviyelerinden $129 \pm 2,77 / 86 \pm 1,63$ mmHg ($p < 0,001$) seviyelerine düştüğü gözlenmiş ve bu çalışma sırasında bu miktarda ve bu sürede *P. major* bitkisi tüketiminin karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri üzerine herhangi bir toksik etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir (38). Ayrıca, *P. major*'un yaprak, çiçek ve ince gövde kısımlarından hazırlanan ekstrelerinin, izole rat karaciğerini, güçlü OH $^{\cdot}$ radikali ve ROT temizleyici etkileri aracılığıyla, oksidatif toksisiteden koruduğu da gösterilmiştir (31).

Işık mikroskobu incelemelerinde, 1. gruba ait aort kesitlerinde tunika intimada, yüzeyde endotel hücrelerinin sağlam ve olağan görünümde olduğu, endotel altında ince bir subendotel tabakasının bulunduğu, tunika medyada elastik liflerin ve vasküler düz kas hücrelerinin iyi organize olduğu izlenmiştir. Elde ettiğimiz bu bulguların, normal bir aort dokusuyla uyumlu olduğu tespit edilmiştir (46). 2. grupta (kolesterol grubu), intima tabakasında belirgin kalınlaşma, endotel hücrelerinde ayrılma ve subendotelyal alanda köpük hücrelerinin sayısında belirgin artış ile yer yer intimada hasar gözlenmiştir. Mediya tabakasında elastik lamellerde düzensizlik ve kırılmalar, yer yer ekstraselüler matriks artışı izlenmiştir. Bu bulguların da, daha önceki çalışmalarda hiperkolesterolemik diyetle oluşturulan ateroskleroz modelleriyle uyumlu olduğu belirlenmiştir (220, 241).

3. gruba ait örneklerde intimada kalınlaşma ve köpük hücrelerinde belirgin sayı artışı yanında tunika intima-media sınırına yakın alanda düz kas hücreleri arasında ekstraselüler matriks artışı izlenmiştir. 4. gruba ait aort örneklerinde intimada kalınlaşma ve köpük hücrelerinde belirgin sayı artışı yanında tunika intima-media sınırında ve intimada ekstrasellüler matriks artışı, tunika mediada elastik lamellerde düzensizlik ve kırılma, düz kas hücrelerinde köpükleşme dikkat çekmiştir. 5. gruba ait aort örneklerinde intimada endotel hücrelerinde ayrılma, subendotel tabakasında köpük hücrelerinde artış, intima tabakasında kalınlaşma ve yüzey hasarı gözlenmiştir. İntima-media sınırında vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyon ve ekstraselüler matrikste artış, elastik lamellerde düzensizlik ve kırılmalar izlenmiştir. Bu çalışmada kullanılan yüksek doz kolesterolle kısa dönemde oluşturulan ateroskleroz modelinin histolojik karşılaştırmalar için uygun bir model olmadığı düşünülmektedir. Aterosklerotik lezyon çalışmaları için daha uygun olan modeller, ileri aterosklerotik lezyonların ve koroner arter aterosklerozunun da görüldüğü düşük dozda ve uzun vadede uygulanan (örneğin % 0,25 (w/w) kolesterol içeren diyetle 8 ay) modellerdir (224). Böyle bir model oluşturularak yapılacak başka bir çalışma sonucunda elde edilecek verilerin karşılaştırılmasının daha anlamlı sonuçlar verebileceği düşünülmektedir.

Elektron mikroskobu incelemelerinde kontrol grubunda düzenli dizilim gösteren elastik lameller arasında vasküler düz kas hücresi izlenmiştir. Kolesterol grubunda ise vasküler düz kas hücre sitoplazmasında ve ekstraselüler matrikste birikim gösteren lipid damlacıkları izlenmiştir. 3., 4. ve 5. gruplara ait TEM incelemelerinde ise kendi aralarında benzer bulgular tespit edilmiştir. Örneğin, 4. gruba ait aort örneğinin elektron mikroskobu incelemesinde vasküler düz kas hücre sitoplazmasında, 2. gruba oranla daha fazla lipid damlacıkları gözlenmiştir. Ayrıca yine 2. gruptan farklı olarak elastik lamellerde bozulma dikkat çekmiştir. Tüm bu gruplarda görülen bulguların, hiperkolesterolemik diyetle ateroskleroz oluşturulan tavşanlarda görülen elektron mikroskobu bulguları ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir (242).

Her ne kadar elde ettiğimiz sonuçlar, konu üzerinde daha ileri ve ek çalışmalar yapılması yönünde karşımıza bir takım olumlu veriler sunsa da, karşılaştığımız bazı güçlükler nedeniyle istediğimiz çalışma planını uygulama imkanı bulamadık. Etik kurul onayı aldığımız T.C. Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun çalışmamızdaki her grubu en çok 6 hayvanla sınırlandırmasından ve bu çalışmaların doğası gereği istenmeyen ölümlerin gerçekleşmesi nedeniyle sayıların daha da azalması sonucunda, çalışma gruplarında yeterli ve güvenilir istatistik sonuçları elde etmek güçleşmiştir.

Tavşanlarda ateroskleroz oluşturma modelleri içinde insan tipi aterom plaklarının oluştuğu en uygun model olan % 0,25'lik kolesterol diyetiyle 8 ay boyunca uygulanacak bir çalışma için gerekli bütçeyi Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından tez çalışmaları için ayrılan ödenek karşılayamamaktadır.

Ayrıca çalışmada kolesterolü süspansiyon şeklinde oral yolla değil de, özel hazırlanmış hiperkolesterolemik diyetlerle tavşanlara verme planımız olmasına rağmen, Türkiye'de bu tür özel diyetlerin üretiminin yapılmaması ve yurt dışı fiyatlarının 3 aylık çalışma planladığımızda bile proje bütçesini oldukça aşması,

bütçemizi aşmasa bile bu tür diyetlerin Türkiye'ye girişinde sorunlar yaşanması nedeniyle bu tür bir uygulama yolunu tercih ettik.

Hiperkolesterolemik diyet oluşturma amacıyla, pellet yemlerin ezilmesi ve pellet yemle homojen olarak karışımı için kolesterolün ek çözücü maddeler kullanılarak çözülüp, yerel şartlarda bu tür yemlerin üretimini ise ek kimyasalların çalışmamızın sonuçlarını etkileyebileceği gerekçesiyle ve tavşanların ratlar ve farelere oranla oldukça ağır olduklarından çalışma süresince yemlerde verilecek fireler de hesaba katıldığında bu kadar fazla miktarda kolesterol, ek çözücü kimyasallar ve fabrikasyon ücreti bütçemizi aşacağından bu yolu da tercih etmedik. Ayrıca, sadece kuru ham ekstre ve belirli bir süre kolesterol diyeti aldıktan sonra kuru ham ekstre ilave edilen gruplar gibi oluşturmak istediğimiz bazı ek grupları da yine bütçemiz yetersiz kaldığından oluşturamamış bulunmaktayız.

Elde ettiğimiz bulgular; daha uygun bir ateroskleroz modeli varlığında, histopatolojik olarak da olumlu sonuçlar elde etme potansiyelinin olabileceğini düşündürmekte ve tüm bu olumsuz şartların giderildiği koşullarda bu çalışma yapıldığında ne gibi sonuçlar elde edilebileceği konusunda merak uyandırmaktadır.

6. SONUÇLAR

1. *P. major* yaprağı ekstresinin verdiğimiz miktarları arasında, ateroskleroz gelişiminde oldukça önemli bir yere sahip olan ADMA, NO[•] ve NOS sistemi açısından incelendiğinde, 0,5 g/kg dozunda ekstre verilen orta doz grubunun, tüm gruplar arasında en yüksek serum NO[•] ve NOS seviyeleri ile en yüksek aort NO[•] seviyelerine, ayrıca en düşük serum ADMA seviyelerine sahip olduğu tespit edilmiştir.
2. Kontrol grubu hariç, en düşük serum LDL kolesterol ve TG seviyeleri ile ekstre grupları arasında en düşük TK ve intima/mediya oranına, ayrıca aort dokusunda en düşük ADMA ve en yüksek NOS seviyelerine sahip grubun, 1 g/kg miktarında PMYE verilen en yüksek doz grubu olduğu tespit edilmiştir.
3. Çalışma sonunda oksidan/antioksidan sistem parametreleri açısından, istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememekle beraber, orta ve yüksek doz gruplarında, MDA ve KO seviyelerinin düşük ve KAT seviyesinin ise yüksek olduğu gözlenmiştir.
4. Çalışmada, tavşanların karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık olmadığı ve hazırladığımız kuru ham ekstrenin hem karaciğer, hem de böbrek üzerine toksik etkilerinin bulunmadığı tespit edilmiştir.
5. İnflamatuvar belirteçlerden ve ateroskleroz risk faktörlerinden biri olan CRP seviyelerinin ise gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca, diğer bir ateroskleroz risk faktörü olan homosistein seviyelerinin de gruplar arasında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık göstermediği tespit edilmiştir.

6. Boyanma göstermeyen kontrol grubu dışında, diğer gruplarda Sudan IV boyaması sonucunda plak alanları/tüm yüzey alanı oranları açısından istatistiksel bir farklılık saptanmamıştır.

7. Çalışmada ekstre gruplarının kolesterol seviyelerinin, kolesterol grubuna göre daha yüksek olduğu, ancak kendi içlerinde ekstre dozu arttıkça kolesterol seviyelerinin giderek azaldığı tespit edilmiştir.

8. Ekstre verilen gruplarda total kolesterol seviyelerinin, tek başına kolesterol verilen gruba göre yüksek bulunmasının sebebinin, teknik nedenlerle kolesterol ve ekstreyi birlikte vermenin dezavantajlarından kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu nedenle *P. major* yaprağı ekstresi ile kolesterolün ayrı ayrı verilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

9. Yaşadığımız tüm kısıtlılıklara rağmen, elde ettiğimiz sonuçlar; bu kısıtlılıkların ortadan kaldırıldığı ve deney hayvanları gruplarının oluşturulmak istenen tüm gruplarda en az 10 hayvanla belirlendiği ve istatistiksel olarak daha güvenilir sonuçların elde edilebileceği yeni çalışmalarla, *P. major* yaprağı ekstrelerinin ateroskleroz üzerine etkilerinin araştırılmaya devam edilmesi gerektiği yönünde teşvik edici görünmektedir.

ÖZET

PLANTAGO MAJOR'UN HİPERKOLESTEROLEMİK DİYETLE ATEROSKLEROZ OLUŞTURULAN TAVŞANLARDA ATEROSKLEROZ VE ATEROSKLEROTİK RİSK FAKTÖRLERİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Amaç: Bu çalışmada, *Plantago major* ekstresinin hiperkolesterolemik diyetle ateroskleroz oluşturulan tavşanlarda ateroskleroz, aterosklerotik risk faktörleri ve oksidan/antioksidan sistem üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: 26 adet Yeni Zelanda ırkı albino erkek tavşan beş gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu, ikinci grup kolesterol grubu ve diğer üç grup ise *Plantago major* ekstresi (PME) grupları olarak belirlendi. Kontrol grubuna serum fizyolojik verilirken, kolesterol grubuna 1 g/kg/gün dozunda kolesterol verildi. PME gruplarına, 1 g/kg/gün dozunda kolesterole ek olarak sırasıyla 0,1 (düşük); 0,5 (orta) ve 1,0 (yüksek) g/kg/gün dozunda PME verildi. Gruplara belirlenen miktarlardaki serum fizyolojik, kolesterol ve PME oral yoldan, 12 hafta boyunca uygulandı. Tavşanların serumlarında homosistein, CRP, total kolesterol, LDL kolesterol, HDL kolesterol, trigliserid (TG), AST, ALT, BUN ve kreatinin düzeylerine bakıldı. Nitrik oksit sentaz (NOS), glutatyon peroksidaz (GPO), katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) (yalnızca aort dokusunda) ve ksantin oksidaz (KO) enzim aktiviteleri ile asimetrik dimetil arjinin (ADMA), nitrik oksit (NO[•]) ve malondialdehid (MDA) düzeyleri ise hem serum hem de aort doku örneklerinde çalışıldı. Ayrıca, çıkarılan aort dokularının histopatolojik değerlendirmeleri yapıldı.

Bulgular: Total kolesterol seviyesinin PME gruplarında kolesterol grubuna göre yüksek olduğu, ancak PME gruplarında ekstrenin dozu arttıkça seviyesinin azaldığı gözlemlendi (kolesterol grubu 1277 mg/dL, düşük doz PME grubu 2089 mg/dL, orta doz PME grubu 1896 mg/dL ve yüksek doz PME grubu 1334 mg/dL). LDL ve TG değerlerinin kontrol grubu hariç, yüksek doz PME grubunda en düşük olduğu gözlemlendi (LDL değerleri: kolesterol grubu 629 mg/dL, yüksek doz PME grubu 577 mg/dL; trigliserid değerleri: kolesterol grubu 701,40 mg/dL, yüksek doz PME grubu 552,20 mg/dL). Serum ADMA seviyesinin orta doz PME grubunda en düşük değere sahip olduğu gözlemlendi (kolesterol grubu: 75,59 pg/mL, orta doz PME grubu: 61,32 pg/mL). Aort dokusu ADMA değerlerinin ise yüksek doz PME grubunda en düşük değere sahip olduğu gözlemlendi (kolesterol grubu: 193,34 pg/mL, yüksek doz PME grubu: 116,27 pg/mL). Serum NO[•] ve NOS değerlerinin ikisinin de orta doz PME grubunda en yüksek değerlere sahip olduğu gözlemlendi (NO[•] değerleri: kolesterol grubu 26,75 mM, orta doz PME grubu 204 mM, $p < 0,05$ ve NOS aktiviteleri: kolesterol grubu 25,05 IU/ml, orta doz PME grubu 48,94 IU/ml). Aort dokusunda KO enzim aktivitesi ve MDA seviyesinin, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, yüksek doz PME grubunda en düşük değere sahip olduğu gözlemlendi (MDA değerleri: kolesterol grubu 1,036 nmol/mg, yüksek doz PME grubu 0,555 nmol/mg; KO aktiviteleri: kolesterol grubu 0,033 mIU/mg, yüksek doz PME grubu 0,013 mIU/mg). Antioksidan enzimler (GPO, KAT, SOD) ile ilgili olarak ise gerek serum, gerekse de aort dokusundaki aktiviteleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı.

Sonuçlar: PME, ateroskleroz risk faktörü olarak değerlendirebileceğimiz ADMA'nın seviyesini hem serumda hem de aort dokusunda düşürmüş, buna mukabil antiaterosklerotik faktörler olarak değerlendirebileceğimiz NO[•] seviyesini ve NOS aktivitesini artırmıştır. Ayrıca, LDL kolesterol ve TG seviyelerini yüksek doz PME verilen hayvanlarda en düşük seviyeye indirdiği gözlenmiştir. Bunların dışında, PME'nin aort dokusunu oksidasyona maruz kalmaktan doza bağlı olarak koruduğu gözlenmiştir (KO aktivitesinde ve MDA seviyesinde düşüş). Bu sonuçların, *P. major*'un ateroskleroz gelişimine etkileri ile ilgili daha ileri çalışmaların yapılması yönünde teşvik edici olduğu ve konu hakkında çalışma yapmak isteyenlere katkılar sağlayacağı değerlendirildi.

Anahtar Sözcükler: ADMA, ateroskleroz, hiperkolesterolemi, plantago major, tavşan.

SUMMARY

THE EFFECTS OF PLANTAGO MAJOR ON ATHEROSCLEROSIS AND ATHEROSCLEROTIC RISK FACTORS IN RABBITS FED WITH HYPERCHOLESTEROLEMIC DIET TO INDUCE ATHEROSCLEROSIS

Aim: The aim of this study was to investigate the effects of plantago major extract on atherosclerosis, atherosclerotic risk factors and oxidant/antioxidant system in rabbits fed with hypercholesterolemic diet to induce atherosclerosis.

Materials and Methods: Twenty-six male albino New Zealand rabbits were divided into five groups: The first group was assigned as Control group (n=6), the second group as Cholesterol group (n=5) and the remaining three groups as Plantago Major extract (PME) groups (n=5 in each). Saline to the animals in Control group and cholesterol (1 g/kg/day) to the animals in Cholesterol group were administered. In addition to cholesterol (1 g/kg/day), PME was also administered to the animals in three PME groups at the doses of 0,1 (low); 0,5 (medium) and 1,0 (high) g/kg/day. Saline, cholesterol and PME were administered orally for 12 weeks. Nitric oxide synthase (NOS), glutathione peroxidase (GPO), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) (in aort tissue only), xanthine oxidase (XO) enzyme activities and asymmetric dimethylarginine (ADMA), nitric oxide (NO^{*}) and malondialdehyde (MDA) levels were measured in both serum samples and aort tissue samples of the animals. Serum homocystein, CRP, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride, ALT, AST, BUN and creatinine levels were also determined. Additionally, histopathological examination of aort tissues in each group was done.

Results: Serum total cholesterol levels in three PME groups were found to be higher than cholesterol group. However, the levels of serum total cholesterol were found to be gradually decreased in PME groups, as the dose of the extract increases (cholesterol group: 1277 mg/dL; low dose PME group: 2089 mg/dL; medium dose PME group: 1896 mg/dL; high dose PME group: 1334 mg/dL). Serum LDL cholesterol and triglyceride levels were found to be the lowest in the high dose (1,0 g/kg/day) PME group compared to the groups other than Control group (LDL cholesterol: cholesterol group 629 mg/dL, high dose PME group 577 mg/dL; Triglyceride: cholesterol group 701,40 mg/dL, high dose PME group 552,20 mg/dL). Serum ADMA level was found to be the lowest in the medium dose PME group (cholesterol group: 75,59 pg/mL; medium dose PME group: 61,32 pg/ml) and aort tissue ADMA level in high dose PME group (cholesterol group: 193,34 pg/mL; high dose PME group: 116,27 pg/ml) compared to all other groups. Serum NO^{*} and NOS values both were found to be the highest in medium dose PME group compared to the other four groups (NO^{*} value: cholesterol group 26,75 mM, medium dose PME group 204 mM, $p < 0,05$; NOS activity: cholesterol group 25,05 IU/ml, medium dose PME group 48,94 IU/ml). Aort tissue XO activity and MDA level were found to be the lowest in high dose PME group compared to other PME groups (MDA values: cholesterol group 1,036 nmol/mg, high dose PME group 0,555 nmol/mg; XO activities: cholesterol group 0,033 mIU/mg, high dose PME group 0,013 mIU/mg).

As to the serum and aort tissue antioxidant enzyme activities (GPO, CAT, SOD) there were no remarkable differences between the groups.

Conclusions: Administration of PME was reduced the level of ADMA (which we may evaluate as an atherosclerosis risk factor) and on the contrary, increased the NO[•] level and NOS activity (both of which may be evaluated as antiatherosclerotic factors) in both serum and aort tissue. PME ingestion decreased the levels of LDL cholesterol and TG (to the lowest level in high dose PME). Additionally, PME administration was observed to have a preventive effect from oxidation in a dose dependant manner in aort tissue (decrease of XO activity and MDA level). The results of this study are evaluated as encouraging for carrying out further studies on the effects of *Plantago major* on atherosclerosis. The results of this study could also be beneficial for the researchers who are planning to study on the subject.

Key Words: ADMA, atherosclerosis, hypercholesterolemia, *plantago major*, rabbit.

KAYNAKLAR

1. WHO. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization, 2011.
2. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*. 2006; 3 (11): 2011-30.
3. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Robbins Basic Pathology. Philadelphia: Saunders, ELSEVIER, 2007.
4. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*. 2011; 473 (7347): 317-25.
5. Beers MH, Porter RS, Jones TV, Kaplan JL, Berkwits M. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. New Jersey: Merck Research Laboratories, Division of Merck AND Co., Inc., 2006.
6. Ernst E. Herbal Medicinal Products. *Br J Gen Pract*. 2002; 52 (478): 410.
7. Bent S, Ko R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. *The American journal of medicine*. 2004; 116 (7): 478-85.
8. Halberstein RA. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. *Annals of epidemiology*. 2005; 15 (9): 686-99.
9. Che CT, Wang ZJ, Chow MS, Lam CW. Herb-herb combination for therapeutic enhancement and advancement: theory, practice and future perspectives. *Molecules*. 2013; 18 (5): 5125-41.
10. Pericleous M, Mandair D, Caplin ME. Diet and supplements and their impact on colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2013; 4 (4): 409-23.
11. Liu ZL, Xie LZ, Zhu J, Li GQ, Grant SJ, Liu JP. Herbal medicines for fatty liver diseases (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; (8): 1-249.
12. Kma L. Roles of Plant Extracts and Constituents in Cervical Cancer Therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2013; 14 (6): 3429-36.
13. Cameron M, Chrubasik S. Topical herbal therapies for treating osteoarthritis (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2013; (5): 1-61.
14. Tachjian A, Maria V, Jahangir A. Use of herbal products and potential interactions in patients with cardiovascular diseases. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010; 55 (6): 515-25.

15. Munir KM, Chandrasekaran S, Gao F, Quon MJ. Mechanisms for food polyphenols to ameliorate insulin resistance and endothelial dysfunction: therapeutic implications for diabetes and its cardiovascular complications. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013; 305 (6): E679-86.
16. Khurana S, Venkataraman K, Hollingsworth A, Piche M, Tai TC. Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients.* 2013; 5 (10): 3779-827.
17. Tomas-Barberan FA, Andres-Lacueva C. Polyphenols and health: current state and progress. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2012; 60 (36): 8773-5.
18. Pandey KB, Rizvi SI. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid Med Cell Longev.* 2009; 2 (5): 270-8.
19. Kim HS, Quon MJ, Kim JA. New insights into the mechanisms of polyphenols beyond antioxidant properties; lessons from the green tea polyphenol, epigallocatechin 3-gallate. *Redox biology.* 2014; 2: 187-95.
20. Corcoran MP, McKay DL, Blumberg JB. Flavonoid basics: chemistry, sources, mechanisms of action, and safety. *Journal of nutrition in gerontology and geriatrics.* 2012; 31 (3): 176-89.
21. Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ, Spencer JP. Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients.* 2010; 2 (11): 1106-31.
22. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular aspects of medicine.* 2010; 31 (6): 435-45.
23. Vermeris W, Nicholson R. *Phenolic Compound Biochemistry.* The Netherlands: Springer, 2006.
24. Grassi D, Desideri G, Ferri C. Flavonoids: antioxidants against atherosclerosis. *Nutrients.* 2010; 2 (8): 889-902.
25. de Pascual-Teresa S, Moreno DA, Garcia-Viguera C. Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *International journal of molecular sciences.* 2010; 11 (4): 1679-703.
26. Azevedo MF, Camsari C, Sa CM, Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Ursolic acid and luteolin-7-glucoside improve lipid profiles and increase

liver glycogen content through glycogen synthase kinase-3. *Phytotherapy research* : PTR. 2010; 24 Suppl 2: S220-4.

27. Kim TJ, Kim JH, Jin YR, Yun YP. The Inhibitory Effect and Mechanism of Luteolin 7-Glucoside on Rat Aortic Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. *Arch Pharm Res*. 2006; 29 (1): 67-72.

28. Zeng Y, Song JX, Shen XC. Herbal remedies supply a novel prospect for the treatment of atherosclerosis: a review of current mechanism studies. *Phytotherapy research* : PTR. 2012; 26 (2): 159-67.

29. Öztürk HS, Şimşek E. Değişik Ekstraksiyon Yöntemleri Uygulanan Çeşitli Bitkilerden Elde Edilen Ekstraktların Fenolik Bileşen İçeriklerinin ve Antioksidan Güçlerinin Belirlenmesi. TÜBİTAK. 2011; Proje No: 109S236.

30. Kobeasy MI, Osama MA, El-Salam SMA, Mohamed ZEM. Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. *Int J Biodivers Conserv*. 2011; 3 (3): 83-91.

31. Mello JC, Guimaraes NS, Gonzalez MV, Paiva JS, Prieto T, Nascimento OR, Rodrigues T. Hydroxyl scavenging activity accounts for differential antioxidant protection of *Plantago major* against oxidative toxicity in isolated rat liver mitochondria. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 2012; 64 (8): 1177-87.

32. Samuelsen AB. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000; 71 (1-2): 1-21.

33. Metiner K, Özkan O, Ak S. Antibacterial Effects of Ethanol and Acetone Extract of *Plantago major* L. on Gram Positive and Gram Negative Bacteria. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2012; 18 (3): 503-5.

34. Nazarizadeh A, Mikaili P, Moloudizargari M, Aghajanshakeri S, Javaherypour S. Therapeutic Uses and Pharmacological Properties of *Plantago major* L. and its Active Constituents. *J Basic Appl Sci Res*. 2013; 3 (9): 212-21.

35. Zubair M, Nybom H, Lindholm C, Rumpunen K. Major polyphenols in aerial organs of greater plantain (*Plantago major* L.), and effects of drying temperature on polyphenol contents in the leaves. *Scientia Horticulturae*. 2011; 128 (4): 523-9.

36. Watkins F, Pendry B, Corcoran O, Sanchez-Medina A. Anglo-Saxon pharmacopoeia revisited: a potential treasure in drug discovery. *Drug discovery today*. 2011; 16 (23-24): 1069-75.
37. Cogo LL, Monteiro CL, Miguel MD, Miguel OG, Cunico MM, Ribeiro ML, de Camargo ER, Kussen GM, Nogueira KdS, Costa LM. Anti-helicobacter pylori activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. *Braz J Microbiol*. 2010; 41 (2): 304-9.
38. Nyunt TM, Lwin KK, Aye TT, Than MA, Chit K, Kyaw T, Hlaing OMT, Wun M, Win NN. Antihypertensive effect of *Plantago major* Linn. whole plant (Ahkyawpaung-tahtaung) on mild to moderate hypertensive patients. *The Myanmar Health Sciences Research Journal*. 2007; 19 (2): 97-102.
39. Velasco-Lezama R, Tapia-Aguilar R, Roman-Ramos R, Vega-Avila E, Perez-Gutierrez MS. Effect of *Plantago major* on cell proliferation in vitro. *J Ethnopharmacol*. 2006; 103 (1): 36-42.
40. Atta AH, Abo ELSK. The antinociceptive effect of some Egyptian medicinal plant extracts. *J Ethnopharmacol*. 2004; 95 (2-3): 235-8.
41. Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Lin CC. In vitro cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of *Plantago major* and *Plantago asiatica*. *Am J Chin Med*. 2003; 31 (2): 225-34.
42. Gálvez M, Martín-Cordero C, López-Lázaro M, Cortés F, Ayuso MJ. Cytotoxic effect of *Plantago* spp. on cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*. 2003; 88 (2-3): 125-30.
43. Angarskaya MA, Sokolova VE. The effect of plaintain (*Plantago major*) on the course of experimental atherosclerosis in the rabbit. *Biull Eksp Biol Med*. 1962; 53 (4): 50-3.
44. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart, lung & circulation*. 2013; 22 (6): 399-411.
45. Papakonstantinou NA, Stamou MI, Baikoussis NG, Goudevenos J, Apostolakis E. Sex differentiation with regard to coronary artery disease. *Journal of cardiology*. 2013; 62 (1): 4-11.

46. Welsch U. Sobotta Histoloji, Renkli Sitoloji, Histoloji ve Mikroskopik İnsan Anatomi Atlası, 5. Baskı, Çev. Editörü: Tekelioğlu M. İstanbul: Beta, 1999.
47. Favero G, Paganelli C, Buffoli B, Rodella LF, Rezzani R. Endothelium and Its Alterations in Cardiovascular Diseases: Life Style Intervention. *BioMed research international*. 2014; 2014: 1-28.
48. Yaylalı YT, Küçükaslan M. Endothelial dysfunction. *Pamukkale Medical Journal*. 2011; 4 (3): 152-7.
49. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012; 32 (9): 2045-51.
50. Gimbrone MA, Jr., Garcia-Cardena G. Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology*. 2013; 22 (1): 9-15.
51. Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. *Nitric Oxide*. 2001; 5 (2): 88-97.
52. Andreoli TE, Carpenter CCJ, Griggs R, Losscalzo J. *Cecil Essentials of Medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.
53. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction a marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003; 23 (2): 168-75.
54. Buğan B, Çelik T. Risk Factors for Coronary Artery Disease. *J Clin Anal Med*. 2014; 5 (2): 159-63.
55. Weissberg PL. Atherogenesis: current understanding of the causes of atheroma. *Heart*. 2000; 83 (2): 247-52.
56. Mudau M, Genis A, Lochner A, Strijdom H. Endothelial dysfunction: the early predictor of atherosclerosis. *Cardiovascular journal of Africa*. 2012; 23 (4): 222-31.
57. Wilcox CS. Asymmetric dimethylarginine and reactive oxygen species: unwelcome twin visitors to the cardiovascular and kidney disease tables. *Hypertension*. 2012; 59 (2): 375-81.
58. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor

for endothelial dysfunction its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998; 98 (18): 1842-7.

59. Böger RH, Vallance P, Cooke JP. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a key regulator of nitric oxide synthase. *Atherosclerosis Supplements*. 2003; 4 (4): 1-3.

60. Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F, Ambrosio G, Cordiano C, Catapano A, Tramontana S, Perticone F, Naccarato P, Camici P. From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmunity reviews*. 2010; 9 (12): 830-4.

61. Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2013; 424: 245-52.

62. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediators of inflammation*. 2013; 2013: 152786.

63. Frohlich J, Al-Sarraf A. Cardiovascular risk and atherosclerosis prevention. *Cardiovascular Pathology*. 2013; 22 (1): 16-8.

64. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic research in cardiology*. 2008; 103 (5): 398-406.

65. Virani SS, Polsani VR, Nambi V. Novel markers of inflammation in atherosclerosis. *Current atherosclerosis reports*. 2008; 10 (2): 164-70.

66. Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2010; 74 (2): 213-20.

67. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutrition reviews*. 2007; 65 (12 Pt 2): S140-6.

68. Peluso I, Morabito G, Urban L, Ioannone F, Serafini M. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 2012; 12 (4): 351-60.

69. Falck-Hansen M, Kassiteridi C, Monaco C. Toll-like receptors in atherosclerosis. *International journal of molecular sciences*. 2013; 14 (7): 14008-23.

70. Wong BW, Meredith A, Lin D, McManus BM. The biological role of inflammation in atherosclerosis. *The Canadian journal of cardiology*. 2012; 28 (6): 631-41.

71. Doran AC, Meller N, McNamara CA. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008; 28 (5): 812-9.
72. Wang C, Zhang Y, Yang Q, Yang Y, Gu Y, Wang M, Wu K. A novel cultured tissue model of rat aorta: VSMC proliferation mechanism in relationship to atherosclerosis. *Experimental and molecular pathology*. 2007; 83 (3): 453-8.
73. Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, Li Z, Michel JB. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles. *Cardiovascular research*. 2012; 95 (2): 194-204.
74. Olofsson SO, Boren J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *Journal of internal medicine*. 2005; 258 (5): 395-410.
75. Khalil MF, Wagner WD, Goldberg IJ. Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004; 24 (12): 2211-8.
76. Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL. Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *The American journal of the medical sciences*. 2011; 342 (2): 135-42.
77. Camino-Lopez S, Llorente-Cortes V, Sendra J, Badimon L. Tissue factor induction by aggregated LDL depends on LDL receptor-related protein expression (LRP1) and Rho A translocation in human vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research*. 2007; 73 (1): 208-16.
78. Kolb S, Vranckx R, Huisse MG, Michel JB, Meilhac O. The phosphatidylserine receptor mediates phagocytosis by vascular smooth muscle cells. *The Journal of pathology*. 2007; 212 (3): 249-59.
79. Riviere C, Boudghene FP, Gazeau F, Roger J, Pons JN, Laissy JP, Allaire E, Michel JB, Letourneur D, Deux JF. Iron oxide nanoparticle-labeled rat smooth muscle cells: cardiac MR imaging for cell graft monitoring and quantitation. *Radiology*. 2005; 235 (3): 959-67.
80. Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis (Dallas, Tex)*. 1989; 9 (1 Suppl): I19-32.

81. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995; 92 (5): 1355-74.
82. Perrotta I. Ultrastructural features of human atherosclerosis. *Ultrastructural pathology*. 2013; 37 (1): 43-51.
83. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106 (25): 3143-421.
84. Law MR, Wald NJ, Thompson SG. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischaemic heart disease? *BMJ (Clinical research ed)*. 1994; 308 (6925): 367-72.
85. Goldstein JL, Kita T, Brown MS. Defective lipoprotein receptors and atherosclerosis. Lessons from an animal counterpart of familial hypercholesterolemia. *The New England journal of medicine*. 1983; 309 (5): 288-96.
86. Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science (New York, NY)*. 1986; 232 (4746): 34-47.
87. Wong ND, Wilson PW, Kannel WB. Serum cholesterol as a prognostic factor after myocardial infarction: the Framingham Study. *Annals of internal medicine*. 1991; 115 (9): 687-93.
88. Anderson KM, Castelli WP, Levy D. Cholesterol and mortality. 30 years of follow-up from the Framingham study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1987; 257 (16): 2176-80.
89. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Knoke JD, Jacobs DR, Jr., Bangdiwala S, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989; 79 (1): 8-15.
90. Stone NJ. Secondary causes of hyperlipidemia. *The Medical clinics of North America*. 1994; 78 (1): 117-41.

91. Chait A, Brunzell JD. Acquired hyperlipidemia (secondary dyslipoproteinemias). *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. 1990; 19 (2): 259-78.
92. Krauss RM. Regulation of high density lipoprotein levels. *The Medical clinics of North America*. 1982; 66 (2): 403-30.
93. Austin MA, Hokanson JE, Edwards KL. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *The American journal of cardiology*. 1998; 81 (4A): 7B-12B.
94. Assmann G, Schulte H, Funke H, von Eckardstein A. The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease. *European heart journal*. 1998; 19 Suppl M: M8-14.
95. Reaven GM. Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: role in hypertension, dyslipidemia, and coronary heart disease. *American heart journal*. 1991; 121 (4 Pt 2): 1283-8.
96. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012): the Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of nine societies and by invited experts). *European journal of preventive cardiology*. 2012; 19 (4): 585-667.
97. Jee SH, Suh I, Kim IS, Appel LJ. Smoking and atherosclerotic cardiovascular disease in men with low levels of serum cholesterol: the Korea Medical Insurance Corporation Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1999; 282 (22): 2149-55.
98. Beckman JA, Paneni F, Cosentino F, Creager MA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part II. *European heart journal*. 2013; 34 (31): 2444-52.
99. Eckel RH, York DA, Rossner S, Hubbard V, Caterson I, St Jeor ST, Hayman LL, Mullis RM, Blair SN. Prevention Conference VII: Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: executive summary. *Circulation*. 2004; 110 (18): 2968-75.

100. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW, Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *The New England journal of medicine*. 1999; 341 (15): 1097-105.
101. Wolk R, Berger P, Lennon RJ, Brilakis ES, Davison DE, Somers VK. Association between plasma adiponectin levels and unstable coronary syndromes. *European heart journal*. 2007; 28 (3): 292-8.
102. Tirosh A, Shai I, Afek A, Dubnov-Raz G, Ayalon N, Gordon B, Derazne E, Tzur D, Shamis A, Vinker S, Rudich A. Adolescent BMI trajectory and risk of diabetes versus coronary disease. *The New England journal of medicine*. 2011; 364 (14): 1315-25.
103. Eckel RH, Krauss RM. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *AHA Nutrition Committee. Circulation*. 1998; 97 (21): 2099-100.
104. Savji N, Rockman CB, Skolnick AH, Guo Y, Adelman MA, Riles T, Berger JS. Association between advanced age and vascular disease in different arterial territories: a population database of over 3.6 million subjects. *Journal of the American College of Cardiology*. 2013; 61 (16): 1736-43.
105. Assmann G, Schulte H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). *Prospective Cardiovascular Munster study. The American journal of cardiology*. 1992; 70 (7): 733-7.
106. Onat A, Sansoy V, Soydan İ, Tokgözoğlu L, Adalet K. TEKHARF; Oniki Yıllık İzleme Deneyimine Göre Türk Erişkinlerinde Kalp Sağlığı. İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret Anonim Şirketi, 2003.
107. Prasad K. Homocysteine, a Risk Factor for Cardiovascular Disease. *The International journal of angiology : official publication of the International College of Angiology, Inc*. 1999; 8 (1): 76-86.
108. Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW. Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation*. 2001; 103 (22): 2717-23.

109. Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1997; 17 (10): 2074-81.
110. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nature medicine*. 1996; 2 (4): 386-9.
111. Al-Obaidi MK, Philippou H, Stubbs PJ, Adami A, Amersey R, Noble MM, Lane DA. Relationships between homocysteine, factor VIIa, and thrombin generation in acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000; 101 (4): 372-7.
112. Mansoor MA, Bergmark C, Svardal AM, Lonning PE, Ueland PM. Redox status and protein binding of plasma homocysteine and other aminothiols in patients with early-onset peripheral vascular disease. *Homocysteine and peripheral vascular disease. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1995; 15 (2): 232-40.
113. Starkebaum G, Harlan JM. Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine. *The Journal of clinical investigation*. 1986; 77 (4): 1370-6.
114. Stamler JS, Osborne JA, Jaraki O, Rabbani LE, Mullins M, Singel D, Loscalzo J. Adverse vascular effects of homocysteine are modulated by endothelium-derived relaxing factor and related oxides of nitrogen. *The Journal of clinical investigation*. 1993; 91 (1): 308-18.
115. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH, Kimoto M, Balint RF, Cooke JP. Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2001; 104 (21): 2569-75.
116. Olszewski AJ, Szostak WB, Bialkowska M, Rudnicki S, McCully KS. Reduction of plasma lipid and homocysteine levels by pyridoxine, folate, cobalamin, choline, riboflavin, and troxerutin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 1989; 75 (1): 1-6.
117. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 1997; 337 (4): 230-6.
118. Salazar J, Martinez MS, Chavez M, Toledo A, Anez R, Torres Y, Apruzzese V, Silva C, Rojas J, Bermudez V. C-Reactive Protein: Clinical and Epidemiological Perspectives. *Cardiology research and practice*. 2014; 2014: 605810.

119. Tillett WS, Francis T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *The Journal of experimental medicine*. 1930; 52 (4): 561-71.
120. Zimmermann O, Li K, Zaczekiewicz M, Graf M, Liu Z, Torzewski J. C-Reactive Protein in Human Atherogenesis: Facts and Fiction. *Mediators of inflammation*. 2014; 2014: 561428.
121. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *The New England journal of medicine*. 2002; 347 (20): 1557-65.
122. Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *The New England journal of medicine*. 2000; 342 (12): 836-43.
123. Ridker PM, Stampfer MJ, Rifai N. Novel risk factors for systemic atherosclerosis: a comparison of C-reactive protein, fibrinogen, homocysteine, lipoprotein(a), and standard cholesterol screening as predictors of peripheral arterial disease. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2001; 285 (19): 2481-5.
124. Ridker PM. High-sensitivity C-reactive protein: potential adjunct for global risk assessment in the primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*. 2001; 103 (13): 1813-8.
125. Devaraj S, Singh U, Jialal I. The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. *Clinical chemistry*. 2009; 55 (2): 229-38.
126. Sözmen EY. Yaşlanma Biyokimyası. Editörler: Onat T, Emerk K, Sözmen EY. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 743-58.
127. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press, 1999.
128. Singh R, Devi S, Gollen R. Role of free radical in atherosclerosis, diabetes and dyslipidemia: larger-than-life. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2014.
129. Akpoyraz M, Durak İ. Serbest radikallerin biyolojik etkileri. *Ankara Tıp Mecmuası*. 1995; 48: 253-62.

130. Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: beyond correlation. *Aging cell*. 2002; 1 (2): 117-23.
131. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *The American journal of medicine*. 2000; 108 (8): 652-9.
132. Davies MJ. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003; 305 (3): 761-70.
133. Jomova K, Valko M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*. 2011; 283 (2-3): 65-87.
134. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri*. Çeviri Editörü: Elçin YM. Ankara: Palme Yayıncılık, 2013.
135. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. *Harper's Illustrated Biochemistry*. New York: McGraw-Hill, 2009.
136. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif). 2002; 18 (10): 872-9.
137. Ochoa L, Waypa G, Mahoney JR, Jr., Rodriguez L, Minnear FL. Contrasting effects of hypochlorous acid and hydrogen peroxide on endothelial permeability: prevention with cAMP drugs. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997; 156 (4 Pt 1): 1247-55.
138. Sies H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. *The Journal of biological chemistry*. 2014; 289 (13): 8735-41.
139. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1998; 75 (2): 199-212.
140. Edwards AD. The pharmacology of inhaled nitric oxide. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition*. 1995; 72 (2): F127-30.
141. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980; 288 (5789): 373-6.
142. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987; 327 (6122): 524-6.

143. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988; 333 (6174): 664-6.
144. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British journal of pharmacology*. 2006; 147 Suppl 1: S193-201.
145. Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik Oksit ve Akciğerler. *Türk Toraks Dergisi*. 2003; 4 (1): 88-94.
146. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *The New England journal of medicine*. 1993; 329 (27): 2002-12.
147. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2007; 39 (1): 44-84.
148. Strijdom H, Chamane N, Lochner A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovascular journal of Africa*. 2009; 20 (5): 303-10.
149. Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, Robertson FM, Allen EM, Doorn JA, Slikker W. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*. 2009; 112 (1): 4-16.
150. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *The American journal of physiology*. 1996; 271 (5 Pt 1): 1424-37.
151. Smith C, Marks AD, Lieberman M. Marks' basic medical biochemistry: a clinical approach. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
152. Sugamura K, Keaney JF, Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free radical biology & medicine*. 2011; 51 (5): 978-92.
153. Borges F, Fernandes E, Roleira F. Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Current medicinal chemistry*. 2002; 9 (2): 195-217.
154. Linder N, Rapola J, Raivio KO. Cellular expression of xanthine oxidoreductase protein in normal human tissues. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1999; 79 (8): 967-74.
155. Vorbach C, Scriven A, Capecchi MR. The housekeeping gene xanthine oxidoreductase is necessary for milk fat droplet enveloping and secretion: gene

- sharing in the lactating mammary gland. *Genes & development*. 2002; 16 (24): 3223-35.
156. Nagababu E, Lakshmaiah N. Inhibition of xanthine oxidase-xanthine-iron mediated lipid peroxidation by eugenol in liposomes. *Molecular and cellular biochemistry*. 1997; 166 (1-2): 65-71.
 157. Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Huh JI, Shim KH, Kim KW, Lee KH. Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age (Omaha)*. 1997; 20 (3): 127-40.
 158. Saksela M, Lapatto R, Raivio KO. Irreversible conversion of xanthine dehydrogenase into xanthine oxidase by a mitochondrial protease. *FEBS letters*. 1999; 443 (2): 117-20.
 159. Zimmet JM, Hare JM. Nitroso-redox interactions in the cardiovascular system. *Circulation*. 2006; 114 (14): 1531-44.
 160. Uysal M. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres. In: Gürdöl F, Ademoğlu E, editors. *Biyokimya*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2010: 647-52.
 161. Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science (New York, NY)*. 2001; 291 (5507): 1284-9.
 162. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 1999; 32 (8): 595-603.
 163. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways: is there a role for extracellular superoxide dismutase? *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002; 166 (12 Pt 2): S38-43.
 164. Bag A, Bag N. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2008; 17 (12): 3298-305.
 165. Tamimi RM, Hankinson SE, Spiegelman D, Colditz GA, Hunter DJ. Manganese superoxide dismutase polymorphism, plasma antioxidants, cigarette smoking, and risk of breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2004; 13 (6): 989-96.

166. Wispe JR, Warner BB, Clark JC, Dey CR, Neuman J, Glasser SW, Crapo JD, Chang LY, Whitsett JA. Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *The Journal of biological chemistry*. 1992; 267 (33): 23937-41.
167. Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K, Marklund SL. 10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *The Journal of biological chemistry*. 1994; 269 (29): 19163-6.
168. Marklund S. Distribution of CuZn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum*. 1980; 492: 19-23.
169. Mullineaux PM, Creissen GP. Glutathione reductase: regulation and role in oxidative stress. *Cold Spring Harbor Monograph Archive*. 1997; 34: 667-713.
170. Aniya Y, Daido A. Activation of microsomal glutathione S-transferase in tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative stress of isolated rat liver. *Japanese journal of pharmacology*. 1994; 66 (1): 123-30.
171. Delcourt C, Carriere I, Delage M, Barberger-Gateau P, Schalch W. Plasma lutein and zeaxanthin and other carotenoids as modifiable risk factors for age-related maculopathy and cataract: the POLA Study. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2006; 47 (6): 2329-35.
172. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*. 1998; 56 (11): 317-33.
173. Randhir R, Lin YT, Shetty K. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprouts in response to peptide and phytochemical elicitors. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*. 2004; 13 (3): 295-307.
174. Harborne JB, Baxter H, Moss GP. *Phytochemical dictionary: Handbook of bioactive compounds from plants*. London: Taylor & Francis, 1999.
175. Harborne JB. *Methods in plant biochemistry, I: plant phenolics*. London: Academic Press, 1989.
176. King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*. 1999; 99 (2): 213-8.

177. Sandoval-Acuna C, Ferreira J, Speisky H. Polyphenols and mitochondria: An update on their increasingly emerging ROS-scavenging independent actions. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2014.
178. Shahidi F, Wanasundara PK. Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science and nutrition*. 1992; 32 (1): 67-103.
179. Grassi D, Desideri G, Tiberti S, Ferri C. Oxidative stress, endothelial dysfunction and prevention of cardiovascular diseases. *AgroFOOD Industry Li-tech*. 2009; 20: 76-9.
180. Grassi D, Desideri G, Croce G, Tiberti S, Aggio A, Ferri C. Flavonoids, vascular function and cardiovascular protection. *Current pharmaceutical design*. 2009; 15 (10): 1072-84.
181. Ferri C, Grassi D. Antioxidants and beneficial microvascular effects: is this the remedy? *Hypertension*. 2010; 55 (6): 1310-1.
182. Grassi D, Desideri G, Necozione S, Lippi C, Casale R, Properzi G, Blumberg JB, Ferri C. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *The Journal of nutrition*. 2008; 138 (9): 1671-6.
183. Gonzalez R, Ballester I, Lopez-Posadas R, Suarez MD, Zarzuelo A, Martinez-Augustin O, Sanchez de Medina F. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2011; 51 (4): 331-62.
184. Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1998; 854: 435-42.
185. Wiseman S, Mulder T, Rietveld A. Tea flavonoids: bioavailability in vivo and effects on cell signaling pathways in vitro. *Antioxidants & redox signaling*. 2001; 3 (6): 1009-21.
186. Heptinstall S, May J, Fox S, Kwik-Urbe C, Zhao L. Cocoa flavanols and platelet and leukocyte function: recent in vitro and ex vivo studies in healthy adults. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2006; 47 Suppl 2: S197-205; discussion S6-9.
187. Ostertag LM, O'Kennedy N, Kroon PA, Duthie GG, de Roos B. Impact of dietary polyphenols on human platelet function--a critical review of controlled

dietary intervention studies. *Molecular nutrition & food research*. 2010; 54 (1): 60-81.

188. Murphy KJ, Chronopoulos AK, Singh I, Francis MA, Moriarty H, Pike MJ, Turner AH, Mann NJ, Sinclair AJ. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *The American journal of clinical nutrition*. 2003; 77 (6): 1466-73.

189. Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American journal of clinical nutrition*. 2005; 81 (1 Suppl): 215S-7S.

190. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*. 2001; 54 (3): 176-86.

191. Anisimov VN, Popovich IG, Zabezhinski MA, Anisimov SV, Vesnushkin GM, Vinogradova IA. Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochimica et biophysica acta*. 2006; 1757 (5-6): 573-89.

192. Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N'-G-dimethyl-arginine, N-epsilon-mono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. *The Journal of biological chemistry*. 1970; 245 (21): 5751-8.

193. Cooke JP. Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation*. 2004; 109 (15): 1813-8.

194. Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, Sydow K, Albsmeier J, Cooke JP, Boger RH. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC*. 2004; 42 (12): 1377-83.

195. Vallance P, Leiper J. Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004; 24 (6): 1023-30.

196. McBride AE, Silver PA. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell*. 2001; 106 (1): 5-8.

197. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Purification and properties of a new enzyme, NG,NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase, from rat kidney. *The Journal of biological chemistry*. 1989; 264 (17): 10205-9.

198. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Annals of medicine*. 2006; 38 (2): 126-36.
199. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000; 20 (9): 2032-7.
200. Leiper JM, Santa Maria J, Chubb A, MacAllister RJ, Charles IG, Whitley GS, Vallance P. Identification of two human dimethylarginine dimethylaminohydrolases with distinct tissue distributions and homology with microbial arginine deiminases. *The Biochemical journal*. 1999; 343 Pt 1: 209-14.
201. Tran CT, Fox MF, Vallance P, Leiper JM. Chromosomal localization, gene structure, and expression pattern of DDAH1: comparison with DDAH2 and implications for evolutionary origins. *Genomics*. 2000; 68 (1): 101-5.
202. Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovascular research*. 1999; 43 (3): 542-8.
203. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 111 (8): 1201-9.
204. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circulation research*. 2000; 87 (2): 99-105.
205. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation*. 2002; 106 (8): 987-92.
206. Fard A, Tuck CH, Donis JA, Sciacca R, Di Tullio MR, Wu HD, Bryant TA, Chen NT, Torres-Tamayo M, Ramasamy R, Berglund L, Ginsberg HN, Homma S, Cannon PJ. Acute elevations of plasma asymmetric dimethylarginine and impaired endothelial function in response to a high-fat meal in patients with type 2 diabetes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000; 20 (9): 2039-44.
207. Eid HM, Arnesen H, Hjerkin EM, Lyberg T, Seljeflot I. Relationship between obesity, smoking, and the endogenous nitric oxide synthase inhibitor,

- asymmetric dimethylarginine. *Metabolism: clinical and experimental*. 2004; 53 (12): 1574-9.
208. Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T. Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*. 1999; 99 (9): 1141-6.
209. Lowry BJ, Whitesides RE, Dewey SA, Ransom CV, Banner RE. *Common Weeds of the Yard and Garden a guidebook*. Utah: Utah State University Extension Publications, 2011.
210. Baytop T. *Türkiye'de bitkilerle tedavi (Geçmişte ve bugün)*. İstanbul: İst Üniv Eczacılık Fakültesi., 1984.
211. Chiang LC, Chiang W, Chang MY, Ng LT, Lin CC. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds in vitro. *Antiviral research*. 2002; 55 (1): 53-62.
212. Jansson O. Phylloquinone (Vitamin K1) Levels in Leaves of Plant Species Differing in Susceptibility to 2, 4-Dichlorophenoxyacetic Acid. *Physiologia Plantarum*. 1974; 31 (4): 323-5.
213. Tutel B, Kandemir İ, Kuş S, Kence A. Classification of Turkish *Plantago* L. species using numerical taxonomy. *Turk J Bot*. 2005; 29: 51-61.
214. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2004; 26 (2): 211-9.
215. Oto G, Ekin S, Ozdemir H, Demir H, Yasar S, Levent A, Berber I, Kaki B. *Plantago major* protective effects on antioxidant status after administration of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in rats. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2011; 12 (2): 531-5.
216. Konstantinov IE, Jankovic GM, Alexander I. Ignatowski: a pioneer in the study of atherosclerosis. *Texas Heart Institute journal / from the Texas Heart Institute of St Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital*. 2013; 40 (3): 246-9.
217. Millon A, Canet-Soulas E, Boussel L, Fayad Z, Douek P. Animal models of atherosclerosis and magnetic resonance imaging for monitoring plaque progression. *Vascular*. 2014; 22 (3): 221-37.

218. Kapourchali FR, Surendiran G, Chen L, Uitz E, Bahadori B, Moghadasian MH. Animal models of atherosclerosis. *World journal of clinical cases*. 2014; 2 (5): 126-32.
219. Loeb WF, Quimby FW. *The clinical chemistry of laboratory animals*. Philadelphia: Taylor&Francis, 1999.
220. Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Laboratory animals*. 2004; 38 (3): 246-56.
221. Dornas WC, Oliveira TT, Augusto LE, Nagem TJ. Experimental atherosclerosis in rabbits. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2010; 95 (2): 272-8.
222. Yanni AE, Yatzidis HA, Kavantzias NG, Agapitos EV, Perrea DN, Karayannacos PE. Dietary L-aspartate and L-glutamate inhibit fatty streak initiation in cholesterol-fed rabbit. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2003; 13 (2): 80-6.
223. Boger RH, Bode-Boger SM, Kienke S, Stan AC, Nafe R, Frolich JC. Dietary L-arginine decreases myointimal cell proliferation and vascular monocyte accumulation in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 1998; 136 (1): 67-77.
224. Kolodgie FD, Katocs AS, Jr., Largis EE, Wrenn SM, Cornhill JF, Herderick EE, Lee SJ, Virmani R. Hypercholesterolemia in the rabbit induced by feeding graded amounts of low-level cholesterol. Methodological considerations regarding individual variability in response to dietary cholesterol and development of lesion type. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 1996; 16 (12): 1454-64.
225. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951; 193 (1): 265-75.
226. Dahle LK, Hill EG, Holman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1962; 98: 253-61.
227. Hashimoto S. A new spectrophotometric assay method of xanthine oxidase in crude tissue homogenate. *Analytical biochemistry*. 1974; 62 (2): 426-35.
228. Durak I, Canbolat O, Kavutcu M, Ozturk HS, Yurtarslani Z. Activities of total, cytoplasmic, and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *Journal of clinical laboratory analysis*. 1996; 10 (1): 17-20.

229. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*. 1988; 34 (3): 497-500.
230. Aebi H. Catalase. In: Bergmayer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analysis*. Newyork: Academic Press Inc, 1974: 673-7.
231. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967; 70 (1): 158-69.
232. Ridnour LA, Sim JE, Hayward MA, Wink DA, Martin SM, Buettner GR, Spitz DR. A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media. *Analytical biochemistry*. 2000; 281 (2): 223-9.
233. Durak I, Burak Cimen MY, Kacmaz M, Goren D, Serdar Ozturk H, Bolgen Cimen O. Aspirin induces erythrocyte nitric oxide synthase activity in vivo. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001; 314 (1-2): 265-7.
234. Tanzawa K, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Arai M, Watanabe H. WHHL-rabbit: a low density lipoprotein receptor-deficient animal model for familial hypercholesterolemia. *FEBS letters*. 1980; 118 (1): 81-4.
235. Gomez-Flores R, Calderon CL, Scheibel LW, Tamez-Guerra P, Rodriguez-Padilla C, Tamez-Guerra R, Weber RJ. Immunoenhancing properties of *Plantago major* leaf extract. *Phytotherapy research : PTR*. 2000; 14 (8): 617-22.
236. Çoban T, Çitoğlu GS, Sever B, Iscan M. Antioxidant activities of plants used in traditional medicine in Turkey. *Pharmaceutical biology*. 2003; 41 (8): 608-13.
237. Angelov A, Lambev I, Markov M, Yakimova K, Leseva M, Yakimov A. Study of acute and chronical toxicity of dispergue of *Plantago major*. *Medical Archives*. 1980; 18: 47-52.
238. Logarto Parra A, Silva Yhebra R, Guerra Sardinias I, Iglesias Buela L. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*. 2001; 8 (5): 395-400.
239. Turel I, Ozbek H, Erten R, Oner AC, Cengiz N, Yilmaz O. Hepatoprotective and anti-inflammatory activities of *Plantago major* L. *Indian journal of pharmacology*. 2009; 41 (3): 120-4.

240. Guillén MEN, Emim JADS, Souccar C, Lapa AJ. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of the Aqueous Extract of *Plantago major* L. *Pharmaceutical Biology*. 1997; 35 (2): 99-104.
241. Durak I, Ozturk HS, Olcay E, Can B, Kavutcu M. Effects of garlic extract on oxidant/antioxidant status and atherosclerotic plaque formation in rabbit aorta. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*. 2002; 12 (3): 141-7.
242. Yu Q, Li Y, Waqar AB, Wang Y, Huang B, Chen Y, Zhao S, Yang P, Fan J, Liu E. Temporal and quantitative analysis of atherosclerotic lesions in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012; 2012: 506159.

EKLER

EK 1: Etik Kurul Kararı



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/159-21003
KONU :

19./10./2012

Sayın

Prof.Dr.Hasan Serdar ÖZTÜRK
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Hasan Serdar ÖZTÜRK, Nurten TÜRKÖZKAN, Deniz BİLLUR ve Özkan ÖZER'den oluşan, G.Ü.ET-12.091 kod numaralı ve "*Plantago Major'un Hiperkolesterolemik Diyetle Ateroskleroz Oluşturulan Tavşanlarda Ateroskleroz ve Aterosklerotik Risk Faktörleri Üzerine Etkileri*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-12.091 and entitled "*The Effects of Plantago Major on Atherosclerosis and Atherosclerotic Risk Factors in Hypercholesterolemia-Induced Atherosclerotic Rabbits*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

EK : 1 Liste


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI
KARARLARI KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 17.10.2012		TOPLANTI SAYISI : 08	
ADI-SOYADI			
Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN		KATILDI	
Prof.Dr.Aydan BABÜL		KATILDI	
Prof.Dr.Nurten TÜRKÖZKAN		KATILDI (GÖRÜŞ BİLDİRMEDİ)	
Prof.Dr.M.Tahir HATİPOĞLU		KATILDI	
Prof.Dr.Mustafa ARK		KATILDI	
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER		KATILDI	
Uzman Dr.Şeyda DİKER		KATILDI	
Arş.Gör. Esra PER		KATILDI	
Dr.Kadir BAŞAR		KATILAMADI	
İlknur ALKAN		KATILAMADI	

Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı