

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Biyokimya Anabilim Dalı

HİPERKOLESTEROLEMİK RATLARDA RESVERATROLÜN TROMBOSİT AKTİVASYONUNA ETKİSİ

Ayşe Yeşim GÖÇMEN

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ

Bu çalışma Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir
(Proje no: 2005.03.0122.008)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

Antalya, 2008

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

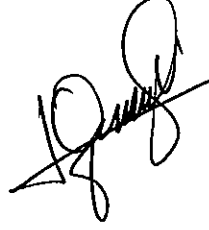
Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için doktora bilim alanında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayınların listesi aşağıdadır (Orjinalleri ekte sunulmuştur).

1. Gocmen AY, Sahin E, Kocak H, Tuncer M, Gumuslu S. Levels of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide and lipid peroxidation markers in patients with end-stage renal disease having peritoneal dialysis treatment. Clin Biochem 2008;41(10-11):836-40.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.02.07.2008

Tez Danışmanı : Prof.Dr.Saadet GÜMÜŞLÜ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye: Prof.Dr.Tomris ÖZBEN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye: Prof.Dr.Eser YILDIRIM SÖZMEN
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Üye: Prof.Dr.Gülay ÖZBİLİM
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Patoloji Anabilim Dalı



Üye: Yrd.Doç.Dr.Abdullah ERDOĞAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../.....tarih ve/.....sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Nurettin OĞUZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada, hiperkolesterolemi oluşturulan sıçanlarda resveratrolün trombosit aktivasyonunu, karaciğer oksidan ve antioksidan sistemini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Sıçanlar 5 gruba ayrılmıştır: (1) kontrol (K), (2) alkol (A), (3) resveratrol (R), (4) kolesterol (Kol) ve (5) kolesterol + resveratrol (Kol+R). Kontrol, A ve R grubunda bulunan sıçanlar 8 hafta boyunca standart yem ile beslenmiştir. Sekiz haftanın sonunda, A grubuna intraperitoneal (ip) olarak 20 gün süreyle %50'lik etanol, R grubuna ise 20 gün süreyle ip resveratrol (20 mg/kg/vücut ağırlığı) verilmiştir. Kolesterol ve Kol+R grupları 8 hafta süreyle %5 kolesterol içeren yemle beslenmiştir. Sekiz hafta sonunda Kol+R grubuna 20 gün süreyle ip resveratrol (20 mg/kg/vücut ağırlığı) verilmiştir. Total kolesterol (TK) düzeyleri kontrollere kıyasla deney gruplarında daha yüksek bulunmuştur. Kolesterol grubuna kıyasla Kol+R grubunun TK düzeyleri daha düşük bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla, A ve Kol grubunda CD40-CD40L ve P selektin ekspresyonunun arttığı, R grubunda azaldığı görülmüştür. Kol+R grubunda CD40-CD40L ve P selektin ekspresyonunun Kol grubuna göre azaldığı bulunmuştur. Plazmada bakılan parametrelerden sCD40, interlökin-6 ve platelet faktör-4 düzeyleri, K, A ve R gruplarına kıyasla, Kol ve Kol+R gruplarında daha yüksek bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla, tüm deney gruplarında serum lipid peroksidasyon markırları olan tiyobarbitürik asit reaktif bileşikler (TBARS) ve okside LDL düzeyleri artarken paraoksonaz-1 aktivitesi azalmıştır. Lizofosfatidik asit, hidrojen peroksit ve nitrotirozin düzeyleri hem Kol hem de Kol+R gruplarında kontrollere göre artarken, NT ve LPA düzeyleri Kol grubuna göre Kol+R grubunda daha düşük bulunmuştur. Karaciğer homojenatlarında, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), glutasyon redüktaz (GR) ve glutasyon-S-transferaz (GST) aktiviteleri ve protein karbonil (PK), nitrit (NO₂), nitrat (NO₃), NT, TBARS, redükte glutasyon (GSH) ve okside glutasyon (GSSG) düzeyleri Kol grubunda kontrole göre artmıştır. Kolesterol ve Kol+R gruplarının karaciğer oksidan ve antioksidan durumlarını kıyasladığımızda, Kol+R grubunda G6PD, süperoksit dismutaz, GR ve GST aktivitelerinin Kol grubuna göre azaldığını, katalaz ve glutasyon peroksidaz aktivitelerinin Kol grubuna göre arttığını bulduk. Diğer yandan, Kol+R grubunda Kol grubuna göre daha düşük GSH, GSSG, NO₂, NT ve TBARS düzeyleri ve daha yüksek PK ve antioksidan potansiyel düzeyleri saptanmıştır. Patolojik inceleme sonucunda, Kol grubunun intima kalınlığında ve intima alanında kontrollere göre artış gözlenmiştir Bunun yanı sıra, resveratrol, hiperkolesterolemik ratların trombosit aktivasyonunu azaltırken kan kolesterol düzeyini de düşürmüştür. Bu bulgular ışığında, resveratrolün damarlardaki kalınlaşma ve yüzey alanını azaltıcı etkisinin, CD40-CD40L ekspresyonu etkileyerek trombosit aktivasyonunu azaltmasına ve karaciğer oksidan-antioksidan sisteminin antioksidanlar yararına etkilemesine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: Hiperkolesterolemi, resveratrol, trombosit aktivasyonu, CD40, CD40L, p-selektin, antioksidan kapasite, protein oksidasyonu, protein karbonil, nitrotirozin, nitrit, nitrat, antioksidan enzimler, paraoksonaz-1, glutasyon, lizofosfatidik asit, reaktif oksijen türleri, karaciğer, sıçan.

ABSTRACT

The present study was undertaken to determine the effects of resveratrol on platelet activation and on oxidant and antioxidant system in liver tissues of hypercholesterolemic rats. The rats were divided into 5 groups as following; (1) control (C), (2) alcohol (A), (3) resveratrol (R), (4) cholesterol (Chol) and (5) cholesterol + resveratrol (Chol+R). Control, A and R group rats were fed standard diet for 8 weeks. After 8 weeks, A group were given ip 50% ethanol and R group were treated with resveratrol (20 mg/kg bw/day) for 20 days. Cholesterol and Chol+R groups were given 5% cholesterol diet for 8 weeks and after 8 weeks Chol+R group was given ip resveratrol (20 mg/kg bw/day) for 20 days. The total cholesterol levels were found to be increased in all study groups when compared to controls and decreased in Chol+R group when compared to Chol group. Compared to control group, increased CD40-CD40L and P selectin expression in A and Chol groups and decreased CD40-CD40L and P selectin expression in R group was observed. We also found decreased CD40-CD40L and P selectin expression in Chol+R group compared to Chol group. In plasma, sCD40, interleukin-6 (IL-6) and platelet factor-4 (PF4) levels were found to be higher in Chol and Chol+R groups compared to C, A and R groups. Serum lipid peroxidation markers (thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and oxidized low density lipoprotein (oxLDL)) levels were found to be increased while paraoxonase-1 (PON1) activity is decreased in all the study groups compared to controls. Compared to control group, lysophosphatidic acid (LPA), hydrogen peroxide (H₂O₂) and nitrotyrosine (NT) levels were increased in Chol and Chol+R groups while NT and LPA levels were decreased in Chol+R group, compared to Chol groups. In liver homogenates, the activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), glutathione reductase (GR) and glutathione-S-transferase (GST) and the levels of reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), protein carbonyl (PC), nitrite (NO₂), nitrate (NO₃), NT and TBARS were increased in Chol group when compared to control group. When we compared the liver oxidant and anti oxidant status of Chol+R group with Chol group, we found that Chol+R animals had decreased G6PD, superoxide dismutase (SOD), GR and GST activities and increased catalase and GSH-Px, activities than the Chol animals. On the other hand, Chol+R group had decreased GSH, GSSG, NO₂, NT and TBARS levels and increased PC and antioxidant levels than the Chol group. The pathological analysis revealed that Chol group animals demonstrated increased intimal width and area than the control group. We conclude that resveratrol might be reducing intimal width and area via effecting decreasing platelet activation through CD40-CD40L pathway and effecting the oxidant and antioxidant system in favor of the antioxidants.

Key words: Hypercholesterolemia, resveratrol, platelet activation, CD40, CD40L, p-selectin, antioxidant potential, protein oxidation, protein carbonyls, nitrotyrosine, nitrite, nitrate, antioxidant enzymes, paraoxonase-1, glutathione, lysophosphatidic acid, reactive oxygen species, liver, rat.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde değerli yardımlarını esirgemeyen Proje yürütücüsü ve Akademik danışmanım Sayın Prof. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ'ye, hayvanların bakımı ve kesimi sırasında yardımlarından dolayı Deney Hayvanları Ünite'si çalışanlarına, damar dokularının incelenmesinde yardımcı olan Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gülay ÖZBİLİM'e, Uzm. Dr. A. Güzide GÖKHAN'a ve teknisyenlerine, trombosit aktivasyonu ölçümlerindeki yardımlarından dolayı Akış Sitometri Ünitesi çalışanlarına teşekkür ederim.

Doktora Öğrencisi
Ayşe Yeşim GÖÇMEN

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA</u>
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
TABLolar DİZİNİ	XVI
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Atheroskleroz	3
2.1.1. Arterlerin yapısı	3
2.1.2. Ateroskleroz Patogenezi	4
2.1.3. Aterogenezde Rol Alan Hücreler	6
2.2. Trombositler	6
2.2.1. Trombosit Üretimi	8
2.2.2. Trombosit Üretimi'nin Düzenlenmesi	9
2.2.3. Trombosit Aktivasyonu	9
2.2.4. Trombosit Agregasyonunun Moleküler Temelleri	11
2.2.5. Aterosklerozda Trombositlerin Rolü ve Aktivasyonu	12
2.3. CD40 Sinyalizasyon Yolağı	12
2.3.1. CD40	12
2.4. Plazmada Ölçülen Trombosit Aktivasyon Markırları	15
2.4.1. P-selektin	15
2.4.2. İnterlökin-6 (IL-6)	15
2.4.3. Platelet faktör 4(PF4)	15
2.5. Kolesterol	15
2.5.1. Kolesterol Metabolizmasında Karaciğerin Rolü	16
2.5.2. Kolesterol Biyosentezi	16
2.5.3. Kolesterol Sentezinin Kontrolü	17
2.5.3.1. Feed Back İnhibisyon	17
2.5.4. Kolesterol Transportu	18
2.5.5. Kolesterol Yıkımı	18
2.5.6. Karaciğer Dışı Dokularda Regülasyon	19
2.5.7. Kolesterolün Trombosit Aktivasyonuna Etkisi	19
2.6. Lipoproteinler	19
2.6.1. Lipoproteinlerin Taşınması ve Metabolizması	21
2.6.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein (VLDL)	22
2.6.3. Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)	22
2.6.1. LDL' nin Oksidasyon Mekanizması (oksLDL)	23
2.6.2. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)	24

2.7.	Lizofosfatidik asit (LPA)	25
2.7.1.	Lizofosfatidik Asit Biyokimyası	25
2.7.2.	Lizofosfatidik Asit Üretimi, Salınımı Ve Yıkımı	26
2.7.1.	Lizofosfatidik Asitin Biyolojik Cevapları	28
2.7.2.	Kardiyovasküler Sistemde Lizofosfatidik Asit	28
2.7.3.	Lizofosfatidik Asitin Yapı-Aktivite İlişkisi	28
2.7.4.	Lizofosfatidik Asit'in Trombosit Aktivasyonuna Etkisi	29
2.8.	Protein Oksidasyonu	29
2.8.1.	Protein Oksidasyonunun Tarihçesi	29
2.8.1.	Protein Oksidasyonu ve Ürünleri	29
2.8.2.	Protein Oksidasyonunun Mekanizmaları	30
2.8.3.1.	Protein Karbonil Bileşikleri (Karbonil stres)	31
2.8.3.2.	Nitrotirozin (NT) Oluşumu	31
2.8.3.3.	Protein Hidroperoksit'lerinin Oluşumu	32
2.8.3.4.	Aminoasit Oksidasyon Ürünleri	32
2.9.	Lipid Peroksidasyonu Ürünleri	33
2.9.1.	Lipid peroksidasyonu	33
2.9.1.	Malondialdehit (MDA)	34
2.10.	Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Antioksidan Savunma Mekanizmaları	35
2.10.1.	Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri	35
2.10.2.	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz	35
2.10.3.	Süperoksit Dismutaz (SOD)	37
2.10.3.1.	Bakır ve Çinko İçeren Dismutaz(Cu, Zn-SOD)	37
2.10.4.	Katalaz (CAT)	38
2.10.5.	Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	39
2.10.6.	Glutasyon Redüktaz (GR)	40
2.10.7.	Glutasyon-S-Transferaz	40
2.10.8.	Paraoksonaz-1 (PON1)	41
2.10.9.	Lipid Peroksidasyon Zincir Reaksiyonlarını Kıran Antioksidanlar	42
2.10.10.	Tiyoller	42
2.10.11.	Redükte Glutasyon (GSH)	42
2.11.	Resveratrol	43

MATERYALLER VE YÖNTEMLER

3.1.	Materyaller	47
3.1.1.	Deney Hayvanları	47
3.2.	Yöntemler	48
3.2.1.	Trombositlerde Ölçülen Parametreler	48
3.2.1.1.	CD41 Tayini	48
3.2.1.2.	CD40-CD40L Ekspresyonu	48
3.2.1.3.	Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Tayini	48
3.2.2.	Plazmada Ölçülen Parametreler	49

3.2.2.1.	sCD40 Tayini	49
3.2.2.2.	Interleukin-6 (IL-6) Tayini	51
3.2.2.3.	Platelet Faktör 4 (PF4) Tayini	53
3.2.3.	Serumda Ölçülen Parametreler	55
3.2.3.1.	Total Kolesterol (TK) Tayini	55
3.2.3.2.	Yüksek Dansiteli Lipoprotein-Kolesterol (HDL-K) Tayini	57
3.2.3.3.	Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (LDL-K) Tayini	58
3.2.3.4.	Okside LDL (oxLDL) Tayini	60
3.2.3.5.	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikleri (TBARS) Tayini	62
3.2.3.6.	Paraoksonaz-1 (PON-1) Aktivitesinin Tayini	63
3.2.3.7.	Lizofosfatidik asit (LPA) Tayini	65
3.2.3.8.	Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂) Tayini	66
3.2.3.9.	Nitrotirozin Tayini	68
3.2.4.	Karaciğer Dokusunda Ölçülen Parametreler	70
3.2.4.1.	Dokuların Hazırlanışı	70
3.2.4.2.	Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-PD) Aktivitesinin Tayini	70
3.2.4.3.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesinin Tayini	71
3.2.4.4.	Katalaz (KAT) Aktivitesinin Tayini	73
3.2.4.5.	Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Tayini	74
3.2.4.6.	Selenyum-Bağımlı Glutasyon Peroksidaz (Se-GSH-Px) Aktivitesinin Tayini	75
3.2.4.7.	Glutasyon-S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Tayini	77
3.2.4.8.	Redükte Glutasyon (GSH) Tayini	78
3.2.4.9.	Okside Glutasyon (GSSG) Tayini	80
3.2.4.10.	Protein Karbonil Grupları Tayini	82
3.2.4.11.	TBARS Tayini	83
3.2.4.12.	Antioksidan Potansiyel (AOP) Tayini	85
3.2.4.13.	Nitrit/Nitrat Tayini	86
3.2.4.14.	Nitrotirozin Tayini	89
3.2.4.15.	Protein Tayini	91
3.2.5.	Aortun Patolojik İncelenmesi	93
3.2.6.	Morfometrik Analiz	93
3.3.	İstatiksel Analizler	93
3.4.	Kullanılan Gereçler ve Kimyasal Maddeler	94
3.4.1.	Gereçler	94
3.4.2.	Kimyasal Maddeler	94

BULGULAR

4.1.	Genel Görünüm	95
4.2.	Günlük Yem Tüketimleri	95
4.3.	Günlük Su Tüketimleri	95

4.4.	Vücut Ağırlık Değişimleri	99
4.5.	Kontrol ve Deney Gruplarının Trombosit, CD40, CD40L, P-Selektin ve ROS Düzeyleri	101
4.5.1.	CD40 Düzeyleri	101
4.5.2.	CD40L Düzeyleri	101
4.5.3.	P-selektin Düzeyleri	101
4.5.4.	ROS Düzeyleri	101
4.6.	Kontrol ve Deney Gruplarının Plazma sCD40, IL-6 ve PF4 Düzeyleri	115
4.6.1.	sCD40 Düzeyleri	115
4.6.2.	IL-6 Düzeyleri	115
4.6.3.	PF4 Düzeyleri	115
4.7.	Kontrol ve Deney Gruplarının Serum PON1 Aktiviteleri, TK, HDL-K, LDL-K ve ox-LDL Düzeyleri	118
4.7.1.	Paraoksonaz-1 (PON1) Aktiviteleri	118
4.7.2.	Total Kolesterol (TK) Düzeyleri	118
4.7.3.	Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (HDL-K) Düzeyleri	118
4.7.4.	Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (LDL-K) Düzeyleri	118
4.7.5.	oxLDL Düzeyleri	118
4.7.6.	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) düzeyleri	119
4.7.8.	Nitrotirozin (NT) düzeyleri	119
4.7.9.	Lizofosfatidik asit (LPA) düzeyleri	119
4.7.10.	TBARS düzeyleri	119
4.8.	Kontrol ve Deney Gruplarında Serum H ₂ O ₂ , NT, LPA ve TBARS Düzeyleri	122
4.8.1.	Hidrojen Peroksit Düzeyleri	122
4.8.2.	Nitrotirozin Düzeyleri	122
4.8.3.	Lizofosfatidik Asit Düzeyleri	122
4.8.4.	Tiyobarbitürik Asit Düzeyleri	122
4.9.	Kontrol ve Deney Gruplarının Karaciğer Dokularında Ölçülen Antioksidan Enzim aktiviteleri, GSH, GSSG, ve TBARS Düzeyleri ve GSH/GSSG Oranları	126
4.9.1.	G-6-PD aktiviteleri	126
4.9.2.	Cu, Zn-SOD aktiviteleri	126
4.9.3.	CAT aktiviteleri	126
4.9.4.	GSH-Px aktiviteleri	126
4.9.5.	GR aktiviteleri	126
4.9.6.	GST aktiviteleri	127
4.9.7.	GSH düzeyleri	127
4.9.8.	GSSG düzeyleri	127
4.9.9.	GSH/GSSG oranları	127
4.10.	Kontrol ve Deney Gruplarının AOP, PK, NO ₂ , NO ₃ , NT ve TBARS düzeyleri	134
4.10.1.	Antioksidan Potansiyel (AOP) düzeyleri	134
4.10.2.	PK düzeyleri	134
4.10.3.	Nitrit (NO ₂) düzeyleri	134
4.10.4.	Nitrat (NO ₃) düzeyleri	134
4.10.5.	Nitrotirozin (NT) düzeyleri	134

4.10.6. TBARS düzeyleri	134
4.11. Kontrol ve Deneş Grularının İnternal Elastik Lamina Çevresi(IELC), İntimal Alan(IA), İntimal Genişlik(IG), Medial Alan(MA), Medial Genişlik(MG), Lümen+İntimal Çap(DLI), Maksimal İntimal Kalınlık/Medial Kalınlık(IMR), İntimal Alan/Medial Alan(İTI) ve Lümen Daralması(%LD) Değerleri	139
4.11.1. İnternal Elastik Lamina Çevresi(IELC)	139
4.11.2. İntimal Alan(IA)	139
4.11.3. İntimal Genişlik(IG)	139
4.11.4. Medial Alan(MA)	139
4.11.5. Medial Genişlik(MG)	139
4.11.6. Lümen+İntimal Çap(DLI)	140
4.11.7. Maksimal İntimal Kalınlık/Medial Kalınlık(IMR)	140
4.11.8. İntimal Alan/Medial Alan(İTI)	140
4.11.9. Lümen Daralması(%LD)	140
4.12. Korelasyon Analizleri Sonuçları	149
TARTIŞMA	151
SONUÇLAR	162
KAYNAKLAR	166
ÖZGEÇMİŞ	193
EKLER	
EK 1	Yayınlanmış birinci isim makale

SİMGELER VE KISALTMALAR

CAT:	Katalaz
CRH:	Kortikotropin salgılatıcı hormon
GR:	Glutasyon Redüktaz
GSH:	Redükte Glutasyon
GSH-Px:	Glutasyon Peroksidaz
GSSG:	Okside Glutasyon
G-6-PD:	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
G-6-P:	Glukoz-6-fosfat
G-S-T:	Glutasyon-S-Transferaz
HSP:	Sıcaklık stresi proteini(Heat Stress Protein)
HSF:	Sıcaklık şoku transkripsiyon faktörü (Heat shock trancription factor)
HMP:	Heksoz monofosfat
HO :	Hidroksil radikali
HO ⁻ :	Hidroksil anyonu
HOO [·] :	Hidroperoksil (perhidroksil) radikali
JNK:	c-Jun-N-terminal kinaz
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
LOOH:	Lipid hidroperoksit
MDA:	Malondialdehit
mitDNA:	Mitokondriyal DNA
NAD ⁺ :	Nikotinamid adenin dinükleotid (okside formu)
NADH:	Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte formu)
NADP ⁺ :	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (okside formu)
NADPH:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (redükte formu)
NO :	Nitrikoksit
O ₂ :	Temel haldeki triplet oksijen
¹ O ₂ :	Singlet oksijen
O ₂ ⁻ :	Süperokist anyon radikali
O ₃ :	Ozon
PUFA:	Çoklu doymamış yağ asitleri
ROS:	Reaktif oksijen türleri
R [·] :	Thil radikali
PKC:	Protein kinaz C
SOD:	Süperoksit dismutaz
TBA:	2-Tiyobarbitürik asit
TBARS:	Tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddeler
AMI	Akut Miyokart İnfarktüsü
HB-GF	Heparin-Binding Epidermal Growth Factor
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HMG-KoA	3-hidroksi-3 metilglutaril KoA
ICAM-1	Hücreler Arası Adezyon Molekülü-1
IDL	Ara Dansiteli Lipoprotein

IFN- γ	İnterferon- γ
IL-6	İnterlokkin-6
IL-1 β	İnterlökkin-1 β
K	Kolesterol
KAH	Koroner Arter Hastalığı
KD	Konjuge Dien
KKH	Koroner Kalp Hastalığı
L55M	55'inci aminoasit: lösin yerine metiyonin geçmiş
LCAT	Lesitin Kolesterol Açıl Transferaz
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LO \bullet	Alkoksil Radikali
LO $_2$	Lipid Peroksit Radikali
LOOL	Siklik Peroksit
M ϕ	Makrofajlar
MCP-1	Makrofaj Kemotaktik Proteini-1
M-CSF	Monosit Koloni Uyarıcı Faktör
MDA	Malondialdehit
MmLDL	Çok az Değiştirilmiş LDL
MMP	Metalloproteinaz
NO	Nitrik Oksit
Ox-LDL	LDL Oksidasyon Ürünleri,
PDGF	Büyüme Faktörü
PGI $_2$	Prostasiklin
PON	Paraoksonaz
Pre- β HDL	Fosfolipidce Zengin Prekürsör HDL
PYA	Poliansature Yag Asitleri
R192Q	192. aminoasit: arjinin yerine glutamin geçmiş
RF	Risk Faktörleri
RO \bullet	Alkoksil Radikali
ROO \bullet	Peroksil Radikali
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCP	Sitoplazmada Sterol Taşıyıcı Protein
SD	Standart Sapma
SEM	Standart Hata
SMC	Düz Kas Hücreleri,
TBARS	Tiyobarbiturik Asitle Reaksiyon Veren Maddeler
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TK	Total Kolesterol
TNF- α	Tümör Nekrozan Faktör- α
VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
\bar{X}	Ortalama
ϵ	Molar Ekstinksiyon Katsayısı
ΔA	Ortalama Absorbans
ΔOD	Ortalama Optik Dansite

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>		<u>SAYFA</u>
2.1.1.	Damar kesiti ve damar düz kasının damardaki yerleşimi	4
2.1.2.	Kalsifikasyonlu bir aterom	5
2.1.3.	Kan hücrelerinin oluşumu	7
2.3.1.	CD40'ın trombus oluşumundaki rolü	14
2.5.	Kolesterol ve kolesterol ester molekülünün kimyasal yapısı	16
2.6.	Lipoproteinlerin genel yapısı	20
2.6.3.	LDL' nin yapısı	23
2.6.5.	HDL' nin yapısı	25
2.7.1.	LPA kimyasal şekli	26
2.7.2.	LPA sentezi ve yıkımı için olası yollar	27
2.8.3.	Protein karbonil oluşumuna yol açan modifikasyon reaksiyonları	30
2.8.3.2.	NT oluşum reaksiyonu	32
2.10.	Antioksidan savunma mekanizmaları	35
2.10.7.	GST'nin detoksifikasyon işlemi	40
2.10.11.	Glutasyonun sentezi ve metabolizması	43
2.11.	Resveratrolün kimyasal yapısı	45
3.2.2.1.	sCD40 standart grafiği	51
3.2.2.2.	IL-6 standart grafiği	53
3.2.2.3.	PF4 standart grafiği	55
3.2.3.1.	TK standart grafiği	57
3.2.3.2.	HDL-K standart grafiği	58
3.2.3.3.	LDL-K standart grafiği	59
3.2.3.4.1.	oxLDL ölçüm prensibi	60
3.2.3.4.2.	oxLDL standart grafiği	61
3.2.3.5.	TBARS standart grafiği	63
3.2.3.7.1.	LPA enzimatik ölçüm prensibi	65
3.2.3.7.2.	LPA standart grafiği	66
3.2.3.8.	H ₂ O ₂ standart grafiği	67
3.2.3.9.1.	NT ölçümü	67
3.2.3.9.2.	NT standart grafiği	69
3.2.4.3.	SOD standart grafiği	72
3.2.4.8.1.	GSH ölçüm prensibi	78
3.2.4.8.2.	GSH standart grafiği	79
3.2.4.9.	GSSG standart grafiği	81
3.2.4.11.1.	TBARS reaksiyonu	83
3.2.4.11.2.	TBARS standart grafiği	84
3.2.4.12.	AOP standart grafiği	86
3.2.4.13.	Nitrat standart grafiği	88
3.2.4.14.1.	Nitrotirozin ölçüm prensibi	89
3.2.4.14.2.	Nitrotirozin standart grafiği	91
3.2.4.15.	Protein standart grafiği	93

4.2.1.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarının günlük yem tüketimleri	96
4.2.2.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarının günlük su tüketimleri	96
4.2.3.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ilaç öncesi ve sonrası günlük yem tüketimleri	97
4.3.1.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ilaç öncesi ve sonrası günlük su tüketimleri	98
4.4.1.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarının vücut ağırlıkları	100
4.5.1.1.	Kontrol grubundaki sıçana ait kan hücrelerinin FS-SS dağılımı	103
4.5.1.2.	Etanol grubundaki sıçana ait kan hücrelerinin FS-SS dağılımı	103
4.5.1.3.	Resveratrol grubundaki sıçana ait kan hücrelerinin FS-SS dağılımı	103
4.5.1.4.	Kolesterol grubundaki sıçana ait kan hücrelerinin FS-SS dağılımı	104
4.5.1.5.	Kol+R grubundaki sıçana ait kan hücrelerinin FS-SS dağılımı	104
4.5.1.6.	Kontrol ve deney gruplarının CD40 (%) düzeylerinin dağılımı	105
4.5.1.7.	Kontrol ve deney gruplarının CD40 (MFI) düzeylerinin dağılımı	105
4.5.1.8.	Kontrol grubu sıçan trombositlerindeki CD41-CD40 ekspresyonu	106
4.5.1.9.	Etanol grubu sıçan trombositlerindeki CD41-CD40 ekspresyonu	106
4.5.1.10.	Kolesterol grubu sıçan trombositlerindeki CD41-CD40 ekspresyonu	106
4.5.2.1.	Kontrol ve deney gruplarının CD40L (%) düzeylerinin dağılımı	107
4.5.2.2.	Kontrol ve deney gruplarının CD40L (MFI) düzeylerinin dağılımı	107
4.5.2.3.	Kontrol grubu sıçan trombositlerindeki CD40-CD40L ekspresyonu	108
4.5.2.4.	Etanol grubu sıçan trombositlerindeki CD40-CD40L ekspresyonu	108
4.5.2.5.	Resveratrol grubu sıçan trombositlerindeki CD40-CD40L ekspresyonu	109
4.5.2.6.	Kolesterol grubu sıçan trombositlerindeki CD40-CD40L ekspresyonu	109
4.5.2.7.	Kol+R grubu sıçan trombositlerindeki CD40-CD40L ekspresyonu	109
4.5.3.1.	Kontrol ve deney gruplarının P-selektin (%) düzeylerinin dağılımı.	110
4.5.3.2.	Kontrol ve deney gruplarının P-selektin (MFI) düzeylerinin dağılımı.	110
4.5.3.3.	Kontrol grubu sıçan trombositlerindeki	

	P-selektin ekspresyonu	111
4.5.3.4.	Etanol grubu sıçan trombositlerindeki P-selektin ekspresyonu	111
4.5.3.5.	Resveratrol grubu sıçan trombositlerindeki P-selektin ekspresyonu	111
4.5.3.6.	Kolesterol grubu sıçan trombositlerindeki P-selektin ekspresyonu	112
4.5.3.7.	Kol+Res grubu sıçan trombositlerindeki P-selektin ekspresyonu	112
4.5.4.1.	Kontrol ve deney gruplarının ROS düzeylerinin dağılımı.	112
4.5.4.2.	Kontrol grubu sıçan trombositlerindeki ROS düzeyi.	113
4.5.4.3.	Etanol grubu sıçan trombositlerindeki ROS düzeyi.	113
4.5.4.4.	Resveratrol grubu sıçan trombositlerindeki ROS düzeyi.	113
4.5.4.5.	Kolesterol grubu sıçan trombositlerindeki ROS düzeyi.	114
4.5.4.6.	Kol+Res grubu sıçan trombositlerindeki ROS düzeyi.	114
4.6.1.	Kontrol ve deney gruplarının sCD40 düzeyleri	117
4.6.2.	Kontrol ve deney gruplarının IL-6 düzeyleri	117
4.6.3.	Kontrol ve deney gruplarının PF4 düzeyleri	117
4.7.1.	Kontrol ve deney gruplarının serum PON1 aktiviteleri	120
4.7.2.	Kontrol ve deney gruplarının serum TK düzeyleri	120
4.7.3.	Kontrol ve deney gruplarının serum HDL-K düzeyleri	121
4.7.4.	Kontrol ve deney gruplarının serum LDL-K düzeyleri	121
4.7.5.	Kontrol ve deney gruplarının serum oxLDL düzeyleri	121
4.7.6.	Kontrol ve Deney gruplarının serum H ₂ O ₂ düzeyleri	124
4.7.7.	Kontrol ve Deney gruplarının serum NT düzeyleri	124
4.7.8.	Kontrol ve Deney gruplarının serum LPA düzeyleri	125
4.7.9.	Kontrol ve Deney gruplarının serum TBARS düzeyleri	125
4.9.1	Kontrol ve deney gruplarının G-6-PD aktivitelerinin dağılımı.	129
4.9.2	Kontrol ve deney gruplarının Cu, Zn-SOD aktivitelerinin dağılımı	130

4.9.3	Kontrol ve deney gruplarının CAT aktivitelerinin dağılımı.	130
4.9.4	Kontrol ve deney gruplarının GSH-Px aktivitelerinin dağılımı	131
4.9.5	Kontrol ve deney gruplarının GR aktivitelerinin dağılımı	131
4.9.6	Kontrol ve deney gruplarının GST aktivitelerinin düzeyleri	132
4.9.7	Kontrol ve deney gruplarının GSH düzeyleri	132
4.9.8	Kontrol ve deney gruplarının GSSG düzeyleri	133
4.9.9	Kontrol ve deney gruplarının GSH/GSSG oranları	133
4.10.1	Kontrol ve deney gruplarının AOP düzeyleri	136
4.10.2	Kontrol ve deney gruplarının PK düzeyleri	136
4.10.3	Kontrol ve deney gruplarının NO ₂ düzeyleri	137
4.10.4	Kontrol ve deney gruplarının NO ₃ düzeyleri	137
4.10.5	Kontrol ve deney gruplarının NO ₂ +NO ₃ düzeyleri	137
4.10.6	Kontrol ve deney gruplarının NT düzeyleri	138
4.10.7	Kontrol ve deney gruplarının TBARS düzeyleri	138
4.11.1.	Kontrol ve deney gruplarının internal elastik lamina çevresi(IELC)	142
4.11.2.	Kontrol ve deney gruplarının intimal alanları(IA)	142
4.11.3.	Kontrol ve deney gruplarının intimal genişlikleri(IG)	143
4.11.4.	Kontrol ve deney gruplarının medial alanları(MA)	143
4.11.5.	Kontrol ve deney gruplarının medial genişlikleri(MG)	144
4.11.6.	Kontrol ve deney gruplarının lümen+intima çapları(DLI)	144
4.11.7.	Kontrol ve deney gruplarının maksimal intimal kalınlık/ medyal kalınlıkları (IMR)	145
4.11.8.	Kontrol ve deney gruplarının intimal alan/medial alan	145
4.11.9.	Kontrol ve deney gruplarının yüzde lümen daralması (%LD)	145
4.11.10.	Kontrol grubu sıçan aortu H-E boyası ile gösterimi	147
4.11.11.	Etanol grubu Sıçan Aortunda Tip1 Ateroskleroz	

	Oluşumunun H-E Boyası ile gösterimi	147
4.11.12.	Resveratrol Grubu Sıçan Aortunun H-E Boyası ile Gösterimi	148
4.11.13.	Kolesterol Grubu Sıçan Aortunda Tip2 Ateroskleroz Oluşumunun H-E Boyası ile Gösterimi	148
4.11.14.	Kol+Res Grubu Sıçan Aortunda Tip1 Ateroskleroz Oluşumunun H-E Boyası ile Gösterimi	149

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>		<u>SAYFA</u>
2.2.1.	Trombosit agonist reseptörleri	10
2.3.1.	CD40 ve CD40L eksprese eden hücreler	13
2.5.1.	Lipoproteinlerin büyüklüklerine göre sınıflandırılması	19
2.8.1.	Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve oksidasyon ürünleri	32
4.2.1.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarının günlük yem tüketimleri.	96
4.2.2.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ilaç öncesi ve sonrası günlük yem tüketimleri.	97
4.3.1.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ilaç öncesi ve sonrası günlük su tüketimleri.	98
4.4.1.	Kontrol ve deney grubu hayvanların vücut ağırlıkları değişimleri.	99
4.5.1.	Kontrol ve deney grubu hayvanlarının trombosit CD40, CD40L, P-selektin, ve ROS düzeyleri	102
4.5.2.	Deney gruplarının trombosit CD40, CD40L ve p-selektin ekspresyonları ve ROS düzeylerinin kontrol değerlerine göre yüzde değişimleri.	103
4.6.1.	Kontrol ve deney grubu sıçanların plazma sCD40, IL-6 ve PF4 düzeyleri	116
4.6.2.	Deney gruplarının sCD40, IL-6 ve PF4 düzeylerinin kontrol değerlerine göre yüzde değişimleri.	116
4.7.1.	Kontrol ve Deney Gruplarının Serum PON1 Aktiviteleri, TK, HDL-K, LDL-K ve oxLDL düzeyleri	119
4.7.2.	Deney gruplarının serum PON1 Aktiviteleri, TK, HDL-K, LDL-K ve oxLDL düzeylerinin kontrol değerlerine göre yüzde değişimleri.	119
4.8.1.	Kontrol ve deney gruplarının serum H ₂ O ₂ , NT, LPA ve TBARS, düzeyleri	123
4.8.2.	Deney gruplarının serum H ₂ O ₂ , NT, LPA ve TBARS düzeylerinin kontrol değerlerine göre yüzde değişimleri.	123
4.9.1.	Kontrol ve deney gruplarının antioksidan enzim (G-6-PD, Cu,Zn-SOD, CAT, GSH-Px, GR ve GST) aktiviteleri, GSH ve GSSG düzeyleri ve GSH/GSSG oranları	128
4.9.2.	Deney gruplarının karaciğer dokusundaki antioksidan enzim (G-6-PD, SOD, KAT,	

GİRİŞ

Hiperkolesterolemi atherotrombotik bozukluklarda rol alan önemli bir risk faktörüdür. Hiperkolesterolemi, oksidatif ve nitrotirozid değişikliklere yol açarak mikrodolaşımdaki fenotipik değişimleri indükler. Vasküler bütünlüğün korunmasında trombositlerin rolü göz önünde bulundurulursa, hiperkolesterolemik şartlarda trombosit disfonksiyonu görülebilmektedir (1).

Trombosit disfonksiyonunun önemli bir markırı trombosit aktivasyonudur ve hiperkolesterolemi ile trombosit aktivasyonu arasında ilişki olduğu belirtilmiştir. Trombosit aktivasyonunu göstermek için çeşitli markırlar kullanılmıştır (1). Hiperkolesterolemili hastalarda β -trombomodulin, p-selektin, CD40, CD40L ve sCD40L gibi diğer trombosit aktivasyon markırlarının düzeylerinin arttığı belirtilmiştir (2).

CD40^{-/-} ve CD40L^{-/-} knock-out farelerde yapılan çalışmalarda, CD40 ve CD40L'in aterosklerotik plak oluşumunda ve trombosit aktivasyonundaki rolü belirtilmiştir (3). CD40 ligand (CD154, CD40L) trombositlerde bulunan ve aktivasyonla eksprese olan transmembran bir glikoproteindir (4). CD40, TNF gen ailesine üye fosforillenmiş bir membran glikoprotein reseptörüdür(5). Trombositlerde CD40 ve CD40L ekspresyonunun varlığı trombosit aktivasyon mekanizmalarından birini göstermektedir ve trombosit aktivasyon göstergesi olarak kullanılmaktadır (5).

CD40L'in CD40 reseptörüne bağlanması, enflamatuar sitokinlerin salınımına, adezyon molekülerinin ekspresyonuna, matriks metallopoteinaz aktivasyonuna ve doku faktörünün ekspresyonuna neden olur (6). Bunlara ek olarak, CD40-CD40L etkileşimi reaktif oksijen türlerinin (7) oluşumunu artırarak endotel hücre göçüne neden olur (4).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, trombositlerin inflamasyon ve vasküler hasarda rol aldığını göstermişlerdir. Uyarılan trombositler, CD40L ve interlökin-6 (8) gibi proinflammatuar sitokinler, platelet faktör 4 (PF4) gibi proinflammatuar kemokinleri salgılamaktadır ki tüm bu molekülerin hiperkolesteroleminin aracılık ettiği inflammatuar olaylarda rol almaktadırlar (9).

İnterlökin-6, aterosklerotik plaklarda bulunan aktif hale geçmiş monosit ve makrofajlardan salınarak proinflammatuar ve prokoagulan olaylarda rol alır (10). Platelet Faktör 4, 70 aminoasitlik 30.000 D molekül ağırlığında, anti heparin aktivitesine sahip bir proteindir. PF4, aktive olmuş trombositlerin α granüllerinden salınır ve trombosit proteoglikanları ile tetramerik bir kompleks oluşturur (11).

Hiperkolesterolemiye bağlı olarak serbest radikal üretimi ve süperoksit oluşumu artar. Süperoksit, bir çok hücrenel sistem tarafından sentezlenerek metabolizmadaki çeşitli reaksiyonlara girer ve hidrojen peoksit, peroksinitrit ve oksidasyona uğramış düşük dansiteli lipoprotein (oxLDL) gibi serbest radikallerin üretildiği reaksiyonlara katılır. Bu nedenle, vasküler yatakta oksidan-antioksidan dengeyi sağlamaya yönelik tedavilerin, hiperkolesteroleminin zararlı etkilerini kaldıracağı düşünölmektedir (1).

Sağlıklı kontrollere kıyasla kalıtsal hiperkolesterolemisi bulunan hastalarda trombositlerin agregasyona yatkınlığının arttığı belirtilmiştir (12). Bunlara ilaveten, trombositlerin LDL ile 5 dakika inkübasyonu sonucu, LDL dozuyla doğru orantılı olarak trombositlerin agregasyonunun arttığı gösterilmiştir (13). Bir başka çalışmada, oksidasyona uğramış düşük dansiteli lipoprotein (oxLDL) ile inkübe edilen trombositlerde şekil değişikliği ve yalancı ayak (pseudopod) oluşumu sonucu, trombositlerin endotel hücrelere adezyonunun arttığı gösterilmiştir (14). Siess ve arkadaşları (15) LDL oksidasyonu esnasında oluşan lizofosfatidik asitin (LPA) trombosit aktivasyonunu tetiklediğini ve kolesterol düşürücü bir ilaç olan lovastatinin LPA aracılıklı yolları etkileyerek, oxLDL'nin trombositleri aktive edici etkisini inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Karaciğer, kolesterol ve lipid metabolizması bozukluğuyla ilgili bir çok hastalıkta rol oynar (16). Yüksek kolesterollü diyetle beslenen rat modellerinde, karaciğerde çeşitli oksidatif stres markırı düzeylerinin arttığı ve antioksidan enzim aktivitelerinin değiştii gösterilmiştir (17). Farklı ilaçlar ve bitki ekstraktlarının karaciğer antioksidan enzimleri üzerine olan etkileri çeşitli makalelerde incelenmiş olsa da, resveratrolün hiperkolesterolemik ratlarda oksidan-antioksidan sistem üzerine etkisini inceleyen makale sayısı oldukça azdır.

Resveratrol (trans-3,5,4'-trihidroksistilben), doğal olarak üzümde ve farklı terapötik bitkilerde bulunan bir polifenoldür. Antioksidan ve östrojenik etkiye sahip antiagregan bir bileşiktir. Yüksek kolesterollü yemle beslenen sıçanlarda total kolesterol düzeyini düşürdüğü belirtilmiştir (18). Bunun yanısıra, resveratrolün trombosit aktivasyonunu azalttığı gösterilmiş olmakla birlikte, trombosit aktivasyon yollarından biri olan CD40 - CD40L üzerinden olan etkisi ve hiperkolesterolemide resveratrolün trombosit aktivasyonunu nasıl etkilediğı ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu yüzden, bu çalışmada hiperkolesterolemik ratlarda, resveratrolün trombosit aktivasyon markırları olan trombosit CD40, CD40L ve p-selektin ekspresyonuna, plazma IL-6 ve PF4 düzeylerine, serum lipidlerine, lipid peroksidasyon markırlarına ve karaciğer oksidan antioksidan sistemine etkilerini çalışmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Dünya sağlık örgütü (WHO) ateroskerozu ‘medial değişiklikler ile birlikte arterlerin intimasında lipidler, kompleks karbonhidratlar ve kan ürünü birikmesi, bağ dokusu reaksiyonu ile kalsiyum oturması’ olarak tanımlamıştır(19). Ateroskleroz, atardamarları (arterleri) etkileyen ve "damar sertleşmesi" olarak adlandırılan arteriosklerozun bir türüdür. Orta boy ve büyük arterlerde görülen "aterom" veya "plak" olarak adlandırılan yapısal bozukluklardan (lezyonlardan) oluşur (20). Ateroskleroz, içi yumuşak, dışı sert yapısından dolayı Yunanca athero- (lapa) ve -sclerosis (sertleşme) sözcüklerinden türetilmiştir. Aterom, damarın yüzey tabakası kalınlaşmış büyük bir alanının ortasında bulunan, yumru gibi, yumuşak sarımsı bir birikimdir. Arter lümenine yakın noktalarda makrofajlardan oluşur. Bunun altında bazen kolesterol kristalleri ve ilerlemiş lezyonların tabanında kireçlenme (kalsifikasyon), hatta bazen kemikleşme de olabilir (21).

2.1.1. Arterlerin Yapısı

Aterosklerozun patogenezi anlamak için öncelikle normal arterlerin yapısını kavramak gereklidir. Arterler; elastik (aorta, karotis, iliak arterler gibi büyük damarlar) ve mükümler (koroner, brakial, radial, femoral arterler gibi orta boyutlu damarlar) olarak sınıflandırılır. Ayrıca bütün arterler histolojik olarak 3 ayrı tabakaya sahiptirler (22). Bunlar;

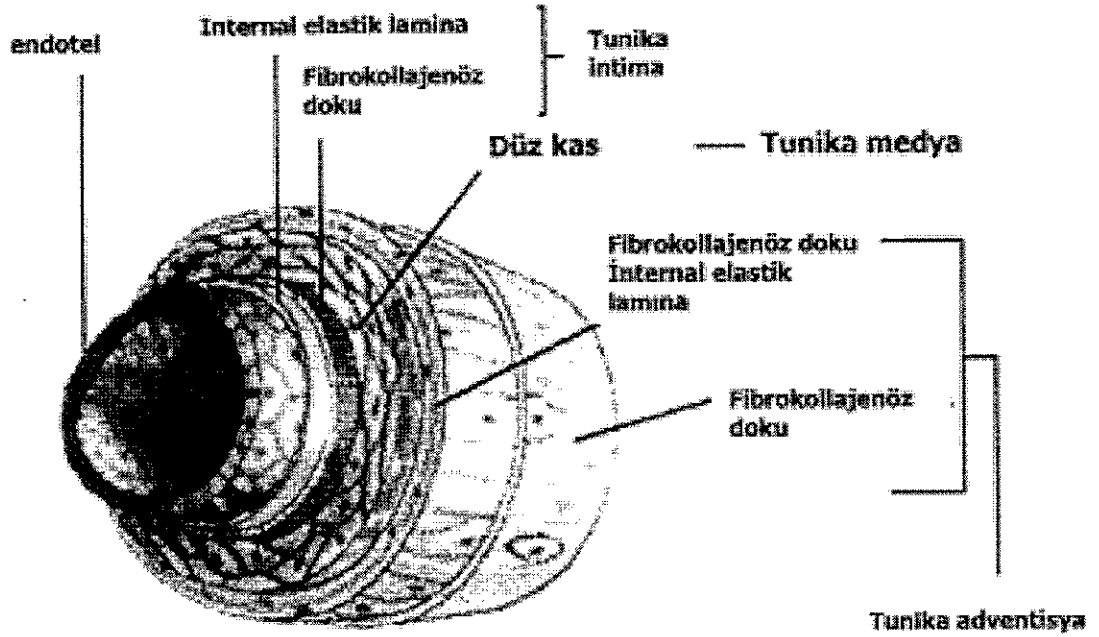
- 1)İntima
- 2)Media
- 3)Adventisya

Tunika intima (İç tabaka): Endotelyum ile internal elastik lamina arasındadır. Media tabakasını koruyan elastin lifleri içerir. İçte endotel hücre dizisi, bunun altında bazal lamina ve gevşek bir fibroelastik bağ dokusundan oluşan subendotelyal tabakadan meydana gelir. Subendotelyal tabakanın dış kısmında elastik fibrillerin yoğunlaşması ile membranda “internal elastik lamina” meydana gelir. Bu yapı orta tip arterlerde belirgin bir şekilde görülür, ancak venler ve büyük tip arterlerde ayırt edilemez. Subendotelyal tabakada arasına düz kas hücreleri de görülür. Bu tabakada hem bağ dokusu fibrilleri hem de düz kas hücreleri boylamsal olarak düzenlenmiştir (23).

Tunika media (Orta tabaka): Esas olarak dairesel biçimde düzenlenmiş düz kas hücrelerinden meydana gelir. Büyüme ve gelişme sırasında bu hücreler yoğun golgi aparatı ve endoplazmik retikulum içerirler. Böylece protein, kollajen, elastin, proteoglikan sentezi çok yoğun olarak gerçekleşir. Kas hücreleri arasında dağılmış farklı miktarlarda elastik ve kollajen fibriller ile proteoglikanlar bulunur. Ekstrasellüler matriks düz kas hücrelerince oluşturulur. Bu tabaka arterlerde iyi gelişmiştir. Elastik ve Mükümler arterler arasında media tabakasının içeriği farklılık

gösterir. Kapiller ve postkapiller venüllerde bu tabakayı perisitler oluşturur. Düz kas hücrelerinden oluşur. Yetişkinlerde bu hücreler sessizdir. Kontraktil filamentler olan aktin ve miyozin içerirler. Medianın 1/3 dış kısmı adventisya kaynaklı vaso-vasorumlardan beslenir. İç tabakaya oksijen ve diğer ihtiyaç duyduğu maddeler dış tabakadan difüzyon yoluyla ve arter lümeninden geçen kan akımından doğrudan elde edilir (24).

Tunika adventisya (Dış tabaka): En dış tabakadır. Daha çok uzunlamasına düzenlenmiş kollajen ve elastik fibrillerden oluşur. Media tabakasının yakınında, elastik fibrillerin yoğunlaşması ile dış elastik lamina oluşur. Adventisya, venlerin duvarlarında en belirgin tabakadır. Bu tabaka çevre bağ dokusu ile devam eder. Büyük damarlarda adventisya içinde "vaza vazorum" olarak adlandırılan küçük kan damarları bulunur. Vaza vazorumlar lümeninden difüzyonla beslenemeyecek kadar kalın olan adventisya ve media tabakalarını besler. Arterlerde bu damarlar daha az sayıdadır ve sadece adventisya tabakasında bulunur (25).



Şekil 2.1.1. Damar kesiti ve damar düz kasının damardaki yerleşimi. Damar düz kası hücreleri damarın medya tabakasında hücre-dışı matriks içinde yerleşmiş olarak bulunurlar (26).

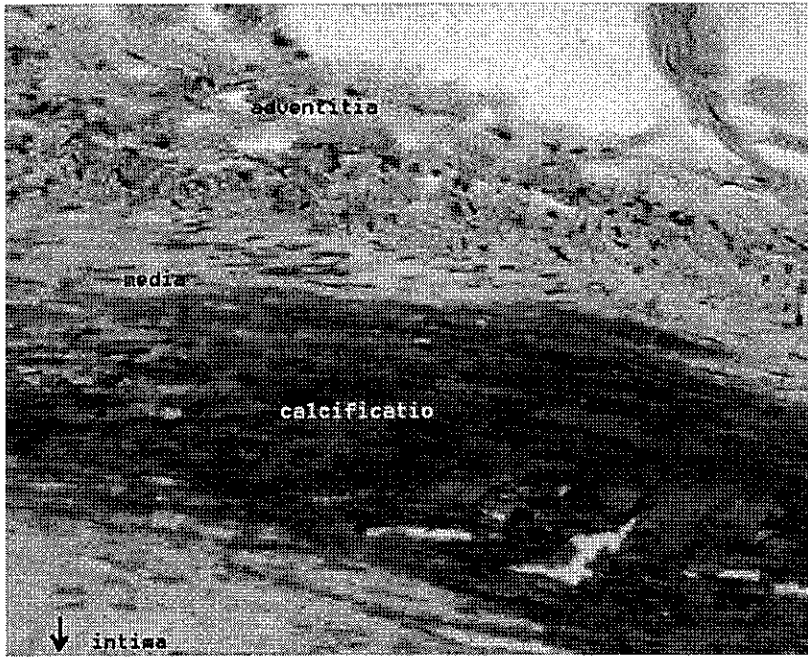
2.1.2. Ateroskleroz Patogenezi

Aterosklerozun mikroskop altında görülebilen ilk aşaması "yağ çizgileri" oluşumudur. Bunlar endotelin altında bulunan, içi lipit dolu hücre topluluklarıdır; yağ çizgileri gelip geçici olabilir. Arter damarlarında hücrelerin (özellikle monosit türevi makrofaj gibi lökositler) ve değişime uğramış lipoprotein birikmesine paralel olarak arter yapısı değişime uğrar. Bunu izleyen yangı (enflamasyon), arterin intima tabakasında aterom plaklarının oluşumuna yol açar. İntima, damarda endotel ile media arasındaki kısımdır. Bu plaklar aşırı yağ, hücreler, kollajen ve elastinden

oluşur. Lümen diye adlandırılan arter boşluğunda başlangıçta herhangi bir daralma (stenoz) oluşturmazlar (26).

Ateromdaki kolesterolün kaynağı LDL'dir. Dokulardaki kolesterolü karaciğere geri taşıyan HDL miktarı az ise bu LDL birikiminin başlattığı süreç daha da hızlanır. Köpük hücreleri ölünce içlerindeki kolesterol ve diğer lipitler ateromda birikmeye başlar (27).

Köpük hücreleri ve trombositler düz kas hücrelerinin hareketini ve çoğalmasını teşvik eder; düz kas hücrelerinin yerine kollajen gelir ve bu hücreler de köpük hücrelerine dönüşür. Lipit birikintileri ile damarın intima tabakası arasında koruyucu bir fibröz örtü oluşur (28).



Şekil 2.1.2. Kalsifikasyonlu (mor boyanmış) bir aterom (Hematoksilin ve eosin boyalı) (29).

Fibro-lipit plak intimanın altında biriken lipit yüklü hücrelerle tanımlanır. Kas tabakası genişlediğinden dolayı lümen daralmamıştır. Endotelin altında bir "fibröz örtü" plağın merkezindeki çekirdeği kaplar. Çekirdekte lipit yüklü hücreler (makrofajlar ve düz kaslar), hücrelerin dışındaki dokuda kolesterol ve kolesterol ester oranı yüksektir, ayrıca fibrin, proteoglikanlar, kollajen, elastin ve hücre kalıntıları vardır. İlerlemiş plaklarda çekirdek bölgesinde ölü hücrelerden salınmış kolesterol birikimleri bulunur. Bu birikimlerde iğne şekilli kolesterol kristallerinden oluşmuş kısımlar görülür. Bu plakların kenarlarında yeni "köpüğümsü" hücreler ve kılcal damarlar bulunur. Yırtıldıkları zaman kişiye en çok zarar veren plaklar bunlardır (30).

Fibröz plak da intimanın altında yer alır, damar duvarının kalınlaşıp genişlemesine yol açar. Bazen kas tabakasının kısmen zayıflamasıyla beraber lümeninde ufak bir daralma olarak da görülür. Fibröz plakta kollajen lifleri (eosinle

boyanan) ve kalsiyum çökeltileri (hematoksin ile boyanan) ve ender olarak da lipit yüklü hücreler bulunur (31).

Damar duvarının içindeki ateromlar yumuşak ve yırtılmaya müsaittir, fazla bir esneklikleri yoktur. Arterler kalp atışlarıyla sürekli genişleyip büzülürler, yani nabız atarlar. Ayrıca ateromun dış kısmıyla kas duvarı arasındaki kireçlenme de, aterom ilerledikçe esneklik kaybına ve damarın sertleşmesine yol açar (32).

2.1.3. Aterogeneze Rol Oynayan Hücreler

Ateroskleroz oluşumunda yer alan dört tip hücre belirlenmiştir. Bunlar endotelial hücreler, düz kas hücreleri, trombositler ve makrofaj/monositlerdir (33).

Endotel Hücreleri

Kan ve vasküler düz kas arasında bulunur ve vasküler lümeninde bulunan kan için bir bariyer oluştururlar. Endotelial sistem ileri derecede aktif bir endokrin organdır. Endotel gevsetici (relaxing) faktör gibi vazodilatasyon yapan maddeleri ve endotelin gibi vasokonstriksiyon yapan maddeleri salgılayarak lokal vasküler regülasyona katkıda bulunur (34).

Düz Kas Hücreleri

Aterogeneze yer alan temel mekanizma, intima içinde düz kas hücrelerinin proliferasyonudur. Bu hücrelerin genellikle kontraksiyon fonksiyonu yaptığı düşünülmüşse de gerçekte kontraktıl durum ve sentetik durum olmak üzere iki farklı fenotipi vardır (35).

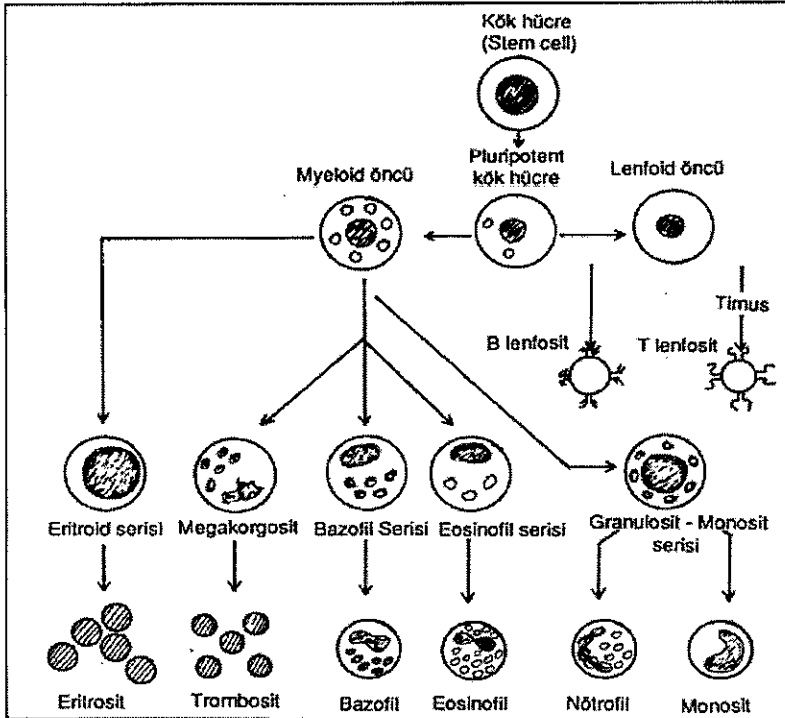
Monosit/Makrofajlar

Monosit/makrofajlar vücudun temizleyici hücreleridir. Bazıları dolasımından ayrıldıktan sonra, sabit doku makrofajları haline gelirler. Dolasımda kalan monositler, ihtiyaç halinde interlökin-1 (IL-1) dahil birçok mediatörle makrofaj olmak için uyarılır (36, 37). Makrofajlar uyarıldığında kemoatraktif ve mitojenik bileşiklerin salınımını yaparlar. Bunun da düz kas hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonuna etkisi vardır. Düz kas hücreleri gibi makrofajlar da lipoproteinlerin tutulması için LDL reseptörlerini oluştururlar (36, 38). Bundan başka makrofajlar, yağ izlerinde köpük hücrelerinin major kaynağıdır. Ayrıca süperoksitler ve hidrolazlar gibi destrüktif maddelerin salınımını da yaparlar. Bunlar da komşu hücrelerdeki hasarı arttırabilirler (39).

2.2. Trombositler

Kan pulcukları (trombositler) nükleus içermeyen, 2-4 µm çapında ve disk biçiminde sitoplazma parçacıklarıdır (37). Bu yapılar kemik iliğindeki poliploid dev hücreler olan megakaryositler tarafından üretilirler. Trombositler kanın pıhtılaşmasını uyarıp, kan damarlarındaki çatlakların onarılmasını sağlarlar ve kanın damar dışına çıkmasına engel olurlar. Her mikrolitre kanda yaklaşık olarak 200.000–400.000 kadar trombosit bulunur. Trombositler kan dolaşımına girdikten sonra 8-10 gün kadar yaşarlar (40).

Boyanmış yayma preparatlarda genellikle kümelenmiş olarak görülürler. Trombositler soluk mavi renkte boyanan ve hyalomer adı verilen periferde şeffaf bir bölge ile mor boyanan ve granüllerin yerleştiği granülomer adı verilen merkezi kısımlardan oluşur (41). Trombositler, plazma zarının sitoplazma içine doğru parmak şeklinde girmesiyle oluşan ve yüzeye açılan kanaliküler sistem adı verilen bir kanal sistemi içerir. Bu sistem, muhtemelen sitoplazmada depolanmış olan aktif moleküllerin dış ortama atılmasında oldukça büyük kolaylık sağlayan fonksiyonel yapılaşmadır (42, 43). Trombositlerin periferik kısmında dairesel dizilim gösteren mikrotübüllerin kenar demeti bulunur; bunlar trombositlerin disk biçiminde kalmalarını sağlar. Hyalomer bölgesinde elektron yoğun düzensiz tüplerden oluşan ikinci bir kanal sistemi bulunur (44). Bu sisteme yoğun tubuler sistem adı verilir. Trombositlerin hyalomer bölgesinde membrana yakın olarak yerleşmiş aktin içeren mikrofilamanlar, trombosit hareketini ve trombositlerin birbirlerine yapışması esnasında filopod ve yüzey uzantılarının oluşmasını sağlarlar (45). Trombosit membranının dış yüzünde glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden zengin 15-20 nm kalınlığında bir hücre örtüsü bulunur. Bu tabaka trombositlerin birbirlerine ve yabancı yüzeylere yapışmasından sorumludur (46). Merkezi granülomer bölgesinde değişik özellikte granüller, az sayıda mitokondri ve glikojen partikülleri bulunur. Granüller oldukça farklıdır. Yoğun cisimler (delta granülleri) 250-300 nm çapa sahiptirler ve kalsiyum iyonları, pirofosfat, ADP ve ATP içerirler (47). Bu granüller plazmada bulunan serotoninini (5-hidroksitriptamin) alarak depolarlar. Alfa granülleri biraz daha büyük olup, 300-500 nm çapındadırlar. Bu granüller fibrinojen, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve trombositlere özgü başka bazı proteinleri içerirler. Çapları 175-250 nm arasında olan küçük veziküller sadece lizozomal enzimler içerirler ve lambda granülleri olarak isimlendirilirler. Işık mikroskobu ile granülomerde gözlenen granüllerin büyük bölümü alfa granülleridir (48).



Şekil 2.1.3: Kan Hücrelerinin Oluşumu "Hemopoietik Ağaç" (49).

2.2.1. Trombosit Üretimi

Trombositler, kemik iliğinin en büyük hücresi olan megakaryositler tarafından üretilirler (50). Megakaryositler kemik iliğini bir ağ şeklinde sarmış olan vasküler sinüslerin üzerinde, eritroblastlar adacıklar halinde, granüositler ise metamyelosit aşamasına kadar hematopoietik kordonların ortalarında yer alırlar (51). Megakaryosit, poliploid bir hücredir. Yani, nükleusu ikinin (diploidi) katları kadar deoksiribonükleik asit içerir. Bu özellik, megakaryositopoez sırasında sitoplazma bölünmesinin eşlik etmediği ardışık çekirdek bölünmeleri (endomitoz) nedeniyle ortaya çıkar (52). Endomitoz, megakaryositer seriye özgü bir bölünme özelliğidir (53). Genç megakaryositler çekirdek/sitoplazma oranları yüksek, bazofilik hücrelerdir. Olgunlaştıkça bazofili ve çekirdek/sitoplazma oranı azalır; asidofili, sitoplazma büyüklüğü, çekirdek lobulasyonu ve kromatin yoğunluğu artar. Megakaryositler olgunlaştıkça gerek çekirdek lobulasyonu, gerekse ploidi artmaktadır. Ancak, Lob sayısından ploidiyi belirlemek mümkün değildir (54). Maturasyonunu tamamlamış bir megakaryositin çapı 35-160 µm arasındadır. Elektron mikroskopide bu hücrelerin en çarpıcı özelliği “demarkasyon membran sistemi” denilen yaygın sitoplazmik membran ağıdır. Bu membran sisteminin megakaryosit olgunlaşması sırasında sitoplazma membranının invajinasyonu sonucunda oluştuğu tahmin edilmektedir (55). Diğer megakaryosit organelleri, protein sentez elementleri olan endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği, mitokondri ve olgunlaşmamış sayısız serbest ribozomlardır. Ayrıca mikrotübüller, mikrofibriller, glikojen granülleri, yoğun ve geniş granüller de izlenir. Megakaryosit sitoplazması içinde ileride serbestleşecek olan trombositlerin sınırlarını seçmek mümkündür. Megakaryositer serinin morfolojik olarak tanınabilen elemanlarının çoğalma yetenekleri yoktur; yalnızca maturasyon ve trombosit üretme özellikleri vardır. Bu elemanların yenilenmesi, hem proliferasyon hem de maturasyon yetenekleri olan multipotansiyel progenitör hücrelerin farklılaşmaları ile mümkün olmaktadır (56). Promegakaryoblast olarak adlandırılan öncül hücreler, gelişim süreci içinde proliferasyon ve maturasyon yetenekleri olan prekürsörler ile yalnızca maturasyon özellikleri olan olgun megakaryositler arasında yer alırlar (57). Erken prekürsörlere özgü bir özellik olan proliferasyon yetenekleri oldukça azalmıştır. Bu hücreler morfolojik olarak tanınamazlar. Ancak megakaryosit ve trombositlere özgü trombosit peroksidazı, glikoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), von Willebrand faktörü (vWF) gibi yüzey ve sitoplazmik işaretler taşımaları nedeniyle belirlenmeleri mümkündür (58).

Morfolojik olarak tanınabilen, matür megakaryositlerin 4 gelişim evresinden geçtikleri gözlenir. Megakaryoblast (stage I) yüksek bir çekirdek/sitoplazma oranına, dar ve bazofilik bir sitoplazmaya sahiptir. Promegakaryosit aşamasında (stage II) hem sitoplazma volümü hem de trombositlere özgü granüller artmıştır. Stage III ve stage IV granüler megakaryositler bu serinin en olgun elemanları olup, trombosit üretimi bu aşamalarda izlenir. Stage III granüler megakaryositlerde çekirdek sıklıkla periferite itilmiştir. Sitoplazma oldukça geniş ve yoğun düzeyde granülerdir. Elektron mikroskopide demarkasyon membran sisteminin yaygınlaşmış olduğu izlenir. Işık mikroskopisinde stage IV granüler megakaryositlerin sitoplazma sınırlarının düzensizleştiği görülür. Sitoplazma, tam olarak saptanamayan bir mekanizma ile trombositler oluşacak şekilde parçalandıktan sonra geriye kalan çıplak nükleus makrofajlar tarafından fagosite edilir (8, 59, 60).

Megakaryosit sitoplazmasının trombositlere dönüşmesi konusunda değişik hipotezler ileri sürülmüştür. Daha çok kabul edilen akım modelidir. Buna göre in vitro kültürlerde megakaryositlerin ince uzantılar oluşturdukları ve bu sırada demarkasyon membran sisteminin kaybolduğu gözlenmiştir (61, 62). Birçok boğum yapan bu uzantılara proplatelet adı verilmiş, boğumların trombosit sınırlarını oluşturdukları düşünülmüştür. Megakaryositlerin, in vivo şartlarda kemik iliğindeki venöz sinüslerden içeriye doğru uzanan benzer yapılar oluşturdukları saptanmıştır. Kan akımının etkisiyle proplateletlerin boğum bölgelerinden kopmalar meydana geldiği ve bu şekilde serbest kalan trombositlerin dolaşıma katıldıkları ileri sürülmüştür (63, 64). Demarkasyon membran sisteminin bir trombosit membran rezervi olduğu düşünülmekle birlikte, trombosit membran yapısına nasıl katkıda bulunduğu henüz anlaşılabilmiş değildir. Megakaryosit sitoplazma zarı ve onun invajinasyonu sonucunda olduğu düşünülen demarkasyon membran sisteminin yapılarının trombosit membran yapısından farklı olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden, trombosit membranının direkt olarak bu membran yapılarından oluşmadığı düşünülmektedir. Megakaryosit ve proplateletlerin de periferik kana çıkabildikleri, burada ve pulmoner dolaşımda fragmente olup trombosit üretebildikleri gösterilmiştir. Ancak, kemik iliği dışına çıkan megakaryositlerin trombosit üretimindeki relatif katkıları henüz aydınlatılamamıştır (65, 66).

2.2.2. Trombosit Üretimi'nin Düzenlenmesi

Birçok sitokin megakaryositopoezde rol oynadığı gösterilmiştir. Etkileri megakaryositer seriye spesifik olmayan interlökin-3 (IL-3), interlökin-6 (IL-6), interlökin-11 (IL-11), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF), lösemi inhibe edici faktör (leukemia inhibitory factor, LIF) ve stem hücre faktörünün (stem cell factor, SCF) megakaryositopoez üzerinde sinerjistik katkıları olduğu bilinmektedir (67). Bu sitokinler yalnızca megakaryositopoezin erken evrelerine etki etmekte ve/veya trombopoietin yokluğunda morfolojik olarak normal yapıda megakaryositler üretmemektedirler (68, 69). Megakaryositer serinin özgül sitokini olan trombopoietinin esas yapım yeri karaciğerdir. Sabit bir hızda sentezlenen bu sitokin hedef hücreleri olan megakaryosit ve trombositler tarafından metabolize edilmektedir. Trombopoietin, diğer sitokinlerin etkilerinin nötralize edildiği şartlar altında bile megakaryositopoezin bütün aşamalarını uyarmaktadır (70, 71).

2.2.3. Trombosit Aktivasyonu

Trombosit aktivasyonunun üç aşamada gerçekleştiği kabul edilir:

- 1) Uyarı: Genellikle agonistlerin ortaya çıkmasına yol açarak trombosit aktivasyonuna neden olan bir olay vardır. Agonistlerin trombositlere bağlanması bu hücrenin aktivasyonunu başlatır.
- 2) Hücre içindeki ikincil mesajların uyarıyı iletmeleri.
- 3) Cevap: Trombosit iskelet yapısının değişmesi, trombositlerin fibrinojen aracılığı ile yapışık küme oluşturmaları ve granül sekresyonudur.

Trombosit aktivasyonunu başlatan agonistler zayıf ve güçlü olarak sınıflanırlar. Güçlü agonistler (kollajen, trombin vb.) agregasyonun engellendiği şartlarda dahi (örn. Glanzman trombastenisi) granül sekresyonunu uyabilirler. Zayıf agonistler

(ADP, epinefrin vb.) ise yalnız başlarına granül sekresyonunu uyaramazlar; ancak agregasyonu uyabilirler. Agregasyon neticesinde sekresyon gerçekleşebilir (72).

Trombosit agonist reseptörleri, çoğunlukla transmembran uzantıları da olan plazma membran proteinleridir. Tam anlamıyla karakterize edilebilen reseptörlerin çoğu “G proteinleri ile ilişkili reseptörler” grubundandır (Tablo 3).

Tablo 2.2.1. Trombosit agonist reseptörleri (73)

Agonist	Reseptör	Reseptörün Tipi
Trombin	Trombin reseptörü	G proteinleri ile asosiye
Tromboksan A2	Tromboksan A2 reseptörü	G proteinleri ile asosiye
Epinefrin	alfa2-adrenerjik reseptör	G proteinleri ile asosiye
Platelet activating factor (PAF)	PAF reseptörü	G proteinleri ile asosiye
Vazopressin	V1 reseptör	G proteinleri ile asosiye
ADP	?	?
Kollajen	GPIa/IIab	Integrin

Bu reseptörlerin ortak özellikleri, yedi adet transmembran kıvrımı olan tek bir polipeptid yapısında olmaları ve oluşturdukları uyarıyı ikincil mesajcılara ileten, G proteinleri olarak adlandırılan adaptör proteinler kullanmalarıdır (74). Trombosit aktivasyonu genellikle birden fazla ikincil mesaj sisteminin uyarılması ile sonuçlanır. En iyi bilinen iki ileti sistemi fosfoinozid hidroliz yolu ve eikozanoid yoludur. Fosfoinozid hidroliz yolu, G proteini tarafından aktive edilen fosfolipaz C'nin trombosit membranının iç yüzeyinde bulunan fosfotidil inozitol 4, 5-bifosfat'ı (PIP2) parçalaması ile başlar (73). Açığa çıkan inozitol trifosfat (IP3) ve diaçil gliserol (DAG) ikincil mesajcı olarak görev yaparlar. IP3 yoğun tübüler sistemi etkileyerek, buradan sitoplazma içine kalsiyum salınmasını sağlar. Sitolik serbest kalsiyum düzeyinin artması ve DAG'un direkt etkisi ile bir başka sinyal sistemi olan protein kinaz C (PKC) sistemi de uyarılır. PKC sinyal sisteminin trombositlerdeki rolü henüz tam anlamıyla anlaşılammıştır (75). Sitolik serbest kalsiyum düzeyinin artışının bir diğer neticesi ise, eikozanoid yolunun aktivasyonudur. Kalsiyum düzeyinin artışı ile uyarılan sitoplazmik fosfolipaz A2, yoğun tübüler sistem membranından ve belki de sitoplazma zarından araşidonik asit ayrılmasını sağlar. Araşidonik asit sitoplazmada başlıca tromboksan A₂'ye (TxA₂) metabolize edilir. Hücre dışına salınan TxA₂, civardaki trombositleri de uyarak trombosit aktivasyonunun amplifiye olmasını sağlar (76).

Glikoprotein-Ib'nin de yüksek afinite ile trombin bağlayabildiği gösterilmiştir. Ancak fonksiyonel bir reseptör olduğu henüz kanıtlanamamıştır. GPIa/IIa'nın kollajen bağladığı gösterilmiştir. Ancak fonksiyonel bir reseptör olduğu henüz kanıtlanamamıştır. GPIIb/IIIa ve GPIV de kollajen bağlayabilmektedir (77).

Trombosit reseptör uyarılması ve G proteinleri aracılığı ile ikincil mesajcı sistemlerin aktivasyonu ile trombosit aktivasyonunun nihai sonuçları olan sekresyon ve agregasyon aşamaları arasında, hücre içinde ne cereyan ettiği çok iyi anlaşılammıştır. Sitolik serbest kalsiyum düzeyinin artması ve PKC sisteminin

aktivasyonu neticesinde inaktif durumda bulunan bazı trombosit enzimlerinin aktif duruma geçtikleri tahmin edilmekte, ancak bu enzim aktivasyonlarının nasıl bir mekanizma ile granül ekzositozuna, agregasyonu mümkün kılan aktin iskeleti reorganizasyonuna ve fibrinojen reseptör aktivasyonuna yol açtıkları bilinmemektedir. Son yıllarda trombosit aktivasyon mekanizması konusunda yeni bilgiler elde edilmiştir (78):

- 1) Trombosit aktivasyonu neticesinde sitozolik kalsiyum düzeyinin artışı ve PKC yolunun uyarılması ile sonuçlanan fosfoinozid hidroliz yolu aktivasyonu dışında, fosfoinozid sentezi de uyarılmaktadır. Bu yolun ürünleri olan PIP₂'ı ve fosfatidil inozitol 3, 4, 5-trifosfat'ın aktin filament reorganizasyonunda direkt olarak rol oynadıkları gösterilmiştir (79).
- 2) PKC sinyal iletim sisteminin uyarılmasının fibrinojen reseptörü olan GPIIb/IIIa'nın aktivasyonu ile sonuçlandığına dair yeni deliller elde edilmiştir (80).

Özetlenen bu iki mekanizma trombosit morfolojisinin değişmesi ve fibrinojen bağlanması ile sonuçlanmakta, dolayısı ile agregasyon ortaya çıkmaktadır. Gerek fosfoinozid sentez sistemi yolu ile aktin iskeleti reorganizasyonunda, gerekse PKC sistemi yolu ile GPIIb/IIIa reseptör aktivitesinin ayarlanmasında plekstrin adı verilen bir protein önemli düzenleyici roller oynamaktadır (81). İlginç olarak, sinyal iletiminde ve trombosit iskelet yapısında rol oynayan birçok proteinin plekstrin ile homolog motifler içerdikleri saptanmıştır. Plekstrin homoloji bölgeleri olarak adlandırılan bu ünitelerin görevleri henüz anlaşılabilmiştir (82).

2.2.4. Trombosit Agregasyonunun Moleküler Temelleri

Trombosit agregasyonu enerji harcayan bir süreçtir. Agregasyonun gerçekleşmesi için intakt trombositler haricinde mutlaka olması gereken üç komponent daha vardır (83):

1. **Trombosit agonisti:** İn vivo trombosit agonistleri Tablo 2.2.1'de gösterilmiştir. Agonist ile uyarılmayı takiben ilk anda trombositler diskoid yapıdan sferik forma dönüşür. Bu sırada, agregometre turbiditede hafif bir artış kaydeder. Bu transformasyon trombosit agregasyonu için şart değildir. Örneğin, epinefrin kaydedilebilen bir şekil değişikliğine neden olmadan agregasyon oluşturur (73).
2. **Divalan katyonlar:** Trombosit agregasyonu için milimol düzeyinde konsantrasyonlarda kalsiyum ve magnezyuma ihtiyaç vardır. Kalsiyum GPIIb/IIIa'nın ligandlarına bağlanabilmesi için gereklidir (84).
3. **Fibrinojen:** Fibrinojen, fibrin oluşturması ve trombosit agregasyonunu desteklemesi dolayısıyla trombus oluşumunda iki ayrı role sahiptir. Uyarılmamış trombositlere çok az miktarda fibrinojen bağlanabilirken, ortama agonist eklenip uyarıldıklarında hücre başına 40.000 fibrinojen molekülü bağlanabilmektedir. GPIIb/IIIa reseptörünün latent durumdan, fibrinojen bağlayabilecek aktif duruma geçmesi bütün agonistlerle olan trombosit aktivasyonunun ortak bir sonucudur. Ortamdaki divalan iyonlar uzaklaştırılınca, fibrinojenin artık trombositlere

bağlanmadığı izlenir. O halde agonistler fibrinojen reseptörünü indüklemekte, fibrinojen ile GPIIb/IIIa'nın bağlanması içinse kalsiyum gerekmektedir (85).

Dimerik bir protein olan fibrinojenin komşu iki trombositin GPIIb/IIIa reseptörleri arasında köprü oluşturmak suretiyle trombosit agregasyonunu sağladığı düşünülmektedir. Fibrinojen ile GPIIb/IIIa bağlanması başlangıçta tersinebilir bir reaksiyondur. Divalan iyonların ya da agonistlerin ortadan kalkması ile fibrinojen reseptöründen ayrılabilir (86). Trombosit sekresyonunu uyaramayacak kadar düşük konsantrasyonda ADP veya epinefrin kullanılarak ya da sekresyon bozukluğu olan trombositlerle agregasyon incelendiğinde küçük bir agregasyon dalgası ortaya çıktığı, ancak agregasyonu amplifiye edecek yoğun ve granül içerikleri salınamadığından dolayı trombositlerin fibrinojen moleküllerinden ayrılarak çözüldükleri (disagregasyon) izlenir (87). Uygun şartlar altında fibrinojen ile GPIIb/IIIa arasındaki bağlanma stabilize olarak tersinmez hale gelir. Bu dönüşüm kalıcı trombosit agregasyonuna yol açar. Kalıcı trombosit agregasyonunun moleküler mekanizması iyi bilinmemektedir. Bu aşamada, GPIIb/IIIa-fibrinojen kompleksinin trombosit iskeletine bağlandığı ileri sürülmektedir (88).

2.2.5. Aterosklerozda Trombositlerin Rolü ve Aktivasyonu

Aterogenezin hemen her aşamasında lezyon üzerinde trombosit kümeleri veya mural trombüsler görülebilir. Trombositler, çekirdeksiz hücreler olduklarından protein üretememelerine karşın, içerdikleri granüllerde çok sayıda değişik mitojenler, sitokinler ve vazoaaktif maddeler taşırlar. Endotel hasarında olduğu gibi, herhangi bir biçimde tetiklenen trombosit aktivasyonu ve agregasyonu, sonuçta degranülasyona ve bu maddelerin salıverilmesine neden olur. Bu mekanizma aterogenezde rol oynamaktadır. Yüksek kolesterol düzeyinin, stres ve sigaranın trombosit agregasyonunu arttırarak, bu mekanizmayı hızlandırdığı düşünülmektedir (89). Trombosit aktivasyonu aterosklerozun farklı safhalarında görülebilir. Dolaşımdaki aktive olmuş trombositler, aterosklerozun trombotik olaylarıyla ilişkilidir (90).

Aterosklerozda trombosit aktivasyonundan sorumlu moleküler mekanizma bilinmemektedir. Aktivasyonla birlikte trombositlerden bir dizi adeziv ve proinflatuar bileşikler salınır. Bu salınım olaylarında α -granüller ve yoğun tübüler sistem yer alır. Bunlardan α -granüller, inflamasyona aracılık eden adeziv peptit ve proteinleri depolar. Bu bileşiklerden çoğu inflamasyon ve aterosklerozla ilgilidir. α -granüllerden salınan IL-1 β ve CD40 ligandı (CD40L) son yıllarda ilgi odağı olmuştur (91).

2.3. CD40 sinyalizasyon yolağı

2.3.1. CD40

CD40, 45kD ağırlığında transmembran bir glikoproteindir ve monomer olarak bulunur. CD40, TNF gen ailesine üye fosforillenmiş bir membran glikoprotein reseptörüdür(5). Bu ailenin diğer üyeleri arasında TNFR tip I (p55-TNFR ve CD120a) ve tip II (p75-TNFR ve CD120b), düşük-afiniteli sinir büyüme faktörü reseptörü, CD27, CD30, CD95 (Fas/Apo), Ox40, DR-3/4/5, RANK, ve 4-1BB.99

vardır. Genin transkripsiyonu 277 amino asitli ve 48-kDa ağırlıkta tip I transmembran proteini oluşturur. Nükleer faktör (NF)- κ B ve STAT bağlayıcı kısımlardaki promotor bölgelerin aktivasyonu sonucu gen transkripsiyonu gerçekleşir. Son çalışmalar, CD40 ekspresyonuna RelB'nin doğrudan katıldığını göstermiştir. Amino asit düzeyinde insan ve kemirgen CD40 ları %62 genel sekans benzerliği sergilerken, intrasellüler bölgede ve C-ucunda bulunan 32 rezidüde sırasıyla %78 ve %100 benzerlik saptanmıştır. Ekstrasellüler bölgesinde yapılan üç boyutlu analizlerde CD40 ile TNFR arasında güçlü yapısal benzerlik saptanmıştır.

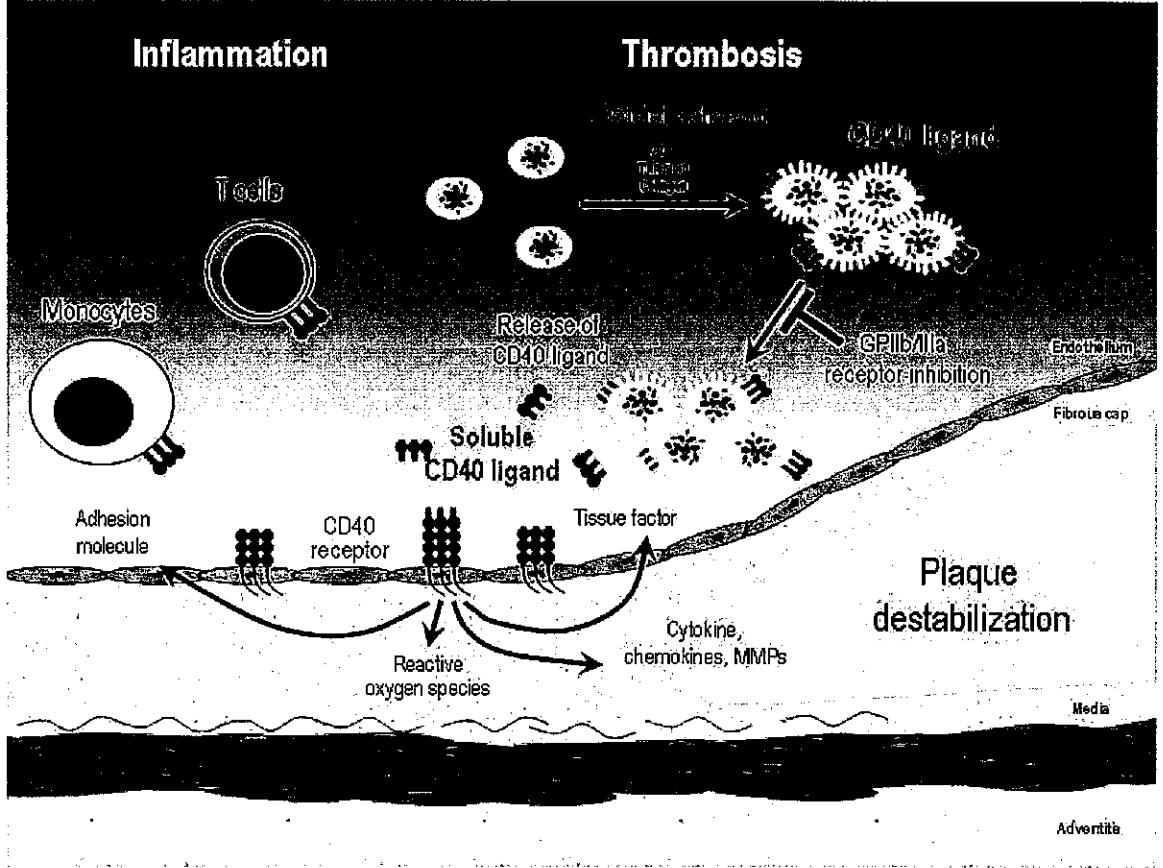
CD40, B lenfositlerin yanı sıra, bir çok başka hücrede de eksprese edilir. Tablo 2.3.1 de CD40 eksprese eden hücre tipleri gösterilmiştir.

Tablo2.3.1. CD40 ve CD40L eksprese eden hücreler.

	Hücre tipi
CD40	B lenfositler
	CD34 ⁺ progenitör hücreler
	T lenfositler (CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ /8 ⁺ , TCR ⁺)
	Polimorfonükleer granüositler (bazofiller, eosinofiller)
	Mononükleer fagositler (monositler, makrofajlar)
	Dendritik (langerhans) hücreler
	Epitelyal hücreler
	ECs
	SMC (vasküler, bronşiyal)
	Keratinositler
	Fibroblastlar
CD40L	B lenfositler
	T lenfositler (CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD4 ⁺ /8 ⁺ , TCR ⁺ , CD45RO ⁺ , CD45RA ⁺ , Th0 ⁺ , Th1 ⁺ , Th2 ⁺ , Tc1 ⁺ , Tc2 ⁺)
	Polimorfonükleer granüositler (bazofiller, eosinofiller)
	Mononükleer fagositler (monositler, makrofajlar)
	Dendritik (langerhans) hücreler
	Epitelyal hücreler
	ECs
	SMC (vasküler, bronşiyal)
	Mast hücreleri
	Naturel Killer (NK) hücreleri
	Trombositler

Tüm bu hücreler, CD40'ı in vitro ortamda ve sağlıklı dokularda eksprese eder. İnflamatuar sitokinler varlığında (örneğin: IL-1, IL-3, TNF- α , GM-CSF ve özellikle IFN- γ) in vitro CD40 ekspresyonu artar.

Trombositlerde CD40 ve CD40L ekspresyonunun varlığı trombosit aktivasyon mekanizmalarından birini göstermektedir ve trombosit aktivasyon göstergesi olarak kullanılmaktadır (5).



Şekil 2.3.1. CD40'ın trombus oluşumundaki rolü (92).

CD40L'in CD40 reseptörüne bağlanması, enflamatuar sitokinlerin salınımına, adezyon moleküllerinin ekspresyonuna, matris metalloproteinaz aktivasyonuna ve doku faktörünün ekspresyonuna neden olur (6). Bunlara ilave olarak, CD40-CD40L etkileşimi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu artırarak endotel hücre göçüne neden olurlar (4).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, trombositlerin inflamasyon ve vasküler hasarda rol aldığını göstermiştir. Uyarılan trombositler, CD40L ve interlekin-6 (IL-6) gibi proinflamatuar sitokinler, platelet faktör-4 (PF-4) gibi proinflamatuar kemokinleri salgılamaktadır ki tüm bu moleküller, hiperkolesteroleminin aracılık ettiği enflamatuar olaylarda rol almaktadırlar (9).

CD40L, trimerik yapıda bir transmembran proteindir. CD40L istirahat halindeki plateletlerin sitoplazmasında bulunur ve aktivasyonla beraber çok hızlı bir biçimde yüzeyde sunulur (93). Yüzeyde eksprese olan CD40L dakikalar veya saatler sonra ayrılarak, çözünür haldeki sCD40'ları oluştururlar. Trombosit kaynaklı sCD40L çeşitli enflamatuar cevaplar oluşturabilir. CD40/CD40L yolağının bloke olması, ateroskleroza belirgin biçimde azaltmıştır (94). CD40L'nin bu aşamaya nasıl katkıda bulunduğu henüz bilinmemektedir (91).

2.4. Plazmada Ölçülen Trombosit Aktivasyon Markırları

2.4.1. P-selektin

P- selektin glikoproteini, trombositlerin alfa-granüllerinde bulunur ve trombositlerin aktive olması ile çok hızlı bir biçimde hücre yüzeyine transloke olarak en az 1 saat trombositlerin yüzeyinde kalır. P-selektin ilk olarak aktive olmuş trombositlerin yüzeyinde teşhis edildiği için p-(platelet)-selektini olarak adlandırılır ve trombosit aktivasyon markırı olarak kullanılır (95).

Daha önceki çalışmalarda kullanılan trombosit aktivasyon markırları arasında kullanılan ve yine alfa-granüllerden salınan platelet faktör 4 (PF4) ve beta-tromboglobulin bulunmaktaydı. Bu markırların yarı ömürleri çok az ve ölçüm aralıkları çok geniştir (95).

2.4.2. İnterlökin-6 (IL-6)

İnterlökinler, ilk kez görüldükleri beyaz kan hücreleri olan lenfositlerce eksprese edilen sinyal iletimine aracılık eden moleküller olan sitokinlerin bir grubudur. Adı, lenfositlerden “lökin” ve haberleşme anlamında “inter”den gelir. İnterlökin-6 (IL-6), makrofajlar, TH2-hücreleri, B hücreleri, astrositler ve endotel hücrelerinde bulunur ve hedef hücrelerdeki CD126 ve CD130 reseptörlerine bağlanır. Hedef hücreleri olan etkin B hücrelerinde farklılaşmaya, plazma hücrelerinde antikör salınımına, hematopoietik kök hücrelerinde farklılaşmaya ve T hücrelerinde akut faz reaksiyonuna neden olurken hematopoezis ve enflamasyonda işlev gösterdiği belirtilmiştir (96). IL-6'nun, hem hayvan hem de insanlarda trombosit üretimini arttırdığı gösterilmiştir. Buna ek olarak, IL-6, trombositlerin fonksiyonunu değiştirerek onların trombin ve platelet aktive edici faktör tarafından aktivasyona daha duyarlı hale getirir. Sonuç olarak IL-6, trombosit aktivasyonunu hızlandırır (97).

2.4.3. Platelet Faktör 4 (PF4)

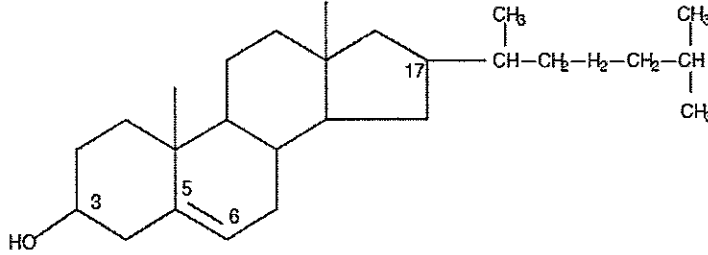
Platelet faktör 4 (PF4), gelişmekte olan megakaryositlerde eksprese olarak, trombositlerin α -granüllerinde depo edilirler. Trombosit aktivasyonu ile dolaşıma salınarak konsantrasyonu $25\mu\text{M}$ 'a ulaşır. PF4, yüksek afiniteyle heparine ve glikoaminoglikanlara (GAG) bağlanır. Her ne kadar PF4'ün biyolojik fonksiyonları bilinmiyor olsa da, biyolojik fonksiyonlarının merkezini GAG'lara bağlanmasının oluşturduğu söylenilmektedir (98). PF4, düşük dansiteli lipoprotein reseptörüne (LDL-R) bağlanarak, LDL'nin reseptörüne bağlanmasını ve dolayısıyla yıkımını engeller. Yıkıma uğramayan LDL miktarı artarak oksidasyona uğrar. Bir başka çalışmada, PF4'ün oksidasyona uğramış LDL (oxLDL)'ye doğrudan bağlanabildiği ve dolayısıyla oxLDL'nin endotel hücrelere, düz kas hücrelerine ve makrofajlara bağlanmasını artırarak aterosklerozu tetiklediği gösterilmiştir (99).

2.5. Kolesterol

Kolesterol insan vücudunun başlıca sterolüdür. Hücre membranlarının ve plazma lipoproteinlerinin yapısal elemanı olduğu gibi, steroid hormonların ve safra asitlerinin sentezinde öncül bileşiktir. Kolesterolün, plazmada taşınımında veya metabolizmasındaki anormallikler, miyokard infarktüsü veya beyin şokuna sebep olan damar sertleşmesi yani aterosklerozun gelişimi ile ilişkilidir. Ayrıca safra taşları

da başlıca kolesterolden oluşurlar. Tüm bu ciddi hastalıklar, bu hastalıkların önlenmesi, teşhisi ve tedavisi temelde kolesterol metabolizmasının anlaşılmasını gerektirir (100).

Steroller, steroidlerin bir sınıfı olup C_3 'de bir hidroksil grubu, C_{17} 'de de bir hidrokarbon yan zinciri içerirler. Kolesterol, nükleusa eklenmiş 20'den 27'ye kadar numaralandırılan sekiz karbon atomlu bir hidrokarbon yan zincire sahiptir .(101)



Şekil 2.5.1. Kolesterol molekülünün kimyasal yapısı.

2.5.1. Kolesterol Metabolizmasında Karaciğerin Rolü

Karaciğer metabolizmanın merkezi kontrol organıdır. Sindirim sistemi yolu ile vücuda dahil olan besin maddeleri karaciğerden geçerek metabolize edilir. Karaciğerde karbonhidrat ve proteinlerden asetil koenzim-A, asetil koenzim A'lerden yağ asitleri ve kolesterol, kolesterolden ise safra asitleri yapılır. Karaciğer fosfolipit, kolesterol ve bazı lipoproteinleri plazmadan alan, organizmanın enerji ihtiyacı olduğu hallerde besinsel veya depo kaynaklı yağ asitlerini parçalayan organdır (102, 103).

Karaciğerdeki total lipit miktarı, bir taraftan vena porta yolu ile ve büyük dolaşım ile karaciğere gelen ve karaciğerin bizzat kendisinin karbonhidrat ve proteinlerden yaptığı lipitlerle ve yağ asitlerinin yağ depolarından karaciğere gönderilmesiyle artar. Karaciğerin %4 g. kadar olan normal lipit düzeyi, bu faktörler arasında bir dengenin devamı ile muhafaza edilir. Karaciğerdeki lipitlerin $\frac{3}{4}$ 'ü fosfolipit, $\frac{1}{4}$ 'ü triaçil gliserollerden ibarettir (104). Triaçilgliseroller normal halde karaciğerde birikmez. Ancak bu faktörlerden birinde veya diğerinde artma veya azalma, karaciğerde fazla miktarda triaçilgliserol birikmesine neden olur. Bu duruma karaciğer yağlanması denir. Fazla miktarda yağ yenmesi, karbonhidrattan aşırı miktarda yağ yapılması, karaciğerden depolara az yağ gitmesi ve karaciğerde yağ sarfiyatının azalması karaciğer yağlanmasının sebepleridir (105).

2.5.2. Kolesterol Biyosentezi

İnsan dokularında kolesterol; aminoasit, karbohidrat veya yağ asitlerinin anahtar metabolik ara ürünü olan asetil KoA' dan sentezlenir. Karaciğer, kolesterol sentezinin yapıldığı dokudur. Ancak steroid hormonların yapıldığı adrenal korteks, testis ve over gibi dokular da kolesterol sentezleme kapasitesine sahiptirler (106).

Kolesterolün yapıldığı isoprenoid biyosentez yolu çok sayıda dallanma noktası içerir. Her bir dal biyolojik önemi olan bileşiğin sentezine gider. Memelilerde bunlar; farnesil pirofosfat, geranilgeranil pirofosfat, ubikinon, dolikol ve tRNA' lara eklenen isopentenil gruptur. Tüm bu maddeler dallı zincirli beş karbon atomlu isopiren birimlerden oluşur (107)

Kolesterol sentezi üç basamakta izlenir. Birinci basamakta, asetil-KoA altı karbonlu tiyoester ara ürüne döner; 3-hidroksi-3 metilglutaril KoA (HMG-KoA). İkinci basamakta HMG-KoA 30 karbon atomlu halkasal olmayan hidrokarbonlardan oluşan squalen'e döner (108).

Üçüncü basamakta ise squalen halkalaşır ve 27 karbon atomlu sterol olan kolesterole döner. Squalen' in kolesterole dönüşümü endoplazmik retikulumunda gerçekleşir. Sentezin son aşamasında yer alan ara ürünler, sitoplazmada sterol taşıyıcı proteine bağlı bulunurlar (109).

Normal kan plazmasında ortalama %200 mg. total kolesterol bulunur. Bunun 2/3'ü ester kolesterol 1/3'ü serbest kolesterol halindedir. Kan plazmasında kolesterol lipoprotein halinde taşınır. Kolesterol en çok karaciğerde olmak üzere, hemen her dokuda enzimatik reaksiyonlarla sentez edilir. Karaciğer serbest ve ester kolesterolün başlıca kaynağıdır. Kolesterol karaciğerden özellikle safra ile salgılanır, bağırsaklara geçer ve emilir. Emilen kolesterol, lenf ve kan yolu üzerinden karaciğere gelir ve tekrar safra ile salgılanır. Yani kolesterolün bağırsak karaciğer arası bir dolanımı vardır (110).

Bazı patolojik hallerde kandaki kolesterol miktarı artar. Bu duruma "hiperkolesterolemi", azalmasına ise "hipokolesterolemi" denir (111).

2.5.3. Kolesterol Sentezinin Kontrolü

2.5.3.1. Feed Back İnhibisyon

Diyetle alınan kolesterol, karaciğerdeki kolesterol sentezi üzerine kuvvetli feed-back inhibitör etkiye sahiptir. Bu etki, kolesterol sentezindeki hız kısıtlayıcı basamaktaki HMG – KoA redüktaz enziminin regülasyonu ile gerçekleşir (112).

Karaciğere diyet kolesterolü şilomikron artığından gelir. Sentezi azaltıcı etki ile (down regülasyon) hepatositlerdeki HMG-KoA redüktaz içeriği değişir. HMG KoA redüktazın yarı ömrü iki saattir. Enzim sentezinin, gen transkripsiyonun inhibisyonu ve protein yıkımının uyarılması ile yavaşlaması, hepatositlerde bu enzim aktivitesinin birkaç saatte düşmesine neden olur. Şilomikron artıkları, hepatosit yüzeyindeki reseptörlerine bağlanıp, endositoz ile hücre içine geçerler. Bu arada kolesterol esterleri lizozomal asit lipaz ile hidroliz olurlar. Böylece, hücredeki kolesterol içeriği artarken, HMG KoA redüktaz aktivitesi düşer. Bu enzim, sentezde hız kısıtlayıcı enzim olduğu için, kolesterol sentezi yavaşlar (113, 114).

2.5.4. Kolesterol Transportu

Diyetle alınan kolesterolün %85-90'ı da bağırsak mukoza hücresinde tekrar esterleştirilir. Barsakta sentezlenen kolesterol, şilomikron ve VLDL içine inkorpore olarak lenf yolu ile kan dolaşımına oradan karaciğere taşınır. Plazmada iken %70-80 oranında esterleşmiştir (115). Karaciğere ulaşınca ester formu kolesterol ester hidrolaz ile hidrolize uğratarak serbest kolesterol halinde hücreye alınır (104). Karaciğerde sentezlenen VLDL ve plazmada VLDL'den üretilen LDL, kolesterolün büyük bir kısmını taşıyarak hedef dokulara ulaştırır. Diyetle alınan kolesterol esterleri, barsakta serbest kolesterole dönüşür. Diyetle alınan kolesterol ve enterohepatik dolaşım ile gelen kolesterol, barsak mukoza hücrelerine alınır. Ayrıca bu hücrelerin sentezlediği kolesterol de buna katılır. Serbest kolesterolün çoğu, burada kolesterol esterine çevrildikten sonra şilomikronların yapısına katılır. Şilomikronlar lenf yolu ile dolaşıma ulaşır. Dolaşımda iken lipoprotein lipazın etkisi ile bileşiminde bulunan serbest kolesterolün ve fosfolipidlerin bir kısmını HDL'ye verir. Geri kalan kısma şilomikron kalıntısı denir. Bu şilomikron kalıntısı karaciğere gelir. Karaciğerde sentezlenen VLDL'nin yapısında olan kolesterol ve kolesterol esterleri plazmada tekrar lipoprotein lipaz ve hepatik lipazın etkisi ile IDL ve LDL lipoproteinleri içinde periferik hücrelere veya kısmen LDL reseptörleri ile tekrar karaciğer hücrelerine taşınır (116).

Özetle, kolesterol ve kolesterol esterleri kanda plazma lipoproteinleri olarak taşınırlar. Lipoproteinler farklı lipid ve protein kompozisyonuna sahiptir. Bundan dolayı her birinin dansitesi farklıdır. Diyetle alınan lipidler şilomikron içinde taşınırlar. Lipoprotein lipaz enzimi ile şilomikronun trigliseridi yapıdan ayrılır. VLDL karaciğerden kolesterol, kolesterol esteri ve trigliseridi diğer dokulara taşır. Triaçilgliserol lipoprotein lipaz ile yıkılır ve böylelikle VLDL, LDL'ye dönüşür. LDL, kolesterol ve kolesterol esterleri açısından zengindir. LDL, VLDL kalıntıları, şilomikron remnantları hücreye reseptör aracılı endositoz ile alınır. HDL ekstraspatik dokulardan kolesterolü, karaciğere taşır (116).

Diyet durumu veya genetik defektler kolesterol metabolizmasını etkiler ve atheroskleroz ve kalp hastalıklarına yol açar. Karaciğer tarafından kolesterolün elimine edilmesi şu şekillerde olur; safrada değişmemiş kolesterol olarak, periferik dokulara gönderilen plazma lipoproteinlerinin bileşeni olarak veya barsak lumenine salgılanan safra tuzları olarak. Plazmadaki kolesterolün 2/3'ünden fazlası ester formundadır. Başlıca esterler kolesterol linoleat ve kolesterol oleattır. Kolesterolün plazmada esterleşmesinde lesitin kolesterol açıl transferaz (LKAT) karaciğer ve ince barsakta esterleşmesinde ise açıl kolesterol açıl transferaz (AKAT) enzimleri rol oynar. HDL, dokulardan aldığı serbest kolesterolü esterleştirmek için LKAT'i kullanır. Hücre içindeki kolesterol bazı yapısal ve sentezsel amaçlar için hemen gerekli değilse AKAT tarafından esterleştirilir (117).

2.5.5. Kolesterolün Yıkımı

Kolesterol esterleri, pankreatik kolesterol esteraz yardımı ile yağ asidi ve serbest kolesterole parçalanırlar. Halka yapısı H₂O ve CO₂'ye kadar metabolize edilemez. Kolesterolün steroid nükleusu insan vücudunda yıkılamaz. Bu yüzden kolesterol ya safra içine salgılanır ve böylece kolesterol atılmak üzere barsağa taşınır

ya da kolesterol safra asitlerine dönüşür ve böylece feçes ile atılır. Barsaktaki kolesterolün bir kısmı atılmadan önce bakteriler tarafından değiştirilir. Bu şekilde oluşan bileşikler **koprostanol** ve **kolestanol**'dür. Bu iki izomer arasındaki tek fark A ve B halkaları arasındaki H atomlarının konumlarıdır (118, 119).

2.5.6. Karaciğer Dışı Dokularda Regülasyon

Karaciğere benzer şekilde bir çok dokuda, plazmadan dokuya geçen kolesterol miktarı ile uyumlu, sentezi azaltıcı etki (down regülasyon) vardır. Fakat, lipoproteine bağlı olarak, karaciğerdeki feed-back inhibisyondan farklıdır (120). Karaciğer dışı dokulara kolesterol, kolesterol esterinden zengin LDL ile taşınır. LDL, hücre yüzeyinde bulunan ve LDL reseptör denilen spesifik proteine bağlanıp, hücre içine kolesterolü bırakır. Bu da HMG KoA redüktaz aktivitesini inhibe edip kolesterol sentezini azaltır. Bunun dışında görülen inhibisyonlar şu şekildedir (121);

- HMG KoA redüktazın kovalent modifikasyonu
- Sirkadian ritm
- Hormonal kontrol
- HMG KoA redüktaz inhibitörleri

2.5.7. Kolesterolün trombosit Aktivasyonuna Etkisi

Serum kolesterol düzeyinin artması ile trombosit aktivasyonu arasında doğru orantı belirlenmiştir (122). Buna ilave olarak kolesterolle inkübe edilen trombositlerde CD40L ekspresyonunun ve CD40L aracılıklı pıhtılaşmanın arttığı belirtilmiştir (123). Nofer ve arkadaşları (124) hiperkolesterolemiye bağlı olarak trombosit membranında Na^+/K^+ antiportunun inhibe olduğunu ve trombositlerin bu mekanizmayla aktive olduğunu belirtmişlerdir.

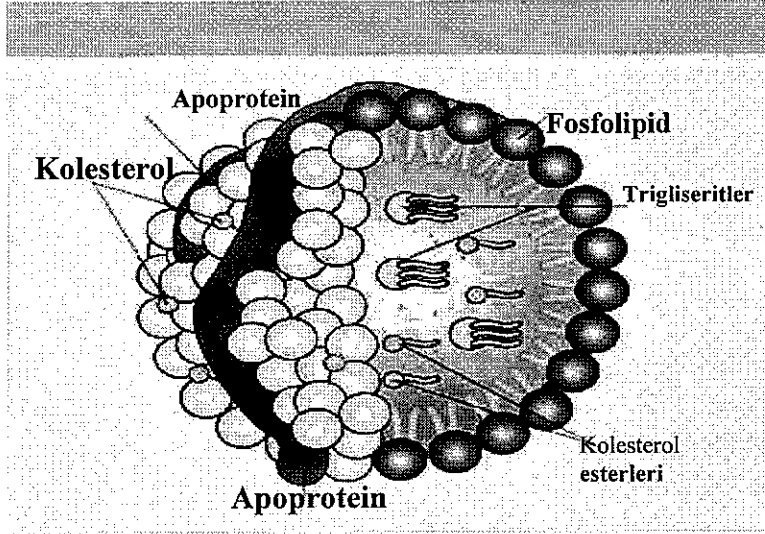
Diyetle alınan kolesterol karaciğer metabolizması üzerine negatif etki eder. Kolesterol metabolize olurken karaciğer hücrelerince alınır, bu esnada büyük ölçüde reaktif oksijen türleri meydana gelir. Bu süreç sonucu, oldukça toksik ürünler olan lipid peroksidlerin aldehit, epoksid ve karbonil türevleri üretilirken antioksidanlar da (enzimatik ve non-enzimatik) çok hızlı bir biçimde tüketilirler (125, 126).

2.6. Lipoproteinler

Lipoproteinler önemlidir, çünkü farklı organlar ve dokular arasındaki lipid transportuna aracılık ederler. Klinik önemleri, ateroskleroz gelişmesinde oynadıkları rolden ileri gelmektedir. Ateroskleroz, koroner arter hastalığı ve inme gibi kardiyovasküler sistemi etkileyen çeşitli hasarların temelini oluşturur (127).

Lipoprotein partikülü kolesterol esterleri ve trigliseritlerden oluşan hidrofilik merkeze sahiptir (128).

Amfipatik fosfolipidler ve serbest kolesterol, proteinlerle birlikte (apoprotein) dış tabakayı oluştururlar. Apoprotein B gibi (Apo B) bazı proteinler partiküle iyice gömülmüştür. Apoprotein C (Apo C) gibi bazı proteinler yüzeye daha gevşek tutunur ve farklı partiküller arasında değiş tokuş yapılabilir (128, 129).



Şekil 2.6.1. Lipoproteinlerin genel yapısı (128)

Lipoproteinler, aynı zamanda elektroforetik hareketliliklerinden dolayı da karakterize edilebilirler. Elektroforez üzerinde α -lipoproteinler (HDL) en uzağa gider. Lipoproteinlerin elektroforezle ayrımı dislipidemiye beş tipe ayıran fenotipik sınıflandırmanın şimdiki klasik temelini oluşturmuştur. Unutulmamalıdır ki, lipid bozukluğu çeşitli fenotipik biçimde olabilir. Son yıllarda lipid bozuklukları ya genetik bozukluklar şeklinde ya da kolesterol, trigliserit ve HDL kolesterolün plazma düzeylerine bağlı olarak tayin edilmektedir (130).

Lipoprotein partikülleri plazmada çeşitli yapı ve dansitede bulunurlar. Dansitelerine göre sınıflandırılacak olurlarsa; şilomikronlar; VLDL, artık partiküller (bunlar arasında IDL (intermediate density lipoprotein)), LDL ve HDL'yi sayabiliriz. VLDL ve artık partiküller trigliseritçe zengin, LDL kolesterolce zengindir (129).

Şilomikronlardan VLDL'ye ve artık partiküller, IDL ve LDL' den HDL' ye gittikçe ağırlıkları artar. Trigliserit içeriği azaldıkça lipoprotein partiküllerinin dansitesi artar (131).

Tablo 2.5.1. Lipoproteinlerin büyüklüklerine göre sınıflandırılması (132).

Partikül	Dansite	Başlıca bileşen	Apoproteinler	Çap (μm)
Şilomikronlar	<0.95	T.G.	B 48 (A, C, E)	75-1200
VLDL	0.95-1.006	T.G.	B 100 (A,C,E)	30-80
IDL	1.006-1.019	T.G.ve Kol.	B 100, E	25-35
LDL	1.019-1.063	Kol	B 100	18-25
HDL	1.063-1.210	Protein	A-I, A2 (C,E)	5-12

2.6.1. Lipoproteinlerin Taşınması ve Metabolizması

Diyette fazla karbonhidrat bulunduğunda, karaciğerde trigliseritlerin sentezi artmaktadır. Karaciğerde karbonhidratlardan elde edilen yağ asitlerinin gliserol ile esterleşmesi sonucu oluşan trigliseritler, çok düşük dansiteli lipoproteinlerin (VLDL) yapısından plazmaya salıverilmektedirler. Karaciğerde yapılan trigliseridlerin başlıca taşıyıcıları olan VLDL molekülleri, karaciğer tarafından salınmaktadırlar. Doku kapillerine taşınan ve lipoprotein lipaz enzimi ile etkin hale geçen VLDL parçacıklarının çekirdeğindeki trigliseridler ve yağ asitleri, yağ dokusundaki trigliseridlerin sentezi için kullanılmaktadır (133).

Bir kısmı karaciğer tarafından katabolize edilen VLDL artıklarından geriye kalan trigliseridlerin hemen hepsi uzaklaştırılarak, yerlerine kolesterol esterleri konmaktadır. Bu dönüşüm süresince, apoprotein B dışındaki tüm proteinler uzaklaştırılmaktadır. Sonuçta VLDL artık parçacığı, kolesterol içeriği zengin, düşük dansiteli lipoproteinlere (LDL) değişmektedir. IDL moleküllerinin yarısı karaciğer tarafından tutulmakta, diğer yarısı ise LDL molekülüne dönüşmektedir (134).

LDL, LDL reseptörü yolu ile metabolize edilmektedir. Karaciğerdeki LDL reseptörleri, dolaşımdaki IDL moleküllerini de tutmaktadır. Hücreler kolesterol gereksinimlerini dışarıdan, LDL-reseptörü aracılığı ile (LDL-reseptör yolu), karşılamakta veya kendileri sentez etmektedir. Hücreye giren kolesterol fazla ise hücrenin kolesterol sentezi HMG-CoA redüktaz aşamasında inhibe edilmektedir. Ayrıca yeni reseptör yapımı azaltılarak hücrenin kolesterol homeostatik dengesi sağlanmaktadır. LDL molekülünün reseptöre yapışması ile meydana gelen LDL-reseptör kompleksinin bulunduğu bölgede bir çöküntü meydana gelmekte ve hücre içinde bir vakuol oluşmaktadır. Bu vakuol, sitoplazmada membran ile çevrilmiş bir vakuol olan ve içinde değişik sindirim enzimleri bulunan lizozom ile birleşmektedir. İki vakuolün birleşmesi sonucu lizozomda bulunan enzimler, LDL kolesterolün protein kılıfını parçalamakta ve hücre için gerekli olan kolesterol açığa çıkmaktadır. Böylece LDL-K, membrandan hücre içindeki lizozoma kadar LDL reseptörü tarafından taşınmaktadır. Proteaz etkisi ile apoproteinden ayrılan kolesterol esterleri serbest kolesterole çevrilmektedir. Serbest kolesterol, hücre içi kolesterol sentezini hidrosimetil glutaril KoA (HMG-CoA) redüktaz enzimini inhibe ederek engellemektedir (133, 135).

LDL-reseptör yoluna ek olarak LDL parçalanmasında, retikuloendotelial sistemdeki fagositik hücreler olan çöpçü hücreler (scavenger cells) tarafından temizlenmektedir. Bu yolak, plazmada yüksek düzeylere ulaşan lipoproteinlerdeki LDL moleküllerini parçalamak için kullanılmaktadır (136).

Trigliserit içeriği zengin şilomikronlar ile VLDL moleküllerinin parçalanması sırasında açığa çıkan apoproteinler ve fosfolipidlerden HDL oluşmaktadır. Bu lipoproteinlerin lipoprotein lipaz (LPL) ile hidrolizi sonucu IDL ve HDL₃ elde edilmektedir. Serbest kolesterol içeriği fazla HDL fraksiyonu olan HDL₃ molekülünden, LKAT enziminin etkisiyle daha büyük olan HDL₂ meydana gelmektedir. Lipoprotein lipaz aktivitesiyle kandaki HDL konsantrasyonu arasında

pozitif bir korelasyon bulunmaktadır. HDL veya apo E bulunan HDL alt grubu ile LDL arasında hücredeki reseptör bazında bir yarışma bulunmakta ve böylece periferik hücreler tarafından LDL alınabilmesi azalabilmektedir (137, 138)

2.6.2. Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein (VLDL)

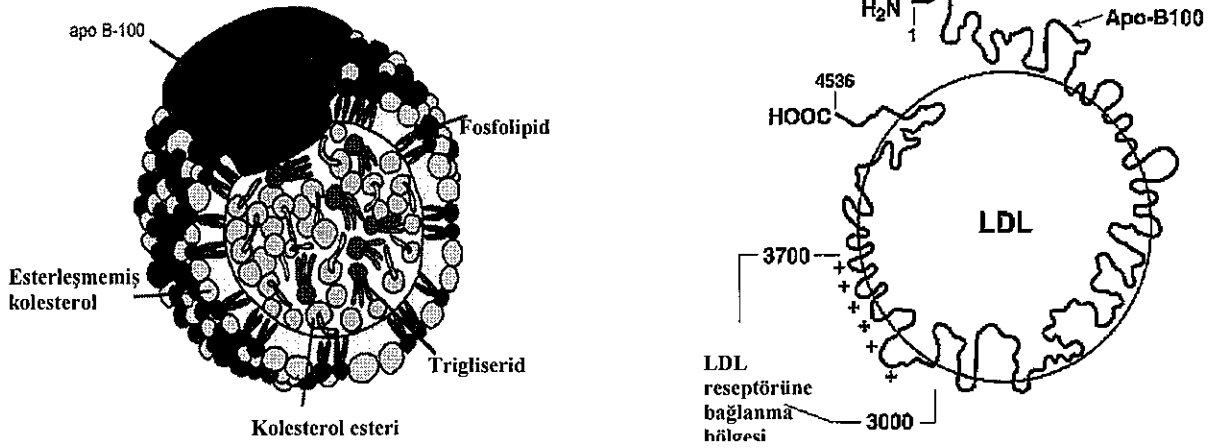
VLDL, trigliseritleri karaciğerden perifere taşır. VLDL' nin başlıca apoproteini B-100'dür, aynı zamanda apo C ve E de içerir. VLDL trigliseritlerini kaybedince IDL'ye dönüşür. IDL de ya karaciğere alınır, ya da LDL'ye transforme olur. Her iki transformasyon da trigliserit kaybı ve apo B-100 dışındaki tüm apoproteinlerin kaybı ile oluşur (139). Trigliseritlerin ayrılması, partikül boyutunu küçültürken dansiteyi artırır. Bu partiküllerin boyut ve şeklindeki değişme, yüzeylerindeki apoprotein konformasyonunu etkiler. Bu da dönüşümlü olarak bunların metabolizmasını etkiler. Örneğin diğerlerine göre büyük olan VLDL partikülünde apo B-100 ve apo E yüzeyde yoğundur ve reseptöre bağlanmamış durumdadırlar. VLDL artık partiküle dönüşmek için küçülünce (VLDL artığı ve IDL), apo E' nin LDL' ye bağlanabilecek konformasyona geldiği düşünülür. Artık partiküller de bu şekilde karaciğer tarafından alınabilir. Benzer biçimde IDL, LDL' ye dönüşürken LDL reseptörüne bağlanmayı sağlayan, apo B-100 konformasyonundaki değişmedir (140).

2.6.3. Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)

LDL, plazmanın kolesterol taşıyan lipoproteinidir. Total plazma kolesterolünün yaklaşık %70'i LDL' dedir. LDL' nin yaklaşık %70'i lipid (%35 kolesterol esteri, %10 serbest kolesterol, %10 trigliserit ve %20 fosfolipid) ve %25'i proteinden oluşmuştur. Apo B-100 bu partiküllerin temel proteinidir, eser miktarda apo-E bulunur. LDL' nin beta elektrik mobilitesi vardır, bu nedenle daha önceden beta lipoproteinler olarak adlandırılmışlardır (141).

LDL'ler, lipaz aracılıklı VLDL hidrolizinin son ürünleridir. Bunun yanı sıra, daha büyük VLDL partiküllerinin, trigliseritçe zengin merkezi uzaklaştırılmıştır. Yüzey lipidleri ve proteinleri yeniden şekillendirilmiştir ve yüzeyde bulunan fazlalıklar HDL' ye aktarılmıştır. Sonuçta oluşan, apo B-100 dışında tüm apolipoproteinlerden arındırılmış, kolesterolce zengin, küçük LDL partikülüdür (142).

LDL' nin yaklaşık %75'i hepatositlerce alınır. Diğer dokular daha az miktarda LDL alırlar. Alınan LDL' nin yaklaşık üçte ikisi LDL reseptörü aracılığıyla, kalan kısım ise reseptör dışı prosesler iledir. LDL aterosjenik olarak nitelendirilir (143).



Şekil 2.6.2. LDL' nin yapısı (142)

2.6.4. LDL' nin Oksidasyon Mekanizması (oksLDL)

Düşük dansiteli lipoproteinler (LDL), kolesterol ve diğer lipidleri, periferel hücelere dağıtmada önemli fizyolojik rol oynar. Oksidasyon sonrası, aterosklerotik lezyonların patogenezinde katılırlar. Okside LDL'ler (oxLDL) örneğin aktivasyon aracılıklı sinyalleri indükleyerek büyüme faktörlerinin, adezyon moleküllerinin ve doku faktörlerinin ekspresyonunu değiştirir, böylece bunların vasküler düz kas hücelerine mitojenik olmasına neden olarak monosit ve T-hücre migrasyonunu tetiklerler (144).

LDL oksidasyonu progresif bir işlemdir ve ilk olarak kısmen okside olmuş LDL' ler oluşur. Bunlar, az miktarda lipid peroksidasyon türevleri çok az apolipoprotein B (apoB) modifikasyonuna sahiptirler. Aşırı okside LDL' ler yüksek düzeyde lipid peroksidasyon ürünleri içerir ve aşırı apoB değişimi gösterirler. Aterosklerotik lezyonlarda bulunan hüceler (endotelial hüceler, düz kas hüceleri, makrofajlar, lenfositler) LDL oksidasyonuna aracılık edebilirler. LDL oksidasyonu, hücre serbest radikaller varlığında reaktif oksijen türleriyle, demir ve bakır gibi geçiş metalleriyle, tiyol bileşikleriyle, H_2O_2 /myeloperoksidaz/HClO ve tirozil radikalleriyle artırılabilir (145).

Bir çok çalışma LDL oksidasyonunun aterosklozisin başlamasında anahtar rol oynamaktadır. LDL hücre bulunmayan ortamda demir ve bakır gibi geçiş metalleriyle oksidatif olarak modifiye olabilir (146). LDL oksidasyonu için benzer mekanizmalar araştırılmaktadır. Çeşitli çalışmalar, süperoksit, myeloperoksidaz, 15-lipoksijenaz, peroksinitrit, ve tiyollerin farklı istemlerde LDL oksidasyonuna aracılık ettiğini öne sürmüşlerdir. Hem glukozun oto oksidasyonu hem de LDL glikasyonu LDL oksidasyonunu artırabilir. LDL' nin okside olabilirliliği büyüklüğüne de bağlıdır. Küçük, yoğun LDL' ye sahip deneklerde daha büyük LDL' ye sahip bireylere göre daha yüksek koroner arter hastalığı riskine sahiptir (145). Bir çok laboratuvar çalışmaları göstermiştir ki küçük, yoğun LDL, oksidasyona daha yatkındır (147).

LDL oksidasyonunun başlıca arteriyal intimada gerçekleşir. LDL' nin oksidasyonu serbest radikal aracılıklı bir prostestir ve poliansatüre yağ asitlerinin (PYA) peroksidatif modifikasyonunu içerir. LDL oksidasyonu, reaktif oksijen türlerinin poliansatüre yağ asitlerinin yüzeyindeki fosfolipidlerde bulunan çifte bağlardan hidrojen atomu koparmasıyla başlar. Ardından moleküler düzenleme ile konjuge dien olarak adlandırılan, konjuge çifte bağlar oluşur. Öncelikle, oksidasyon hızı oksidasyonun gerileme fazını oluşturan endojen antioksidanlar ile baskılanır. Gerileme fazını hızlı ilerleme fazı takip eder ki bu fazda bir başka poliansatüre yağ asitinden hidrojen koparılmasını gerektirir, sonuçta lipid peroksitleri oluşur. İlerleme fazını, dekompozisyon fazı takip eder. Burada çifte bağlar koparılarak hidroksinonenal, heksanal ve malondialdehit gibi aldehitler oluşur. Okside LDL' nin dikkati çeken bazı özellikleri şöyledir: serbest yağ asitlerindeki indirgenme, lipid peroksitlerinde artış, oksisterol miktarının artması, apolipoprotein B100 negatif yükünde artış, lizolesitin miktarında artış, apolipoprotein B100 parçalanmasında artış, LDL reseptörünce uptake' in azalması ve çöpçü reseptör mekanizmasıyla uptake' te artış (148).

Okside LDL' ler, ısı-şok proteinleri ve viral proteinler gibi spesifik antijenlerin varlığı ateroskleroz patogenezinin anlaşılmasında ışık tutucudur. Bu moleküller arasında oksLDLler son zamanlarda ilgi toplamıştır. Aslında , aterosklerotik plaklarda, monositler varlığında oksLDL leri tanıyan T-hücre kolonilerine rastlanmıştır. OksLDLlerin sıvısal immüneyi indüklediği bulunmuştur. OksLDL antiodilerinin bulunduğu hiperkolesterolemik tavşan modelinde ve aterosklerotik hastalarda gösterilmiştir (147).

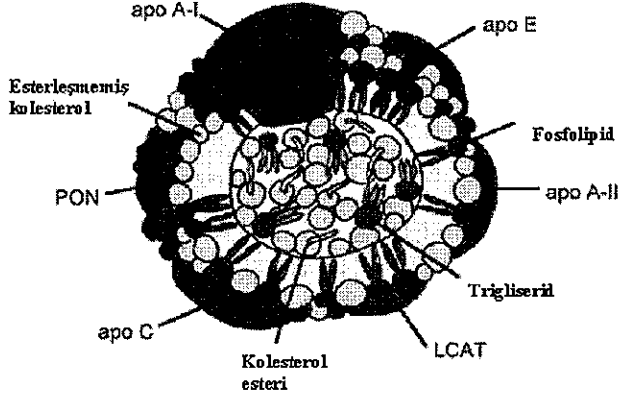
2.6.5. Yüksek Dansiteli Lipoprotein (HDL)

HDL küçük partiküldür. Büyüklüğü 70 ve 120 Å ve dansiteleri 1.063 ve 1.21 g/ml arasındadır. İki büyük alt sınıfı mevcuttur: HDL₂ (d = 1.063 ve 1.125 g/ml arası) ve HDL₃ (d = 1.125 ve 1.21 g/ml arası). HDL yaklaşık olarak %50 lipid, (%25 fosfolipid ve %15 kolesteril esteri, %5 serbest kolesterol, %5 trigliserid) ve %50 protein içerir. Başlıca apolipoproteinleri; apo A-I (%65), apo-AII (%25), ve daha az miktarda C apolipoproteinleri ve apo-E dir. HDL' nin temel bileşenlerinde apo-E yoktur ve bu nedenle, LDL reseptörüyle etkileşemez. HDL apo-E için rezervuar görevi görür. HDL alfa-elektroforetik mobiliteye sahiptir ve bu nedenle alfa lipoproteinler olarak adlandırılmıştır (149-151)

Yüksek HDL düzeylerine sahip hayvan modellerinde aterosklerotik yağ kalıntılarına karşı koruyucu etki saptanmıştır (152). Bilindiği gibi, HDL antiaterojeniktir. Çünkü, HDL periferel dokulardaki fazla kolesterolü karaciğere taşır. Bu işleme ters kolesterol transportu denir (153).

Bunun yanı sıra, son yıllarda yapılan çalışmalar HDL' nin aterosklerotik etkisinin kolesterol akışının yanı sıra, bir çok hücrenel prosesleri etkileyerek kardiyoprotektif olduğunu belirtir. HDL, E-selektin, vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve intrasellüler adezyon molekülü-1 gibi adezyon

moleküllerinin sitokin-aracılıklı ekspresyonunu inhibe eder. Bunun yanısıra, HDL LDL-aracılıklı monosit göçünü inhibe eder (154).



Şekil 2.6.3. HDL' nin yapısı (151).

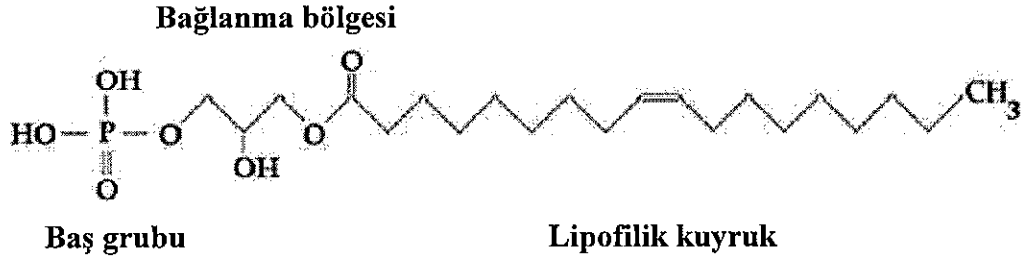
2.7. Lizofosfatidik Asit (LPA)

Hücre membranları, başlıca yağ asidi ve gliserolden yapılmış fosfolipidlerden meydana gelmişlerdir. Gliserol, hidrofilik fosfat gurubu ve lipofilik yağ asidi kuyruğuna bağlıdır. Bu sayede fosfolipidler amfipatik özellik kazanır, Örneğin, hem hidrofilik hem de hidrofobik bölgeye sahiptirler. İki tabakadan oluşan fosfolipidler sulu ortamda kuyruk kuyruğa birleşerek lipid çift tabakasını oluştururlar ki bu hücre membranının temel yapısıdır (155). Her ne kadar başlangıçta yalnızca hücre membranının temel taşlarını oluşturması biliniyorsa da, günümüzde önemli hücre sinyalizasyon molekülleri olarak görülmektedir (156) 1989'da van Corven ve arkadaşları (157) Lizofosfatidik asit (158) ve diğer fosfolipidlerin hücre membranının basit birer bileşeni olmadığını, bunun yanında biyolojik mediyatörler olduklarını kanıtlamışlardır. Biyolojik olarak aktif fosforik asit lipidlerinin keşfi 1949 da gerçekleşmiştir. 1978'de LPA biyolojik aktif bir bileşik olarak tanımlanmıştır. 1989'da LPA'nın büyüme faktörü özellikleri keşfedilmiştir ve 1996'da LPA reseptör genleri tanımlanmıştır (159). Lizofosfatidik asit (LPA; 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate), fosfolipid yapıdadır ve bir çok farklı fizyolojik olayda rol alır.

2.7.1. Lizofosfatidik Asit Biyokimyası

LPA, en basit gliserolipiddir. 3 alt yapı elemanına sahiptir. Fosfat baş gurubu, bağlanma bölgesi (gliserol) ve lipofilik kuyruk (yağ açil zinciri)(160). LPA doğal olarak (R) konfigürasyonda bulunur. Yağ açil zinciri değişebildiği için, LPA birçok farklı moleküler biçimde bulunabilir. Xie ve arkadaşlarına (161) göre, LPA terimi, tek bir kimyasal yapı yerine bir çok farklı lipid metabolit sınıfını kapsamaktadır. Gliserol omurgası üzerinde 1 ve 2 pozisyonunda konjuge yağ asitleri bulunabilir. Bunlara ek olarak, zincir, çeşitli kimyasal bağlarla gliserol omurgasına bağlanabilir. Gliserol omurgasına açil, alkil veya alkenil bağları 1- pozisyonundan bağlanabildiği gibi 2-pozisyonundan da açil bağı oluşturulabilir. LPA'nın bu farklı formlarının olma nedeni henüz bilinmemektedir. Zincirde açil bağı, 18 karbonlu yapı

ve tek çifte bağlı doymamış yapı deneylerde en sık kullanılan ve piyasada mevcut LPA formudur. Bu forma aynı zamanda oleil-LPA veya 18:1 LPA 'da denir. Bu LPA diğer uzun zincirli fosfolipidlere göre suda daha çok çözünür. Çünkü serbest hidroksil ve fosfata sahiptir (161, 162). Eğer aksi belirtilmemişse sözü edilen LPA formu genellikle bu formdur.



Şekil 2.7.1. Üç alt bölgeye sahip LPA kimyasal şekli: fosfat baş grubu, bağlanma bölgesi ve lipofilik kuyruk (163).

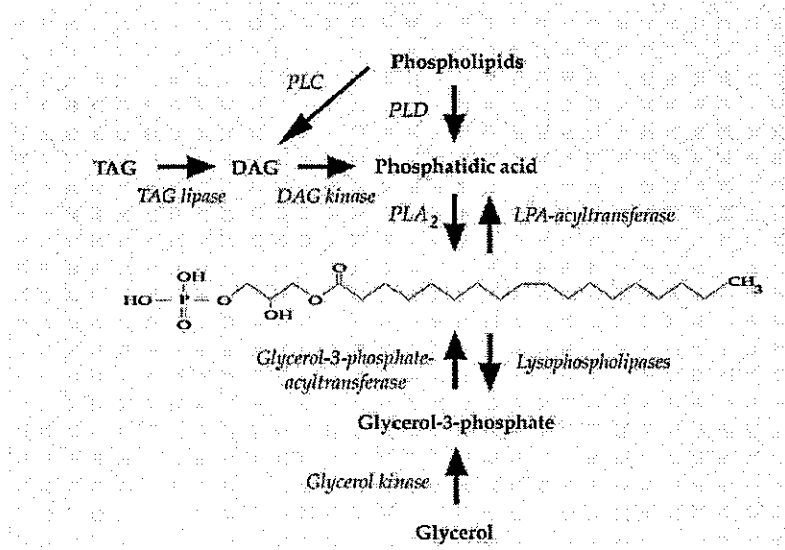
2.7.2. Lizofosfatidik Asit Üretimi, Salınımı ve Yıkımı

Reseptör bağımlı biyolojik cevapların indüklenmesi için LPA extrasellüler alanda kritik konsantrasyonlarda bulunmalıdır. LPA sentez, taşınma ve degradasyonundan sorumlu enzim ve proteinlerin kontrolü LPA'nın biyoyararlanımını etkiler. Şekil 2.7.2. de LPA sentez ve yıkımı için olası yollar gösterilmiştir. Kronolojik olarak; LPA ilk önceleri gliserofosfolipidlerin sitozolik biyosentezinde görevli aracı molekül olarak düşünülmüştür. Bir çok çalışma fosfatidik asitin (PA), fosfolipaz A (PLA) aracılığıyla degrade olması sonucu oluştuğunu gösterse de, biyolojik yollar henüz tam aydınlatılamamıştır. Bu yolk LPA üretimi için en basit yoldur çünkü fosfatidik asit (PA) aktive olmuş hücrelerde sıklıkla üretilir. Membranöz mikroveziküllerde zengin olan PA'nın serbest kalmasıyla LPA sentezinin başladığına inanılmaktadır(164). Fosfolipaz C (PLC) ve diaçil gliserol (DAG) kinaz etkileriyle PA oluşur . DAG'nin bir lipaz etkisiyle monoaçil gliserole (MAG) deaçile olduğu öne sürülmektedir, bu sayede daha ileri bir deaçilasyon veya fosforilasyona uğrayarak LPA oluşmaktadır (165). Plazma membranındaki fosfolipidlerin dağılımı değiştiğinde sekretuar non-pankreatik tip II PLA₂ (sPLA₂) etkisiyle gliserofosfolipidler degrade olabilmektedir. Fosfolipid dağılımındaki bu değişim plateletlerin aktivasyonuna, hücre yaşlanmasına veya apoptoza bağlı olabilir (164). Fosfolipidler plazma membranında iç tabakadan dış tabakaya doğru göç ederler. Bunların yanısıra, sPLA₂ normal fosfolipid dağılımı gösteren sağlıklı hücrelerde daha az aktiftir. Düşük miktarlardaki LPA, yine de tüm hücrelerde membran biyosenteziyle akla gelir (166). LPA sentezi için bir başka olasılık doğrudan fosfolipaz D (PLD) etkisiyle PA'ten sentezdir. Bakteriyal PLD hedef hücrelerinin dış membran tabakasında, lizofosfatidil kolinden LPA sentezlerler. Normal hücrelerde LPA oluşumu fiziksel karmaşa durumunda veya plazma membran reseptörlerinin ya da diğer yüzey proteinlerinin uyarılmasıyla başlar ve fosfolipazlar gibi kritik enzimler aktive olur. Bunların aksine tümör hücreleri kendiliğinden LPA sentezleyebilir. LPA'nın belirli hücre türlerinden (epitel hücreler, fibroblastlar, makrofajlar ve bazı tumor hücreleri) aktivasyona bağlı olarak

salındığı gösterilmiştir. Ama, fibroblastlarda çok az miktarda ekstrasellüler sıvıya salınmaktadır(167). Trombositler en iyi tanımlanmış LPA kaynağını oluştururlar(168). Hidrofilliğine bağlı olarak, LPA oluştuktan sonra membran üzerinde membrana bağlı olarak kalmak zorunda değildir (169).

Aktive olmuş trombositler belirli oranda ekstrasellüler LPA oluşturabilirler ki kandaki LPA'nın başlıca kaynağı bu yollardır. Serum LPA konsantrasyonu mikromolar düzeydedir. Eichholtz ve arkadaşlarının (170) çalışması Sano ve arkadaşları tarafından eleştirilmiştir ve LPA konsantrasyonunun kesin bir miktar tayini olmadığını belirtmiştir. Sano ve arkadaşları (171) trombositlerce üretilen LPA'nın çoğunluğunun trombositlerin dış kısmında meydana geldiğini öne sürmektedirler. Bu araştırmacılara göre, LPA'nın az bir miktarı trombositlerde oluşmaktadır. LPA üretiminin büyük bir kısmı membran ve serum fosfolipidlerinin PLA1, PLA2 ve lizofosfolipaz D (LysoPLD) aracılığıyla olmaktadır (171). LysoPLD, kolin türevi fosfolipid mediyatörlerini lipid fosfat türevi mediyatörlere dönüştürür. Böylece, lysoPLD, periferal dokulara LPA sağlayabilir.

Çok yakın bir zamana kadar lysoPLD'nin özellikleri saptanamamıştı. Fakat günümüzde lysoPLD ile ekspresyonu yaygın bir transmembran ektoenzimi olan ototaksin özdeş gibidir (172); Umezū-Goto ve arkadaşları, (173). LPA aynı zamanda hücre içinde gliserol-3-fosfattan, mitokondri ve endoplazmik retikulumda yerleşmiş olan gliserol-3-fosfat-açıl transferaz etkisiyle, açılasyon sonucuyla da meydana gelebilir (174). Yine de bu LPA'nın ekstrasellüler LPA'ya katkısı henüz bilinmemektedir.



Şekil 2.7.2.. LPA sentezi ve yıkımı için olası yollar (TAG=triacilgliserol) (175).

LPA hücre içindeki ve dışındaki lipid bağlayıcı proteinlere bağlanır ve taşınır. Proteinlere bağlanması serbest LPA konsantrasyonunu regule eder, böylece toksik düzeyler önlenmiş olur (176). Plazma LPA büyük ölçüde albumin ve lipoproteinlere bağlı olarak bulunur. Albumin, LPA için yüksek-kapasite ve düşük-

afiniteli bir depodur. Bu şekilde, hücre dışı serbest LPA havuzu bölgesel olarak veya dolaşımdaki kan aracılığıyla hücreleri aktive eder. Albumine bağlanmak suretiyle LPA, serum fosfolipazlarınca sindirilmekten kurtulmuş olur. Dolayısıyla, albumin kan dolaşımında LPA'yı taşır ve fizyolojik yarı ömrünü uzatır. Olası yıkım yolları arasında lizofosfolipaz aracılığıyla deaçilasyonu ve lizofosfataz ile defosforilasyonu sayılabilir. Bu enzimler, yeni potansiyel sinyal moleküllerini oluşturabilir. LPA, LPAaçıl transferaz ile PA'ya, fosfotidat fosfohidrolaz ile monoaçilgliserole ve lizofosfolipazlar ile gliserol-3- fosfata hızlı bir biçimde dönüşebilir (174).

2.7.3. LPA'nın Biyolojik Cevapları

Her ne kadar başlangıçta fosfolipid sentezi için aracı bir molekül olarak tarif edilmişse de, LPA günümüzde hücrelere uygulandığında çeşitli cevaplar uyandıran bir hücre dışı sinyalizasyon molekülüdür. İnsan epidermoid kanser hücrelerine 0.2 nM LPA uygulanması kısa süreli Ca^{+2} artışının %50'lik maksimal etkisine (EC_{50}) ulaşılmış, oysa rat fibroblastlarında mitogenez için gerekli EC_{50} değeri 10-15 μ M'dır (177). Aralığın bu biçimde geniş olmasının nedeni sinyalizasyonda farklı bir çok reseptör olmasından ve LPA'nın hücre aktivasyonundan önce yıkılmış olmasına bağlıdır. Bunlara ilaveten, prekürsörlerin düzeyleri, LPA üreten ve yıkan enzim aktiviteleri ve LPA bağlayıcı proteinlerin kapasitesi LPA konsantrasyonunu etkiler. Vücut sıvılarında ve hücre yüzeyinde aşırı LPA üretiminin olması istenmeyen durumlara neden olabilir (178). Yakın zamana kadar canlı hayvanlarda, LPA reseptörünün ve LPA sinyalizasyonunun fizyolojik kanıtı yoktu. Örneğin LPA1 geninin köpeklerde yok edilmesi sonucu %50 neonatal mortaliteye rastlanmıştır (179).

2.7.4. Kardiyovasküler sistemde LPA

Trombositler 2-4 μ metre çapındaki hücrelerdir ve kanda 10 gün dolaşırlar. Kemik iliğindeki megakaryositler trombositleri oluşturmak için trombosit ve sitoplazma parçalarını birleştirirler. Bu nedenle de bir çok granül içerirken, çekirdeksizdirler. Normal şartlarda dolaşımdaki kanın 1 mikrolitresinde 125.000-340.000 trombosit vardır. Damar duvarı hasara uğradığında trombositler, integrinler vasıtasıyla duvarda bulunan faktörlere bağlanır. Kollajene bağlanma sonucu trombositler aktive olur ve şekilleri değişir, granül içeriği boşalır ve diğer trombositlere agregasyon yaparlar. α -granüller, pıhtılaşma faktörleri ve trombosit kaynaklı büyüme faktörlerini içerirken, yoğun granüller ADP, ATP, Ca^{+2} ve serotonin içerir. Aktive olan trombositler serotonin ve tromboksan A_2 (TXA_2) gibi bileşikleri ortama bırakırken vasküler düz kas hücrelerinde (SMC) vazokonstrüksiyon yaparak kan kaybını önlerler. Düz kas hücreleri 30-200 μ metre uzunluğunda oval, çekirdeği merkezde bulunan ve nonregüler yapıda bir çok belirgin iplikçiğe sahiptir. Vasküler SMC'lerin proliferasyonu ateroskleroz, hipertansiyon ve kan damar duvarlarında kalınlaşmaya neden olabileceği için üzerinde yoğun çalışılan yapılardır (180).

2.7.5. Lizofosfatidik Asitin Yapı-Aktivite İlişkisi

LPA çalışmalarını kısıtlayan en büyük etken reseptör alt tiplerine spesifik antagonist ve agonistlerin olmamasıdır. LPA etkinliği, i.v. enjeksiyon sonrası farklı türlerdeki hidrokarbon zinciri uzunluğuna ve doymamışlığa bağlıdır. Yakın zamanda

yapılan bir çalışmada LPA'nın anyonik fosfat gurubu ve reseptörü arasında ilişki ileri sürülmüştür. ayrıca, LPA'da sn-2 hidroksilince sağlanan, fosfat gurubuna yakın dissosiye olabilen proton varlığı optimal aktivite için gereklidir. LPA'nın başında bulunan hidrofilik gurup, LPA reseptörünün üçüncü transmembran bölgesindeki amino ucu ile etkileşmektedir. Yine de, hidrofobik kuyruk ile reseptör proteinin hangi kısmının etkileştiği açık değildir. Ligandların hidrokarbon zincirindeki doymamışlık oranının etkinliğe katkısı azdır. LPA3 reseptörü doymamış LPA türevlerine daha seçici olarak bilinir. Bununla birlikte, myeloma hücrelerindeki DNA sentezi LPA ile inkübe edilmiş ve açıl zinciri uzadıkça ve doymamışlık arttıkça LPA'nın antiproliferatif etkisi artmıştır (181).

2.7.6. Lizofosfatidik Asitin Trombosit Aktivasyonuna Etkisi

Lizofosfatidik asit (LPA; 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate), fosfolipid yapıda olup bir çok farklı fizyolojik olayda rol alır (182). Bazı araştırmalar, LPA'nın potansiyel aterojenik ve trombojenik bir molekül olduğunu göstermiştir. İntravenöz LPA uygulanması sonucunda kedi ve tavşanda hipotansiyon, ratlarda ve kobaylarda hipertansiyon olduğu gösterilmiştir (183). Ateroskleroz, korneal yaralanma, akciğer hastalığı, over kanseri ve yara iyileşmesi gibi durumlarda, dokuları çevreleyen sıvılarda LPA konsantrasyonunun arttığı görülmüştür (184). Trombin gibi agregasyon faktörlerinin, trombositlerde LPA üretimini arttırdığı gösterilmiştir (175). Sağlıklı insanlarda taze ayrılan kan veya trombositce az plazma, çok düşük düzeyde LPA içerir. Bunun aksine, LPA serumda mikromolar düzeydedir. Aktive olmuş trombositlerden LPA salınması, serumdaki LPA'nın plazmadan daha yüksek olduğunu açıklamaktadır. LPA primer trombosit aktive edici bir lipiddir ve atherosklerotik plaklarda birikir. Trombositlere bağlanmak için LPA ile yarışa girecek inaktif LPA analoglarının sentezi ve kullanılması atheroskleroz tedavisinde kullanılabilir (185).

2.8. Protein Oksidasyonu

2.8.1. Protein Oksidasyonunun Tarihçesi

Protein oksidasyonu reaksiyonları ilk defa Swallow, Garrison ile Shuessler ve Schilling adlı araştırmacıların çalışmalarıyla aydınlatılmaya başlanmıştır (186, 187). Bu araştırmacılar protein oksidasyonuna yol açan ana mekanizmanın polipeptid omurgasındaki çeşitli amino asitlerin α -karbon atomlarından hidroksil radikalinin etkisiyle hidrojen atomunun çıkarılması sonucunda başladığını saptamışlardır. Protein oksidasyonu XX. yüzyılın ortalarından beri araştırılmış olmakla birlikte, bu reaksiyonların ürünlerinin in vivo oksidatif hasarın spesifik, genel marker'ları olarak kullanılması son yıllarda gerçekleşmiştir. Bunun nedeni, oluşan ürünlerin yapısının bilinmemesi ve bu ürünleri biyolojik materyalde saptayacak duyarlı metodların mevcut olmamasıdır. Protein oksidasyonunun protein karbonil (PCO) gibi marker'larının in vivo protein oksidasyonunun derecesini gösterecek bir araç olarak kullanılması ise nispeten daha uzun bir geçmişe dayanmaktadır (188).

2.8.2. Protein Oksidasyonu ve Ürünleri

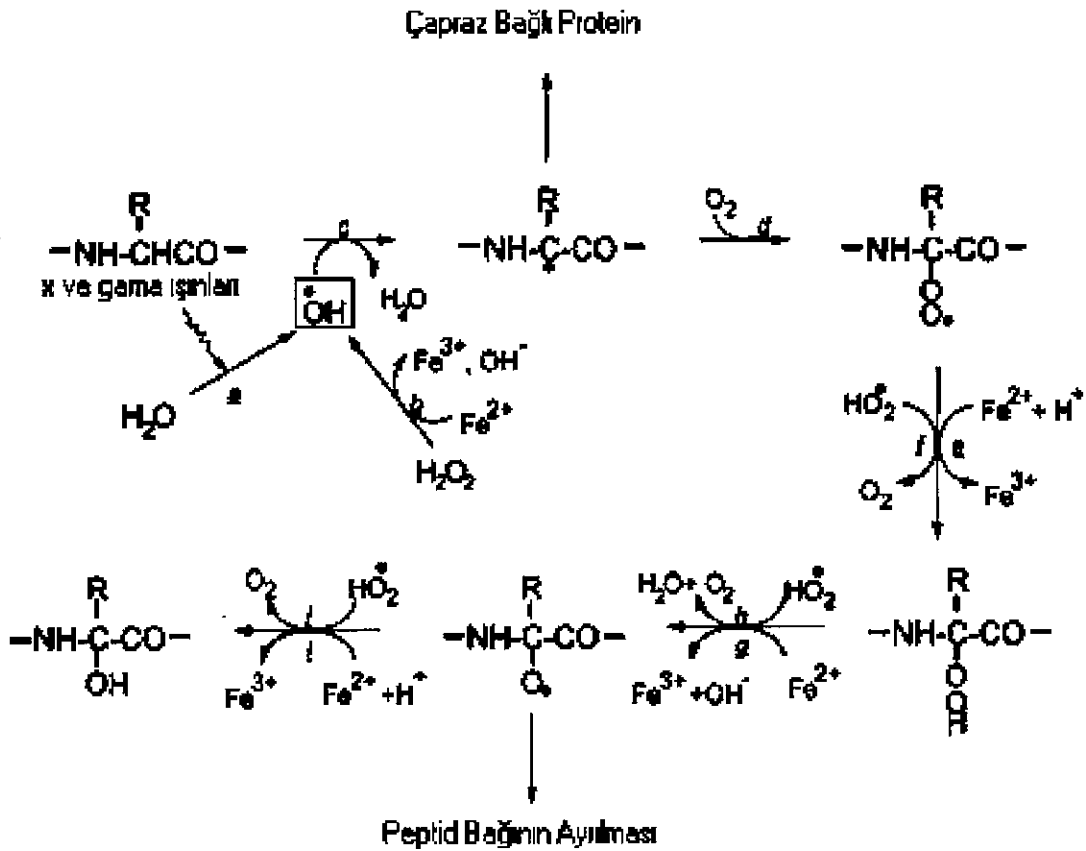
Protein oksidasyonu, proteinlerin reaktif oksijen türevleri veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu meydana gelir. Protein oksidasyonu,

hipoklorik asit (HOCl), hidroperoksit, peroksinitrit, hidroksi ve peroksi gibi reaktif oksijen türleri (ROS) varlığında, direkt ve indirekt yolla gerçekleşebilir. Protein oksidasyonunun biyokimyasal sonuçları enzim aktivitesindeki azalma, protein fonksiyonlarının kaybı, proteaz inhibitör aktivitenin kaybı, protein agregasyonu, proteolize artmış/azalmış yatkınlık, reseptör aracılı endositozun bozulması, gen transkripsiyonundaki değişimler, immünojen aktivitedeki artış olarak sıralanabilir. Reaktif türevler tarafından proteinlerin oksidatif modifikasyonu, bir dizi bozukluk ve hastalığın etyolojisi ile ilerlemesinde rol oynar (189).

Protein oksidasyon ürünleri arasında, protein karbonil bileşikleri (PCC); 3-nitrotirozin (3-NT), klorotirozin gibi yan zincir oksidasyon ürünleri; ditirozin ve protein ileri oksidasyon ürünleri (advanced oxidation protein products; AOPP) gibi çapraz bağlanma ürünleri sayılabilir. Bunların içerisinde, PCC ve AOPP, daha büyük protein fraksiyonlarını etkileyen global modifikasyon örnekleridir (190).

2.8.3. Protein Oksidasyonunun Mekanizmaları

Proteinlerde yapısal değişikliğe yol açan başlıca moleküler mekanizmalar, PCO oluşumu ile karakterize edilen metal katalizli protein oksidasyonu, protein tiyol (P-SH) gruplarının kaybı, nitrotirozin (NT) ve ileri oksidasyon protein ürünlerinin (AOPP) oluşumu olarak sıralanabilir (191).



Şekil 2.8.1. Protein karbonil oluşumuna yol açan modifikasyon reaksiyonları (188).

Protein oksidasyonu esas olarak hidroksil radikali (OH[·]) ile başlar. Diğer taraftan oksidasyon sürecinde O₂ ile birlikte, süperoksit anyon radikali (O₂^{·-}), ve süperoksit radikalinin protonlanmış formu olan hidroperoksil (HO₂[·])'in varlığı da gereklidir. Adı geçen bu reaktif oksijen türevleri amino asitlerin yan zincirlerinin oksidasyonuna, protein-protein çapraz bağlarının oluşumuna ve protein omurgasının oksidasyonu yolu ile protein fragmentasyonuna neden olur (190).

2.8.3.1 Protein Karbonil Bileşikleri (Karbonil Stres)

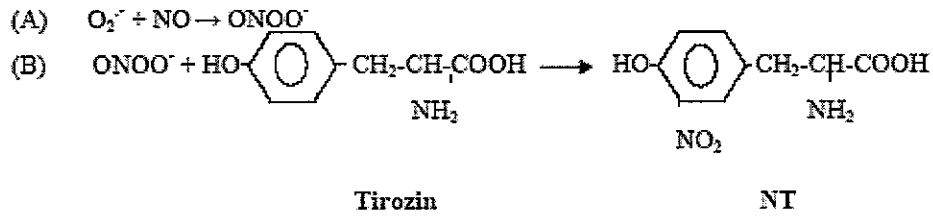
Oksidatif stresin erken aşamasında oluşan ve diğer stres parametrelerine göre, dolaşımda daha uzun süre ve sabit kalabilen protein karbonil bileşikleri, güvenilir bir marker olarak önerilmektedir (192, 193).

Protein yapısında bulunan prolil, lizil, arjinil ve treonil yan zincirlerinin oksidasyonu/peptid bağlarının oksidatif yıkımı ya da sisteinil, histidil, lizil nükleofilik yan zincirlerinin, lipid ya da karbonhidratlardan türeyen prekürsörler (reaktif karbonil bileşikleri-RCC) ile etkileşimi, protein üzerinde karbonil gruplarını oluşturabilir. Bu ikinci yol, protein üzerinde pentozidin gibi ileri glikasyon ürünleri (Advanced glycation end products-AGE) veya MDA-lizin, 4-HNE-protein gibi ileri lipoksidasyon ürünleri (Advanced lipoxidation end products-ALE) oluşumuyla sonuçlanır. Protein oksidasyonu için; peroksinitrit varlığında 3-NT ve HOCl varlığında 3-klorotirozin, sensitif ve spesifik marker olarak kabul edilmektedir (190, 194).

Myeloperoksidaz-HOCl-aracılı reaksiyonların oksidatif strese yol açan başlıca kaynak olduğunu desteklemektedir. Oksidatif strese maruz kalan başlıca protein, albümindir. Ayrıca, albümin gibi plazma proteinlerinin, aynı zamanda nötrofil aktivasyonunu başlatan proinflamatuvar mediyatörler oldukları ve inflamasyonun şiddetini arttırdıkları belirtilmiştir (193).

2.8.3.2. Nitrotirozin (NT) Oluşumu

NT oluşumu protein oksidasyonuna yol açan bir başka moleküler mekanizmadır. Peroksinitrit (ONOO⁻), nitrik oksidin (NO), O₂^{·-} ile in vivo reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir tüevdir. Süperoksit ve nitrik oksit radikallerinin peroksinitrite göre nispeten daha dayanıklı olmalarına karşılık, peroksinitrit daha reaktif bir tüevdir. Normal koşullarda, süperoksit dismutaz, oluşan tüm süperoksit radikallerini dismutasyona uğratmaya yetecek düzeydedir. Fakat, süperoksit düzeyleri çok artmışsa ya da fazla miktarda NO radikali meydana gelmişse peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit oluşumu, oksidatif protein hasarının hem ortaya çıkışına, hem de ilerlemesine sebep olmaktadır. ONOO⁻'in proteinler üzerine atılımının ana ürünü tirozinin orto pozisyonunda nitrolanmasıdır, bu da NT oluşumuna yol açar (191, 195).



Şekil 2.8.2. NT oluşum reaksiyonu (193)

2.8.3.3. Protein Hidroperoksit'lerinin Oluşumu

Proteinlerin moleküler oksijen varlığında, reaktif oksijen türleri ile etkileşimi sonucunda diğer proteinleri, DNA'yı, antioksidanları ve lipitleri hasara uğratabilecek protein hidroperoksitlerinin oluşumu, sırasıyla karbon merkezli protein radikali (Pr.) ve reaktif protein peroksil radikali (PrOO.) üzerinden meydana gelir. Protein hidroperoksitleri, geçiş metal iyonlarının varlığında bozunarak yeni serbest radikalleri oluşturur. Hücrel antioksidanlar ile reaksiyona girer, glutatyon redüktazı inaktive eder, DNA'ya çapraz bağlanır. Amino asit, peptit ve protein hidroperoksitler; glutatyon peroksidaz, glutatyon ve askorbat tarafından indirgenerek dayanıklı bir ürün olan ve protein oksidasyonunun marker'ı olarak kullanılan alkol türevlerini oluşturur (196).

2.8.3.4. Aminoasit Oksidasyon Ürünleri

Tablo 2.8.1. Oksidasyona yatkın olan amino asitler ve oksidasyon ürünleri (197)

Amino asit	Oksidasyon ürünleri
Sistein	Disülfidler, sisteik asit
Metionin	Metionin sülfoksit, metionin sülfon
Triptofan	2-,4-,5-,6- ve 7-Hidroksitriptofan, nitrotriptofan, kinürenin, formil ve hidroksi kinürenin
Fenilalanin	2,3-Dihidroksifenilalanin, 2-,3-, ve 4-hidroksifenilalanin
Tirozin	3,4-Dihidroksifenilalanin, tirozin-tirozin çapraz bağları, Tyr-O-Tyr, çapraz bağlı nitrotirozin
Histidin	2-Oksohistidin, asparagin, aspartik asit
Arginin	Glutamik semialdehit, 5-hidroksi-2-amino valerik asit
Lizin	Lizin hidroperoksitleri ve hidroksitleri, α -aminoadipik semialdehit
Glisin	Amino valerik asit
Prolin	2-Pirrolidon, 4- ve 5-hidroksiprolin, piroglutamik asit, glutamik semialdehit
Valin	Valin hidroperoksitleri ve hidroksitleri
Lösin	Lösin hidroperoksitleri ve hidroksitleri, α -ketoizokaproik asit, izovalerik asit ve aldehit
İzolösin	İzolösin hidroperoksitleri
Treonin	2-Amino-3-ketobütirik asit
Glutamik asid	Okzalik asit, pirüvik asit

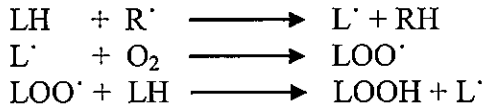
2.9. Lipid Peroksidasyonu Ürünleri

2.9.1. Lipid Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonu, poliansature lipidlerin oksidatif bozulması reaksiyonudur. Serbest radikaller çeşitli substratlar ile kimyasal reaksiyonlara girerler. Bu reaksiyon başlama, çoğalma ve sonlanma şeklinde üç basamakta gerçekleşir (198).

Başlangıç basamağı: Peroksidasyon, serbest radikallerin poliansature yağ asitlerinin yan zincirindeki metilen grubundan (-CH₂) bir hidrojen (H[•]) atomunu çıkarmasıyla başlar. Bu atak sonucu karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron olduğundan karbon merkezli bir radikal (L[•]) oluşur. Bu lipid radikalinin aerobik hücrelerde en sık görülen akıbeti, bu radikalın moleküler düzenlenme ile konjuge dien şekline çevrildikten sonra moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksill radikalini (LOO[•]) oluşturmasıdır.

Çoğalma basamağı: Oluşan peroksi radikali, diğer bir peroksi radikali ile birleşebilir ya da membran proteinleri ile etkileşebilir. Fakat en önemlisi peroksill radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Böylece yan zincirlerden hidrojen atomlarının çıkarılması ile her defasında lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve yeni peroksi radikali (LOO[•]) oluşmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zinciri lipid hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir.



Lipidhidroperoksitler de (LOOH) yıkılarak LO[•] ve LOO[•] gibi radikaller ve aldehitlerin (örn. Malonildialdehit = MDA gibi) oluşmasına neden olurlar. Lipidhidroperoksitlerin yıkılması ile oluşan bu aldehit de oldukça toksik ve biyolojik olarak aktif moleküllerdir. Örneğin MDA, membran komponentlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmalarına neden olmakta ve deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi gibi iç membranın bazı özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca diffüze olabildiğinden, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girerek, mutajenik ve karsinojenik etki gösterebilmektedir (199).

Sonlanma basamağı: Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleri ile oluşturduğu basit şelatları (Fe⁺²-ADP), hem, hemoglobin ve myoglobini de içeren bazı demir proteinleri, lipidperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır. Bozunma reaksiyonlarının sonucunda, pentan, etan gibi hidrokarbon gazları, ROOH, RCOOH, ROH ve RCHO grupları içeren kısa zincirli yağ asitlerinden oluşan kompleks meydana gelir (200).

Oksitatif stres çalışmalarında, organizmada serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için çeşitli biyolojik materyalde lipid peroksidasyonunun çeşitli ürünlerinin konsantrasyonları sıklıkla ölçülmektedir (199).

Serbest oksijen radikallerin başlattığı lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu sonucunda lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler oluşur. Lipid hidroperoksitleri (LOOH) ve konjuge dienler de daha sonra alkan aldehitler, alken aldehitler, hidroksialken aldehitler, malondialdehit (MDA) ve uçucu hidrokarbonlar oluşturmak üzere parçalanırlar (200, 201).

Serbest radikal üretimi artışının belirlenmesi için lipid hidroperoksitlerinin (LOOH), konjuge dienlerin, MDA dışındaki aldehitlerin, uçucu hidrokarbonların, lipid peroksidasyonu fluoresan ürünlerinin ve malondialdehit (MDA) ölçümü yapılabilir. Her bir tekniğin kendine göre zorlukları vardır ve hiçbir metodun lipid peroksidasyonunu tam bir doğrulukta ölçtüğü söylenemez. Ayrıca, oluşan ürünlerin miktarı çeşitli faktörlerden etkilenebildiğinden, tek ürün yerine birden fazla ürünü ölçmek idealdir (202, 203).

2.9.2. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), biyolojik sistemlerde serbest formda ve bir çok doku bileşenleri ile kompleks yapmış olarak bulunmaktadır. Metal katalizörleri varlığında amino asitlerin, kompleks karbonhidratların, pentozların ve heksozların oksidatif dekompozisyonlarının ürünleri arasında serbest radikal ürünü ve prostaglandin biyosentezinin yan ürünü olarak bulunmaktadır. Ancak, bu molekülün büyük bir kısmı üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonundan meydana gelir. Malondialdehit kanda ve idrarda ortaya çıkar, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü olmamakla beraber, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Bu nedenle biyolojik materyalde MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır.

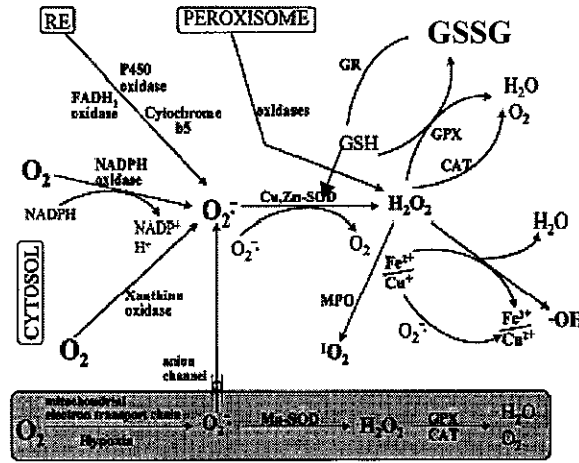
Ölçümü lipid peroksidasyonunun derecesinin belirlenmesi için en sık başvurulan testtir. MDA ölçümü en yaygın olarak tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemiyle yapılır. Bazı deneysel sistemlerde TBA yönteminin esas olarak MDA'nın kendisini ölçtüğü gösterilmiştir. Ancak, çoğu sistemde bu test MDA için spesifik olmadığından tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren maddelerin (TBARS) ölçümü şeklinde ifade edilir. Saf lipidlerle yapılan çalışmalar ve hayvanlar üzerinde yapılan denemeler, TBARS ölçümü ile lipid peroksidasyonunu ölçen diğer metotlar arasında iyi bir korelasyon olduğunu göstermiştir (204, 205).

TBARS ölçümü çok basit ve hızlı olmakla birlikte biyolojik materyallere uygulanmasında çeşitli problemler vardır. Numunede mevcut ya da reaksiyon sırasında açığa çıkan pigmentler kolorimetrik ölçümü interfere edebilirler. Ayrıca MDA dışındaki aldehitler de tiyobarbitürik asitle renkli kompleks oluşturmak üzere reaksiyona girebilirler (204).

Serbest MDA'nın direkt tayini en güvenilir şekilde yüksek performans likit kromatografisi (HPLC) yöntemiyle yapılır. HPLC çok hassas ve hızlı bir metottur ve az numune gerektirir. Fakat teknik çok dikkatli numune hazırlığı gerektirir (200, 206).

2.10. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Serbest oksijen radikallerinin organizmadaki düzeylerini arttırıcı etkenler olarak, özellikle "oksidatif stres yapıcı nedenler" 'in ve risk faktörlerinin iyi belirlenmesi ve bunlardan uzak durulması, ilk yapılması gereken girişim olmalıdır. Serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta birçok savunma mekanizmaları gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya "antioksidanlar" olarak bilinirler.



Şekil 2.9.4. Antioksidan savunma mekanizmaları (76).

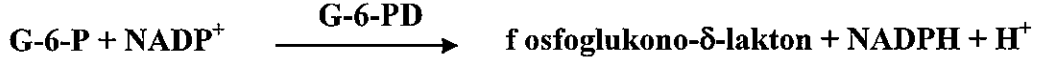
2.10.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmada antioksidan savunmanın önemli bir kısmını, süperoksit anyon radikali ve hidrojen peroksitin oluşmasını önleyen spesifik enzimler oluşturur. Bu enzimler süperoksit dismutaz (207), katalaz (158), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) 'dır.

2.10.2. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD)

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD) (D-glukoz-6-fosfat; NADP⁺ oksidoredüktaz, E.C. 1.1.1.49) pentoz fosfat metabolik yolunun ilk ve kontrol enzimidir. Warburg ve Christian tarafından, 1931 yılında ilk kez at eritrositlerinde tanımlanarak "Zwischenferment" olarak adlandırılan G-6-PD, 1936 yılında bira mayasından kısmi olarak saflaştırılmıştır. Bu çalışmadan 25 yıl sonra, yine bira mayasından daha saf bir halde elde edilen enzim, çeşitli mikroorganizma, bitki ve hayvan dokularından da saflaştırılarak, yapısal, katalitik ve düzenleyici özelliklerinin

tanımlanması için çalışmalar sürdürülmüştür. G-6-PD aktivitesinin 1931 yılında saptanmasından sonra, Fritz Lipmann, Frank Dickens, Bernard Horecker ve Efraim Racker, HMP şantını tanımlamışlardır. G-6-PD, HMP şantının ilk ve düzenleyici enzimidir ve aşağıdaki tepkimeyi katalizler (207).



G-6-PD ile katalizlenen reaksiyon termodinamik açıdan geri dönüşümlü olmasına rağmen, D-G-6-P oksidasyonunun ürünü olan D-glukonolaktonun hızlı bir şekilde hidroliziyle geri dönüşümsüz hale gelmektedir. Bu hidroliz pH bağımlıdır, pH 6.4 ve 28°C’de laktonun yarı ömrü 24 dakika, pH 7.4’te ise yaklaşık 1.5 dakikadır (208).

G-6-PD enziminin prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde dimerik, tetramerik, hekzamerik veya oligomerik yapı gösterdiği, bunların aynı tip monomerlerden oluştuğu gözlenmiştir. Monomerlerin aminoasit sıralarında türler arasında homoloji olmakla beraber, primer, sekonder ve tersiyer yapılar arasında farklılıklar vardır (209). Redükleyici ekivalanlara olan talebin artması, G-6-PD enziminin NADP+ ile saturasyonunu ve dolayısı ile G-6-PD’in intrasellüler aktivitesini artırır. Buna bağlı olarak HMP şantı da hızlanır. Hücrede oksidatif bir stresin oluşmasıyla NADP+/NADPH oranı değişir ve sırasıyla şu değişiklikler olur (210):

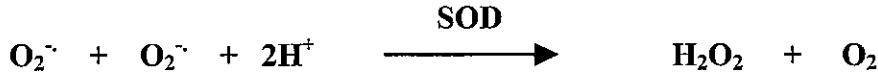
- NADP+ konsantrasyonu artar.
- NADPH’in inhibitör etkisi kalkar.
- Enzimin Vm değeri aniden yükselir.
- HMP şantına metabolik akım çok hızlanır.
- G-6-P konsantrasyonu azalır.
- Hekzokinaz uyarılarak daha fazla glukoz, G-6-P’a dönüşür.

Bu değişimler sonucu, glukozun heksoz monofosfat şantı üzerinden metabolizması artarak, NADPH hızla rejenere olur. Eritrosit için yeterli NADPH oluştuğunda, G-6-PD aktivitesi inhibe olur ve HMP şantı inaktif hale döner (209). Böylece G-6-PD, glukoz metabolizmasının HMP şantına yönelmesinde düzenleyici rol alarak, oksidan stres karşısında bu yola glukoz akımının artmasını sağlar (210).

G-6-PD aktivitesi beslenme, hormonlar ve özellikle NADPH konsantrasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Beslenmenin ve hormonların enzim üzerinde uzun süreli etkisi kaba kontrol, NADP+/NADPH oranı ile kontrol ise kısa süreli ince kontroldür. Ayrıca, “Epidermal Growth Factor” ve “Platelet Growth Factor” hormonları G-6-PD aktivitesini %25-27 oranında arttırmaktadır. Aynı şekilde “Nerve Growth Factor”ün G-6-PD, katalaz, glutasyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin sentezini uyararak hücreyi H₂O₂’ye karşı koruduğu düşünülmektedir (211).

2.10.3. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit dismutaz (SOD; süperoksit: süperoksit oksidoredüktaz, EC: 1.15.1.1), ilk kez 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmış ve süperoksit anyon radikalinin daha az reaktif olan hidrojen perokside dismutasyonunu katalize eden bir metaloenzimdir (212, 213).

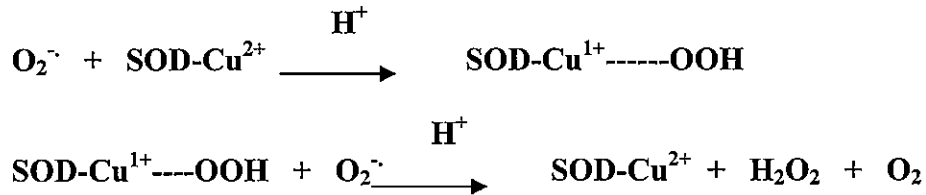


SOD, % 16.53 oranında azot, % 1.05 oranında kükürt ve az miktarda karbohidrat içermektedir. Yapısında az miktarda heksoz, heksozamin ve siyalik asit, fazla miktarda aspartik asit, glutamik asit ve glisin bulunur (214).

2.10.3.1. Bakır ve çinko içeren dismutaz(Cu, Zn-SOD)

Ökaryotik hücrelerin sitozolünde ve eritrositlerde bulunur. Bu enzim, mitokondri matriksi dışında, ökaryotik hücrenin her organelinde bulunan bir dismutazdır. Genel olarak hücrede en bol bulunan bir izoenzimdir ve 21. kromozomda lokalizedir. Bakır ve çinkonun rol aldığı bir dismutazdır. En yüksek katalitik etkiyi göstermektedirler. Dimerik yapıda olup, her biri bir bakır ve bir çinko atomu içeren, molekül ağırlığı 16 kDa olan, benzer iki alt üniteden oluşmaktadır. E.coli'den elde edilen yüksek protein konsantrasyonlarında, monomerik formuna da rastlanmıştır. Enzimin etkinliği için bakır mutlaka gerekli iken, kobalt, civa ve kadmiyum, çinkonun yerini alabilir. Dismutasyon, bakır ile süperoksit radikali arasındaki etkileşimle gerçekleşir (215).

Süperoksit anyonu, Cu^{2+} ve bir arjinin rezidüsünün guanido grubuna bağlanır. Bu bağlanma sonucunda, süperoksitten bir elektron Cu^{2+} ye transfer olurken, Cu^{1+} ve moleküler oksijen meydana gelir. İkinci bir süperoksit anyonu, Cu^{1+} 'den bir elektron ya da bağlanma ortağından iki proton alarak hidrojen peroksiti oluştururken, enzim tekrar Cu^{2+} formuna dönüşmüş olur. SOD'un fizyolojik fonksiyonu, oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit radikallerinin etkisinden korumak ve oluşan lipid peroksidasyonunu inhibe etmektir (216, 217).



2.10.3.2. Mn içeren dismutazlar (Mn-SOD):

Mn-SOD, prostetik grup olarak Mn içerir. Daha çok bakterilerde ve ökaryotik hücrelerin mitokondri matriksinde bulunur. Bakteriyel enzim eşit büyüklükte iki alt birimden oluşur. Her alt ünite bir Mn^{2+} atomu içerir. Molekül ağırlığı 40000 daltondur. Mitokondriyal enzim ise, molekül ağırlığı 80000 dalton olan bir tetramerdir. Enzim kloroform, etanol ve %2'lik sodyum dodesil sülfat tarafından inhibe olur. Siyanürün bu tip bir etkisi yoktur (218, 219).

2.10.3.3. Demir ve mangan içeren dismutazlar (Fe-SOD, Mn-SOD)

Bazı bakteriler birden fazla SOD içerirler. Bunlardan biri, bütün prokaryotlarda bulunan Mn-SOD olup, hücre sitoplazmasında bulunur. Bazı bakteriler (örneğin, E.Coli), periplazmik bölgelerinde demir içeren SOD (Fe-SOD) bulundurlar. Bu tip mikroorganizmalarda, matriks enziminin (Mn-SOD endojen süperoksit radikallerine karşı, demir içeren enzimin (Fe-SOD) ise çevreden gelen radikallere karşı koruyucu fonksiyon gördüğü tahmin edilmektedir (218, 219).

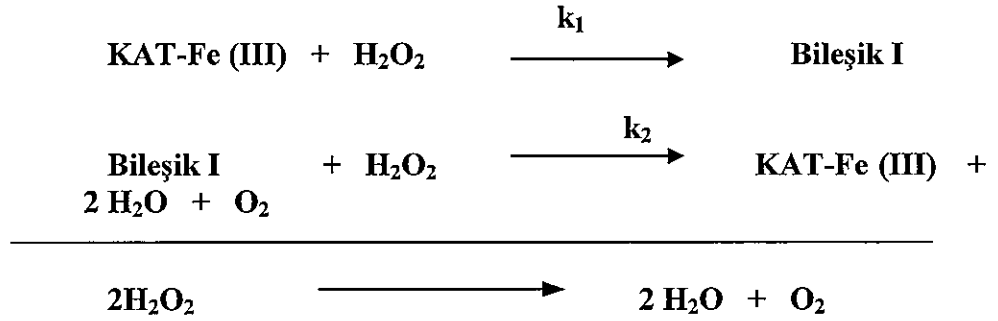
2.10.4. Katalaz (KAT)

Katalaz (KAT; hidrojen peroksit: hidrojen peroksit oksidoredüktaz, EC: 1.11.1.6), tetramerik yapıya sahip, molekül ağırlığı 240.000 dalton olan ve aktif merkezinde 4 tane "ferrihem" grubu ihtiva eden bir hemoproteindir (220, 221).

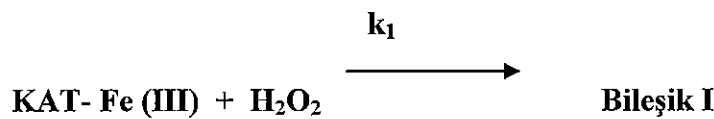
KAT eritrositte, kemik iliğinde, mukoz membranlarda, böbrek ve karaciğerde yoğun olarak bulunur. Ayrıca sıçan kalbinin mitokondri matriksinde de bulunmaktadır. Karaciğerdeki KAT aktivitesinin yüksek olması, oluşan peroksitlerin etkisiz hale getirilmelerine katkıda bulunur. Eritrositlerin metabolik hızlarının daha düşük olmasına rağmen, buradaki yüksek KAT aktivitesi, hemoglobin oksidasyonunun önlenmesi için gerekmektedir. Eritrositler, H_2O_2 'i su ve oksijene çeviren GSH-Px aktivitesine de sahiptir. Bu iki enzim birbirinin eksikliğini kompanse ettiği için, eritrositler oksidatif hasara karşı korunmaktadırlar (221).

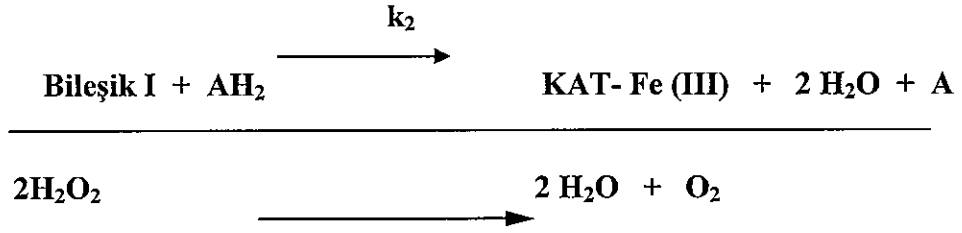
KAT, hücreleri H_2O_2 'nin zararlı etkilerinden korumak için, katalitik görevini iki değişik şekilde gerçekleştirmektedir:

1. Hidrojen peroksidin dismutasyonu (katalitik tepkime)



2. Alifatik alkollerin peroksidasyonu (peroksidatif tepkime)





AH₂ = Alifatik alkol

A = Aldehid

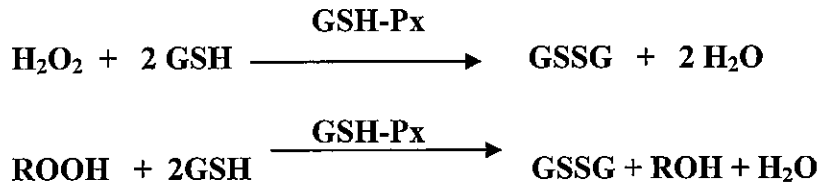
In vivo koşullarda KAT'ın peroksidaz aktivitesi daha baskındır (222).

KAT'ın inhibitörleri; asetat, ascorbat, azid, siyanid, siyanojenbromid, 2,4-diklorofenol, etanol, florid, format, hidroksilamin, metanol, monokloramin ve nitrittir (223).

2.10.5. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px; glutasyon; hidrojen peroksit oksidoredüktaz, EC: 1.11.1.9), 1957 yılında tanımlanmış bir enzimdir. Hidrojen peroksitin indirgenmesini sağlayan ve molekül ağırlığı 85 kDa olan tetramerik, 4 tane selenyum (Se) atomu içeren sitozolik bir enzimdir (224).

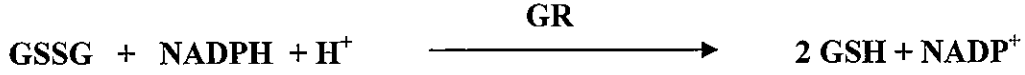
Glutasyon peroksidaz aşağıdaki reaksiyonları katalizler:



Glutasyon peroksidaz enziminin selenyuma bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere iki izomeri vardır: Selenyuma bağımlı olan izomerin aktif merkezinde enzime kovalent bağlı selenosistein formunda selenyum bulunmaktadır. Selenyuma bağımlı olan enzim, substrat olarak hem hidrojen peroksidi hem de organik peroksitleri kullanabilir. Buna karşılık, selenyumdan bağımsız formu sadece lipid hidroperoksitleri substrat olarak kullanabilir. Fosfolipid hidroperoksil glutasyon peroksidaz olarak da adlandırılan enzimin, bu formunun molekül ağırlığı 20.000 dalton olup, monomerik ve sitozolik bir enzimdir. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. Glutasyon peroksidaz'ın selenolat formu, peroksit substratını alkole indirgerken kendisi okside selenik asite dönüşür. Glutasyon, bu evrede reaksiyona katılarak selenosülfite oluşturur. İkinci bir glutasyonun selenosülfite bağlanması ile enzim, aktif formu olan selenolat formuna dönüşürken, okside glutasyon oluşur (224, 225).

2.10.6. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz (GR; Glutasyon; NADP⁺ oksidoredüktaz, EC: 1.6.4.2), okside glutasyonu (GSSG) β- nikotinamid adenin dinükleotide (NADPH) bağımlı olarak, redükte glutatyona katalizleyen bir flavoproteindir (226, 227).

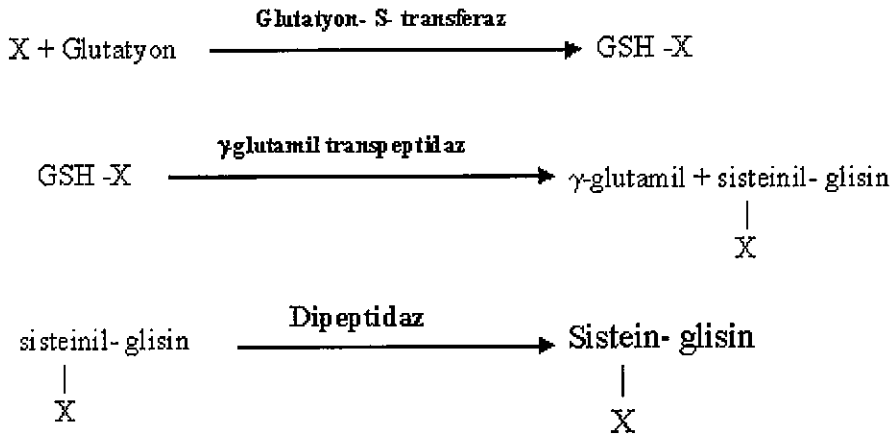


Flavoprotein oksidoredüktaz ailesinin bir üyesi olan ve çok sayıda farklı organizmadan elde edilen bu enzim, 50 kDa subüniteli ve homodimerik yapıda bulunmaktadır. Alt ünitelerde bulunan iki sistein rezidüsü arasında bir disülfid köprüsü kurulması sonucunda, okside glutasyon meydana gelir. Daha sonra bu molekül, pentoz fosfat yolundan sentezlenen NADPH + H⁺ varlığında glutasyon redüktaz ile redükte hale dönüşür. Her bir alt birim, N-terminalinden itibaren FAD bağlayıcı bölge, NADPH bağlayıcı bölge, merkezi bölge ve ara yüzey bölgesi olmak üzere 4 bölgeden oluşur. Enzimin aktif bölgesi dimerik ara yüzeyde bulunur. Sadece dimerik alt birimleri aktiflik gösterir (226, 228).

2.10.7. Glutasyon-S-Transferaz (GST)

Glutasyon-S-Transferaz, (GST, EC: 2.5.1.18. RX: glutathione-R-transferase), 47.000 Da ağırlığında olan dimerik bir enzimdir. İnsan hücrelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur (229).

Hücrel detoksifikasyon sisteminin başlıca bileşenidir. Çevresel kirleticilere, karsinojenlere, mutajenlere ve özellikle lipid peroksidasyonunun ürünlerine karşı detoksifikasyon işlemlerinde rol alır. Elektrofilik kimyasal ürünlere karşı koruyucu ajan olarak davranır (230).



Şekil 2.10.7.1. GST'nin detoksifikasyon işlemi. X, elektrofilik bir bileşik. (230)

GST birçok formda bulunur. En çok hücrelerin sitozol kısmından elde edilmiştir. Bu proteinler sitoplazmadan başka subsellüler kompartmanlarda da bulunmasına rağmen, genel olarak sitozolik veya çözünebilir GST olarak tanımlanmaktadır .

Sıçan karaciğer mikrozomlarından elde edilen GST'nin, glutatyon peroksidaz aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir. Sitozolden elde edilen GST, homodimer veya heterodimer olabilir. Moleküler ağırlığı 24.5 dalton ile 28.5 dalton arasındadır. GST'nin, α , μ , π , ve θ olmak üzere dört farklı izoenzimi vardır. GST α , karaciğerde yüksek oranda bulunur ve hepatosellüler hasarda kan dolaşımında konsantrasyonu artmaktadır .İnsan eritrositlerinde GST'nin glutatyon-S-transferaz ρ (GST ρ) ve glutatyon-S-transferaz σ (GST σ) olmak üzere iki farklı izoenzimi vardır .

2.10.8. Paraoksonaz-1 (PON1)

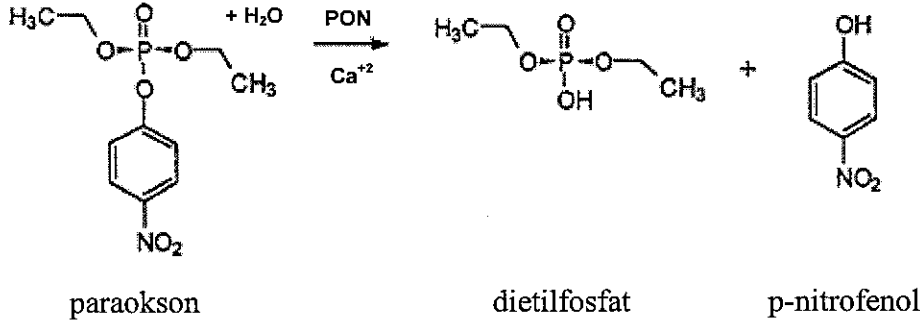
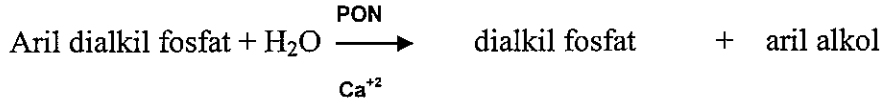
Paraoksonaz, ilk olarak 1953 yılında Aldridge W.N. (231) tarafından *p*-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir. 1965 yılında, Ooms A.J. ve Boter HL (232) tarafından , paratyon ve paraokson hidrolizindeki stereospesifikliği ile tanımlanmıştır. 1973'te bir grup Alman araştırmacı, ilk olarak insan serum paraoksonazını genetik olarak saptamıştır (233). Paraokson, metil paraokson ve klormetil paraoksona yüksek derecede seçicilik gösterdiği için, paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. 1985'lere kadar paraoksonazın nörotoksik olan organofosfatlar üzerine etkisi incelenmiş, saflaştırılması yapılmış ve detoksifikasyondaki rolü araştırılmıştır. 1985 yılında Mackness M.I. ve arkadaşları (234), ilk olarak HDL-ayırımı için santrifüj rotorunu geliştirirken, HDL-kolesterol ayırımı esnasında lipoprotein fraksiyonunda aril-esteraz aktivitesine rastlamışlardır (235). Farklı popülasyonlarda (fransız, sudanlı vs) polimorfizm analizleri yapılmış ve allelik formları belirlenmiştir. 1988 yılında Mackness ve arkadaşları (236), PON' un HDL üzerinde apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır. Sonraki yıllarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyonu ile ilişkisi araştırılmış ve enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir (237).

Paraoksonaz (PON) (EC 3.1.8.1.) 44 kDa ağırlığında ve glikoprotein yapısında olan, kalsiyum bağımlı bir esterazdır. Organofosfatların hidrolizini katalizler. Karaciğerde sentez edilir. Karaciğer, böbrek, bağırsak ve serumda HDL' ye bağlı, yaygın olarak bulunur. PON, paraokson gibi fosfonik ve fosfinik asit esterleri üzerine etki eder. Şelatör maddeler tarafından inhibe olur, aktivite için divalant katyonlara ihtiyaç duyar (234, 235).

PON' un Diğer İsimleri

Organofosfat hidrolaz; paraoksonaz; A-esteraz; organofosfat esteraz; esteraz B1; esteraz E4; paraokson esteraz; pirimifos-metilokson esteraz; OPA anhidraz; organofosforöz hidrolaz; fosfotriesteraz; paraokson hidrolaz; OF; organofosforöz asid anhidraz (237).

PON' un katalizlediği reaksiyon aşağıda görüldüğü gibidir ;



2.10.9. Lipid Peroksidasyon Zincir Reaksiyonlarını Kırın Antioksidanlar

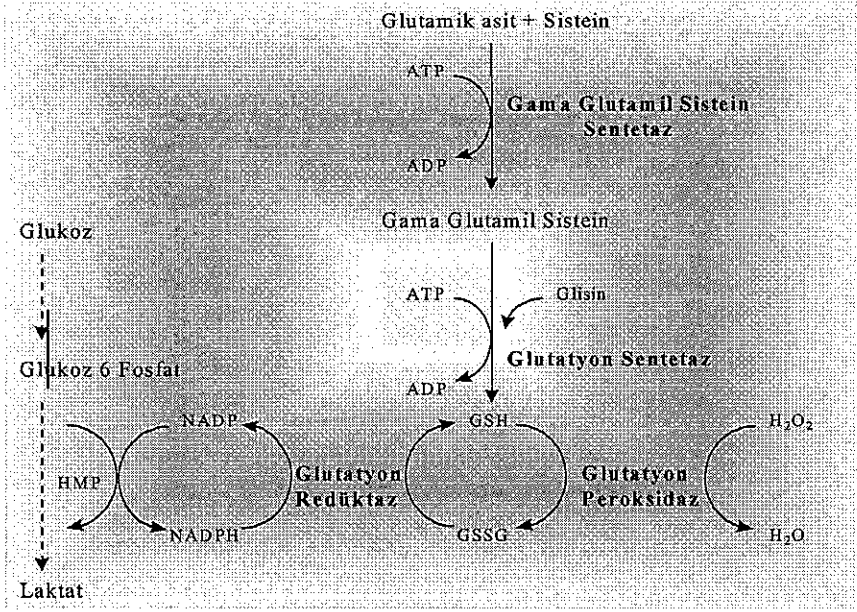
Bu gruba giren antioksidanlar, peroksi (ROO[•]) ve alkoksi (RO[•]) radikalleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonun ilerlemesini önlerler. Bu antioksidan savunma, enzimatik olmayan vitaminler tarafından sağlanır. Tiyoller ve redükte glutatyon (GSH) da non enzimatik antioksidan savunma sistemi grubu içerisinde yer almaktadırlar (238).

2.10.10. Tiyoller

Tiyol veya sülfidril bileşikleri, -SH grubu içerirler. Biyolojik tiyoller, sülfür metabolizması ürünleridirler. Tiyollerin kuvvetli oksidasyonları sonucu, sülfenik (RSOH), sülfirik (RSOOH) ve sülfonik (RSOOOH) asitler oluşur. Tiyollerin ilk oksidasyon basamağında disülfidler meydana gelir (RSSR). Biyolojik sistemlerde, tiyol ve disülfid arası oksidoredüksiyon tepkimeleri önemlidir. Tiyoller flavoproteinler, sitokromlar, askorbat, reaktif oksijen türleri, aminoasitler gibi hücre içi moleküllerle reaksiyon vererek, disüfidlere dönüşürler (239, 240). Hücre içinde bulunan GSH, düşük molekül ağırlıklı en önemli tiyoldür (241).

2.10.11. Redükte Glutatyon (GSH)

GSH, -SH grubu içeren nonprotein bir tiyoldür. Protein tiyollerinin indirgenmiş şeklinin sağlanmasını destekleyerek, doğrudan antioksidan etki gösterir. Bu önemli görevinden başka, membranlar boyunca aminoasit transportunda ve çeşitli detoksifikasyon olaylarında rolü vardır. Elektrofilik bileşiklerin konjugasyonunu ve H₂O₂ ile lipid hidroperoksid (ROOH)' lerin indirgenmesini sağlar. GSH eritrositte sürekli sentez edilmektedir. Önce, glutamik asit ve sisteinden γ -glutamil-sistein sentetaz yolu ile bir dipeptid oluşur. Daha sonra glutatyon sentetazın (GSH-S) katalizlediği reaksiyon sonucunda, bir tripeptit olan γ -glutamil-sisteinil-glisin, yani GSH oluşur (242).



Şekil 2. 10.1. Glutasyonun sentezi ve metabolizması (243).

GSH, hemoglobin ve diğer eritrosit proteinlerinin peroksidatif hasarına engel olarak, eritrositi zararlı etkilerden korur. GSH metabolik yolunda birçok enzim bulunmaktadır. GSH, hücre içinde -SH gruplarına disülfid köprüleri ile bağlıdır. Rat karaciğerinde total hücre içi GSH'ın %30'unun disülfid formunda bulunduğu bildirilmiştir. GSH'ın hemen hemen tamamı hücre içine yerleşmiştir. Serumda yok denecek kadar azdır. Normal şartlar altında hücrelerde GSH daha çok serbest formdadır. Sitozoldeki okside glutasyon (GSSG) miktarı çok azdır ve genellikle GSH miktarının %1-3'ünü oluşturur. GSH oksidatif strese karşı önemli bir role sahiptir. Organik hidroperoksitler, intrasellüler GSH'un okside forma dönüşmesiyle zararsız hale getirilirler. Yine glutasyon, fosfolipidlerde lokalize olmuş ROOH'ların yıkımını da sağlayabilir. GSH, dehidroaskorbatın askorbata indirgenmesini ve proteinlerin disülfid bağlarının indirgenmesini sağlayan -340 mV'luk bir redoks potansiyeline sahiptir. GSH, bir çok yolla antioksidan olarak davranabilmektedir. Kimyasal olarak singlet oksijen, süperoksit anyonu ve hidroksil radikalleri ile reaksiyona girebilir. Bu sayede serbest radikal tutucu olarak fonksiyon gösterir. GSH, lipid peroksidasyon reaksiyonları ile oluşmuş açıl peroksitleri ortamdan uzaklaştırarak membran stabilitesinin korunmasını sağlar (244, 245). GSH, dehidroaskorbat redüktaz enzimi ile birlikte çalışarak dehidroaskorbatların indirgenmesini sağlamanın yanında, non-enzimatik olarak da bu indirgenmeyi, pH:7'de ve GSH konsantrasyonunun 1 mM'dan yüksek olduğu durumlarda gerçekleştirebilmektedir (246).

2.11. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-trans-stilbene), biyokimyasal olarak stilben türevi bir stilbenoid'dir. Yağda çözünen bir polifenolik fitoaleksindir. Fitoaleksinler bitkinin dış streslere ve enfeksiyonlara (özellikle funguslara) karşı savunmasını sağlayan bileşiklerdir. Resveratrol, stilben sentaz tarafından p-kumaril KoA ve malonil KoA'dan sentezlenir. Saf hali sarı parlak bir toz görünümündedir. İlk defa

1974 yılında Quinquangulata'dan elde edilmiş olmasına rağmen, tıbbi ve biyolojik etkileri 1997 senesine kadar fark edilmeden kalmıştır. Koroner arter hastalığına karşı kırmızı şarabın koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (247). Bu etki, kırmızı şarabın antioksidan olmasından kaynaklanmaktadır (248).

Doğal bir hidroksistilben olan resveratrol, yetmiş yakın bitki türünde tespit edilmiştir. Üzüm (özellikle kabuğu ve bazı üzümelerde çekirdeği ve kabuğunda), asma, çam ağacı, Japon bambusu (Japanese knotweed; molekülün tıbbi ve deneysel amaçlarla endüstriyel üretimi için en sık kullanılan bitki türüdür), yerfıstığı, erik, şarap ve bazı küçük sulu taneli meyvelerde resveratrol olduğu bulunmuştur (249).

Resveratrol yağda çözünür. Yaralanma, mantar infeksiyonları, UV ışınına maruziyeti ve soğuk hava gibi doğal stresler resveratrol ve diğer biyolojik cevap düzenleyicilerin üretilmesine neden olur. Soğuk iklimlerde üretilen üzümelerde resveratrol ve diğer stilbenlerin miktarı daha yüksektir. Fermentasyon işlemi sırasında üzüm kabuğunun şaraba temas süresi resveratrol miktarını belirleyen önemli bir etkidir. Kırmızı şarap, üzümün kabuğuyla beraber fermente edildiği şarap türüdür. Sirkede ve üzüm suyunda da resveratrol, diğer stilbenler ve flavonoidler bulunur (250). Günlük yiyeceklerin içerdiği resveratrol miktarı değişkendir. Kırmızı şarap, beyaz şaraba göre daha yüksek miktarda resveratrol içerir. Bunun nedeni, beyaz şarabın üzümün kabukları alındıktan üretilen şarap türü olmasıdır. Üzüm kabuğuna temas süresinin artması şarabın resveratrol miktarını arttıran değişkenlerden biridir. Bir önemli değişken ise üzümün cinsidir. Misket üzümü, diğer üzüm ürünlerine göre çok fazla miktarda resveratrol içerir (251, 252).

Resveratrol molekülü cis trans izomerizmi gösterir ve biyolojik olarak aktif şekli trans-resveratrol'dür. Glukoz'a bağlanarak glukoside şeklini alabilir. Resveratrol-3-O-beta-glukozid, aynı zamanda pikeid olarak da adlandırılır. Trans-resveratrol UV ışınları, ısıtılma, oksijene maruz bırakılma etkisi ile isomerize, degrade ve okside olabilmekle beraber, aslında oda sıcaklığında normal atmosferik koşullarda meydana gelen oksidasyonun ihmal edilebilir düzeyde olduğu ifade edilmektedir (253).

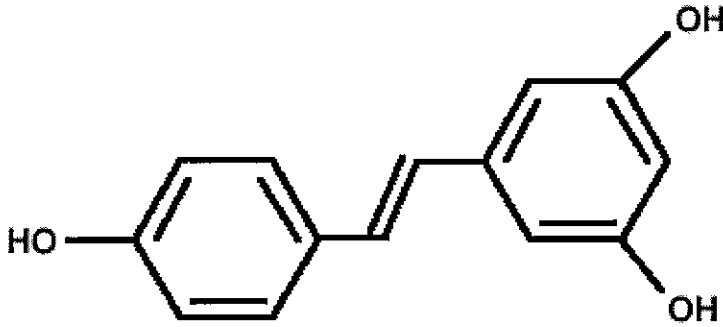
Fransızlarda koroner kalp hastalıklarının, diğer sanayileşmiş modern toplumlara göre önemli derecede daha az görülmesi fenomenini (Fransız çelişkisi = French paradox) açıklamak üzere 1992 yılında kırmızı şarapta bulunan resveratrol molekülünün ortaya atılması sonrası, bu konudaki literatür günümüze kadar şaşırtıcı derecede genişlemiştir (126).

Resveratrol'ün moleküler etki mekanizması ile ilgili son çalışmalar, resveratrol'ün human sirtuin 1 (SIRT1, silent mating type information regulation 2 homolog 1) enzimi'ne bağlanarak, enzimin kendisinde konformasyonel (adaptif) bir şekil değişikliği meydana getirdiğini ve enzimin substratına karşı olan ilgisini arttırdığını göstermişlerdir (254).

Oral yolla alınan molekül hızlı bir şekilde faz 2 konjugasyon'a (glukuronidasyon & sülfasyon) uğrar. İnsanda resveratrolün farmakokinetiği ayrıntılı bir şekilde çalışılmamıştır. Bunun yanısıra, rat çalışmaları vardır. Oral olarak alınan resveratrolün kan konsantrasyonu ilk dakikalarda (yarı ömrü 8 dk) hızlı bir düşüş göstermektedir. Belirlenebilen miktarlar, muhtemel enterohepatik resirkülasyon sebebiyle 12 saat sürmektedir (255).

In vivo çalışmalar, düşük dozlarda resveratrol alımının kalbi koruduğunu göstermiştir. Resveratrol vasküler hücre fonksiyonlarını düzenler, LDL oksidasyonunu inhibe eder, trombosit agregasyonunu baskılar ve iskemik reperfüzyon esnasında myokardiyal hasarı azaltır (256).

Resveratrol doğada üzüm kabuğunda bol bulunan ve bitkiyi fungal enfeksiyonlardan koruyan polifenol yapıda antioksidan bir maddedir (257). Fransız Paradoksu'nda temel koruyucu ajan olarak belirlenmesinin ardından, resveratrol ve iskemi ilişkisi daha ileri çalışmalar ile araştırılmıştır. Li-Man Hung ve arkadaşları (258) sol ana koroner arter oklüzyonu yapılan ratlarda resveratrolün enfarkt alanını ve reperfüzyon aritmilerini azalttığını göstermişlerdir. Bradamante ve arkadaşları (259) ise resveratrolün iskemi/reperfüzyon modellerinde farmakolojik "preconditioning" etkisi yarattığını vurgulamışlardır .



Şekil 2.11.1. Resveratrolün kimyasal yapısı (255)

İnsan trombositlerinin resveratrol (100 µM) ile 30 dakika inkübasyonu sonucu, peroksinitrit veya ara metabolitlerinin trombosit tiyol oksidasyonunu engellediği ve trombositlerdeki redoks dengesinin kontrolünden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Resveratrol etkin bir serbest radikal yakalayıcısı olup, ROS kaynaklı trombosit aktivasyonunu inhibe ederek trombosit agregasyonu ve tromboksan salınımını engeller (257, 260).

Birçok çalışma, fenolik yapıdaki fitokimyasalların serbest radikal yakalayıcısı olduğunu göstermiştir. Polifenolik yapıda güçlü bir antioksidan özelliğe sahip olan resveratrol, ilk olarak karaciğerde sülfat ve glukuronit konjugatlarına

çevrilir. Karaciğerdeki metabolizması resveratrolün biyolojik yararlanımını etkilemektedir (261).

MATERYALLER VE YÖNTEMLER

3.1. Materyaller

3.1.1. Deney hayvanları

Bu çalışmada, ağırlıkları 220-250 gram arasında olan 3 aylık olan 80 adet erkek Wistar sıçanları kullanıldı. Her kafeste 4 hayvan olacak şekilde muhafaza edilen sıçanlar, 12 saatlik karanlık- aydınlık periyotlarında, 22 ± 2 °C'de sıcaklık ve $\% 50 \pm 5$ nem içeren koşullarda ve musluk suyu ile beslendiler. Sıçanlar, her birinde 16'şar hayvan olmak üzere 5 gruba ayrıldılar. Deney süresince tüm grupların günlük yem ve su tüketimleri, ve vücut ağırlığında meydana gelen değişiklikler kaydedildi.

1. Kontrol grupları (K)

Bu grupta bulunan sıçanlar 2 ay boyunca normal yem ile beslendiler.

2. Kolesterol grubu (Kol)

Bu grupta bulunan sıçanlar, 2 ay 20 gün boyunca %5'lik kolesterolü diyet ile beslendiler.

3. Alkol grubu (A)

Bu grup, R grubunun kontrolüdür. Bu grupta bulunan sıçanlar, 2 ay boyunca normal yem ile beslendiler. 2 aylık sürenin bitiminden sonra, bu gruptaki hayvanlara 0.1 ml %50'lik etanol 20 gün süreyle intraperitoneal olarak verildi.

4. Resveratrol grubu (R)

Bu grupta bulunan sıçanlar, 2 ay boyunca normal yem ile beslendiler. 2 aylık sürenin sonunda, bu gruptaki hayvanlara 20 gün süreyle resveratrol (20 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak verildi. Trans-resveratrol %50'lik etanol içinde taze olarak hazırlandıktan sonra her sabah saat 10⁰⁰-11⁰⁰ arasında verildi.

5. Kolesterol + resveratrol grubu (Kol+R)

Bu grupta bulunan sıçanlar, 2 ay 20 gün boyunca %5 lik kolesterolle beslendiler. 2 aylık sürenin bitiminde, bu gruptaki hayvanlara 20 gün süreyle resveratrol (20 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak verildi. Trans-resveratrol %50'lik etanol içinde taze olarak hazırlandıktan sonra her sabah saat 10⁰⁰-11⁰⁰ arasında verildi.

Kolesterol ve Kol+R gruplarındaki sıçanlardan deneyin başında ve deney süresince kuyruk veninden kan alınarak hiperkolesterolemi oluşup oluşmadığına bakıldı. Kolesterol + resveratrol grubunda bulunan sıçanların hiperkolesterolemik

oldukları anlaşıldıktan sonra, 20 gün süreyle %50 lik etanol içinde taze hazırlanmış olan trans-resveratrol (20mg/kg/gün) intraperitoneal olarak verildi.

Sıçanlar, beslenme süresinin bitiminden itibaren 12 saat aç bırakıldılar. 12 saatlik açlığın bitiminde, eter anestezisi altında doku ve kan örnekleri alındı. EDTA'lı tüplere alınan tam kandan trombosit parametrelerinin ölçümü için 0.2 ml ayrıldı. Geri kalan kan numuneleri 3000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Dokular soğuk serum fizyolojikle birkaç kez yıkandıktan sonra, deneyler yapılmaya kadar -80 °C'de saklandılar. Düz biyokimya tüplerine alınan kan örneklerinden elde edilen serum numuneleri, serum parametrelerinin ölçümü için kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Trombositlerde Ölçülen Parametreler

3.2.1.1. CD41 Tayini

CD41 antikorunu ile trombositlerin varlığının gösterilmesi, flow sitometri kullanılarak yapıldı.

3.2.1.2. CD40-CD40L Ekspresyonu

CD40-CD40L ekspresyonu, flow sitometride boya işaretli uygun antikorlar kullanılarak belirlendi.

3.2.1.3. P-selektin Ekspresyonu

P-selektin ekspresyonu, flow sitometride boya işaretli uygun antikorlar kullanılarak belirlendi.

3.2.1.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) tayini

ROS, Flow sitometride 5-(ve-6)-klorometil-2',7'- diklorodihidro floresein diasetat, asetil ester (CM-H2DCFDA) yardımıyla ölçüldü.

Flow sitometri ile yapılan analizler için tam kan kullanıldı. Kan örnekleri, hayvanlardan alındıktan sonra en geç 20 dakika içinde flow sitometride analiz yapılması için kullanıldılar. Tüplere 5 µl kan örneği konulduktan sonra, üzerine 50 µl HEPES tamponu (0,145 mol/L NaCl, 5 x 10⁻³ mol/L KCl, 1 x 10⁻³ mol/L MgSO₄, 0,01 mol/L HEPES , PH 7,4) ve 5 µl monoklonal antikor (anti- CD40, anti- CD41, anti- CD40L, negatif izotipik kontrol) konuldu. Örnekler 15 dakika oda ısısında karanlıkta inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon sonrasında, 0.5 ml % 2 lik formalin salin konularak örnekler dilüe ve fikse edildiler.

Örnekler hazırlandıktan sonra, analizler flow sitometri cihazı (Becton Dickinson (FACS caliber)) kullanılarak yapıldı. Parçalanmış hücre artıkları ve elektronik kirlilik, ön saçınım üzerinden ayarlama yapılarak uzaklaştırıldı. Trombositler kapılandıktan sonra, ilgili antikorun ekspresyonunu saptamak için analiz bölgesindeki partiküllerden negatif izotipik kontrolün floresanından daha

yogun floresan gösteren bölgeler belirlendi. Analiz yapılırken hedef hücrelerin tüm populasyondaki yüzdesi ve ortalama floresan yoğunluğu ayrı ayrı değerlendirildi. Analizle CellQuest yazılımı ile gerçekleştirildi.

3.2.2. Plazmada Ölçülen Parametreler

3.2.2.1. sCD40 tayini

sCD40, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kiti (Bender Medsystems, Kat. No:BMS265) kullanılarak ölçüldü.

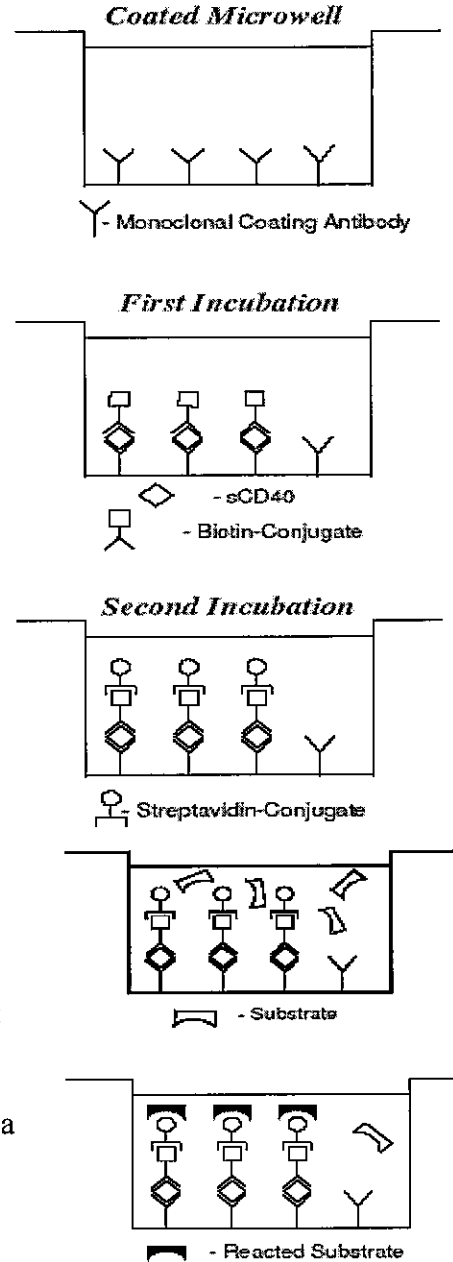
Prensip

Anti-sCD40 monoklonal antikorunu kuyucuklara adsorbe ettirilmiştir.

Plazmada veya standartta bulunan sCD40 kuyucuklara adsorbe edilmiş antikorlarla tutulur. Biotin bağlanmış monoklonal anti-sCD40 antikorunun ortama eklenmesiyle yakalanmış olan sCD40'lara bağlanır.

İnkübasyonu takiben, yıkama işlemleri sayesinde bağlanmamış biyotin-bağlı anti-sCD40 uzaklaştırılır. Streptavidin-HRP ortama eklenir ve biyotin-anti-sCD40 konjugatına bağlanır. İnkübasyonu takiben bağlanmamış streptavidin-HRP yıkama işlemi sırasında uzaklaştırılır ve kuyucuklara HRP ile reaktif hale geçen TMB substratı eklenir.

Plazmada bulunan sCD40 miktarıyla doğru orantılı olarak renkli ürün oluşur. Ortama asit eklenerek reaksiyon durdurulur ve renkli ürünün 450 nm dalga boyundaki absorbansı okunur. Hazırlanan standart grafiği yardımıyla serum sCD40 miktarı ölçüldü.



Ayrıçalar

1. Anti-sCD40 monoklonal antikorunu ile kaplanmış 96 kuyucuklu ELISA plate
2. Biotin bağlanmış anti-sCD40 monoklonal antikorunu
3. SCD40 standartı

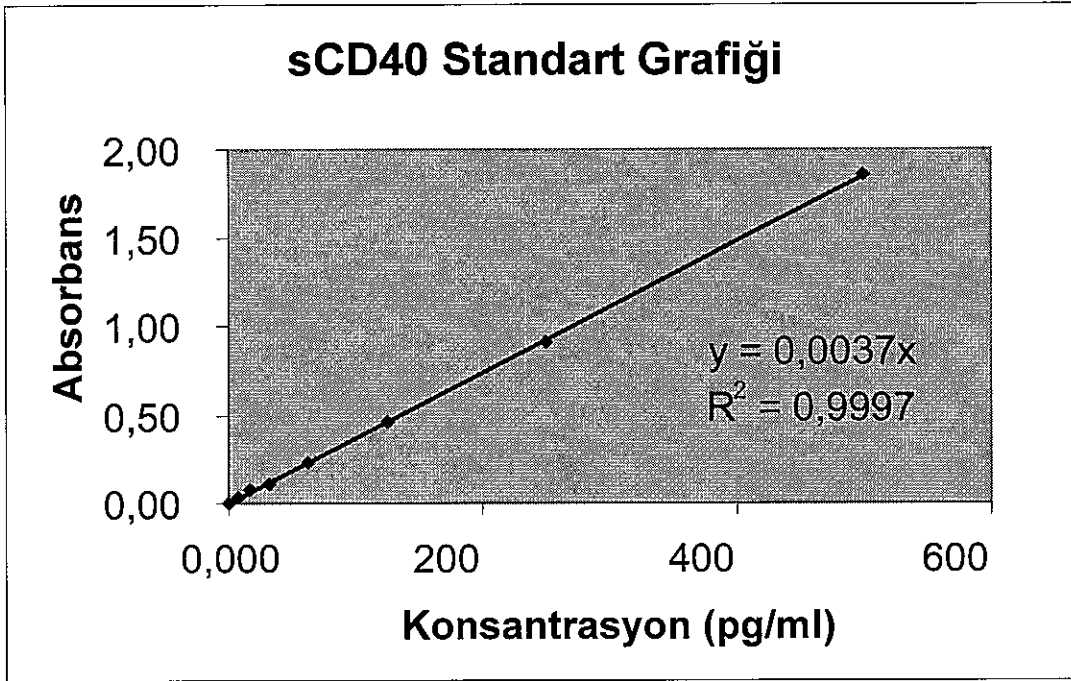
4. Streptavidin-HRP
5. Dilüsyon tamponu
6. Yıkama tamponu
7. Deney tamponu
8. Pozitif kontrol
9. Negatif kontrol
10. TMB substratı
11. Hidrojen peroksit (% 0.02)
12. Stop çözeltisi (1M fosforik asit)

Yöntem

Her kuyucuğa konulacak plazma örneklerine numara verilerek deneye başlamadan önce laboratuvar defterine kaydedildi. Kuyucuklar 300 µl yıkama tamponuyla 2 defa yıkandı. Yıkama işlemi sırasında kuyucuğun içlerinin çizilmemesine özen gösterildi. Temiz bir süzgeç kâğıdı üzerinde ters çevrilen plate içeriği tamamen boşaltıldı. Hazırlanan standart dilüsyonlarından 100 µl, numune kuyucuklarına 50 µl plazmalardan ve 50 µl dilüsyon tamponu eklendi ve kör kuyucuğuna sadece 100 µl dilüsyon tamponu eklendi. Biotin-konjugatı kitte belirtildiği üzere taze olarak hazırlandı ve her kuyucuğa 50 µl eklendi. Plate üzeri kapatılarak 2 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra kuyucuklar ters çevrilerek içeriği boşaltıldı. Kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu konularak 3 defa yıkandı. Temiz bir süzgeç kâğıdı üzerinde ters çevrilen plate içeriği tamamen boşaltıldı. 100 µl seyreltilmiş Streptavidin-HRP konjugatından her kuyucuğa ilave edildi, plate üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra kuyucuklar 3 defa 300 µl yıkama tamponuyla yıkandı. Temiz bir süzgeç kâğıdı üzerinde ters çevrilen petrinin içeriği tamamen boşaltıldı. Tüm kuyucuklara TMB substrat çözeltisinden 100 µl eklendi ve plak üzeri kapatılarak 10 dakika karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. Stop solüsyonundan 100 µl eklendi ve 450 nmdeki absorbanslar (referans dalga boyu olarak 620 nm alındı) okundu. Kör kuyucuklarının absorbansı sıfır kabul edilerek serum ve sCD40 konsantrasyonları, standart grafikten pg/ml biçiminde hesaplandı.

Standart Hazırlanması

Standart kuyucuklarına 100 µl dilüsyon tamponu ilave edildikten sonra sCD40 standartından 100 µl konarak aşağıdaki grafikte gösterildiği gibi 8, 16, 32, 63, 125, 250 ve 500 pg/ml'lik standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar numune gibi çalışılarak absorbansları okundu ve absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.1.1. sCD40 standart grafiği

Hesaplama

sCD40 konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.2.2. Interleukin-6 (IL-6) tayini

IL-6 konsantrasyonları, ELISA kiti (Biosource, Kat. No:KRC0061) kullanılarak ölçüldü.

Prensip

Daha önceden 96 kuyucuklara emdirilmiş anti-IL-6 monoklonal antikorlu plazmada veya standartta bulunan IL-6 ile bağlanır. Biyotin bağlanmış monoklonal anti-IL-6 antikorunun ortama eklenmesiyle yakalanmış olan IL-6'lara bağlanır. Streptavidin-HRP ortama eklenir ve biyotin-anti-IL-6 konjugatına bağlanır. Daha sonra kuyucuklara HRP ile reaktif hale geçen TMB substratı eklenir. Plazmada bulunan IL-6 miktarıyla doğru orantılı olarak renkli ürün oluşur. Ortama asit eklenerek reaksiyon durdurulur ve renkli ürünün 450 nm dalga boyundaki absorbansı okunur. Hazırlanan standart grafiği yardımıyla plazma IL-6 miktarı ölçülür.

Ayırıcılar

1. Anti-IL-6 monoklonal antikorlu ile kaplanmış 96 kuyucuklu ELISA plak
2. Biyotin bağlı anti-IL-6 monoklonal antikorlu
3. IL-6 standardı (18 ng)
4. Streptavidin-HRP
5. Dilüsyon tamponları

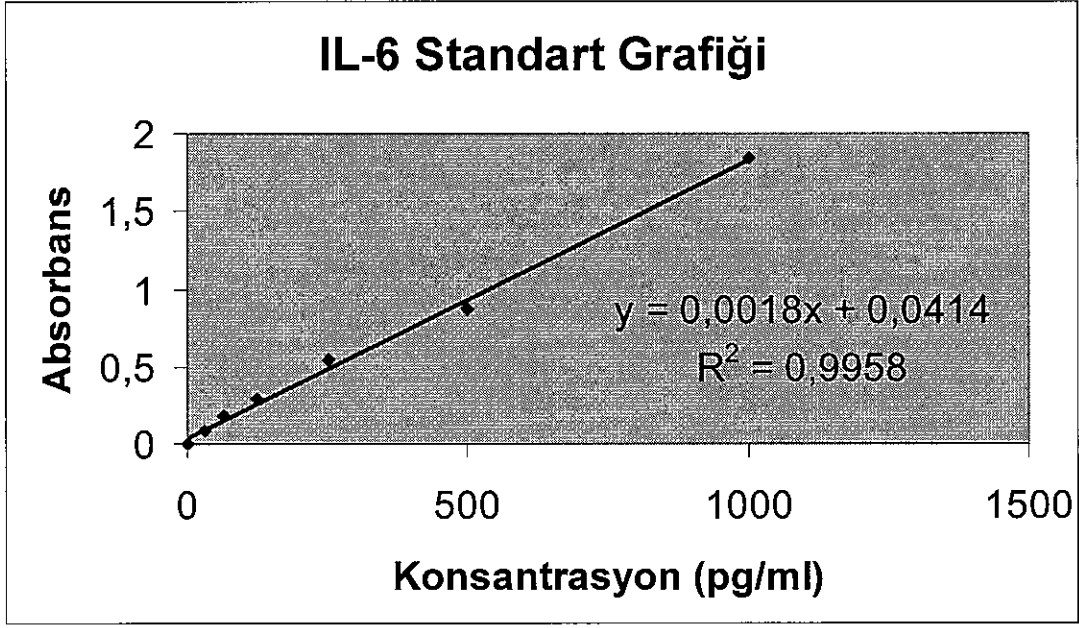
6. Yıkama tamponu
7. Deney tamponu
8. Yüksek konsantrasyonlu kontrol
9. Düşük konsantrasyonlu kontrol
10. Stabilize kromojen
11. Stop çözeltisi

Yöntem

Standart kuyucuklarına 100 µl standart, numune kuyucuklarına 50 µl plazmalardan ve 50 µl dilüsyon tamponundan eklendi. Kör kuyucuğuna sadece 100 µl dilüsyon tamponu eklendi. Plak üzeri kapatılarak 2 saat 37°C'de inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra, kuyucuklar ters çevrilerek içeriği boşaltıldı. Kuyucuklara yıkama tamponu konularak 4 defa yıkandı. Plak temiz bir süzgeç kâğıdı üzerinde ters çevrildi ve plak içeriği tamamen boşaltıldı. Antijen-spesifik biyotin-konjugatından her kuyucuğa 100 µl eklendi. Plak üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra, kuyucuklar 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı. Seyreltilmiş streptavidin-HRP konjugatından 100 µl her kuyucuğa ilave edildi. Plak üzeri kapatılarak 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra, kuyucuklar 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı. Tüm kuyucuklara stabilize kromojenden 100 µl eklendi ve plak üzeri kapatılarak 30 dakika oda ısısında ve karanlık bir yerde inkübe edildi. Her kuyucuğa stop solüsyonundan 100 µl eklendi ve 450 nmdeki absorbanslar okundu. Kör kuyucuklarının absorbansına göre, plazma ve standartların IL-6 düzeyleri, pg/ml olarak hesaplandı.

Standart Hazırlanması

18 ng toz IL-6 standardı 1.8 ml standart çözücü tamponunda çözüldü ve 10.000 pg/ml konsantrasyonda stok hazırlandı. Ependorf tüplerinde 31.2, 62.5, 125, 250, 500 ve 1000 pg/ml'lik standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar kit prospektüsünde belirtildiği gibi çalışılarak absorbansları okundu ve absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.1.2. IL-6 standart grafiği

Hesaplama

Standart grafiği kullanılarak IL-6 konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.2.3. Platelet faktör 4 (PF4) tayini

PF4 tayini kit (American Diagnostica, Kat.No:634) kullanılarak yapıldı.

Prensip

Plazma örneklerinde bulunan PF4, daha önceden 96 kuyucuklu plak iç yüzeyine emdirilmiş tavşan poliklonal antikorun F(ab')₂ kısmına bağlanır. Ortama eklenen HRP konjuge poliklonal anti-PF4 antikoru ile kuyucuklarda tutulmuş halde olan PF4'ler bağlanır. Daha sonra kuyucuklara hidrojen peroksit ile reaktif hale geçen TMB substratı eklenir. Enzimatik reaksiyonları takiben plazmada bulunan PF4 miktarıyla doğru orantılı olarak renkli ürün oluşur. Ortama asit eklenerek reaksiyon durdurulur ve sarı renkli ürünün absorbansı 450 nm dalga boyunda okunur. Hazırlanan standart grafiği yardımıyla plazma PF4 miktarı belirlenir.

Ayırıcılar

1. Anti-PF4 monoklonal antikoru ile kaplanmış 96 kuyucuklu ELISA plak
2. PF4 standartı dilüsyon tamponu
3. Yüksek konsantrasyonlu PF4 kontrol plazması
4. Düşük konsantrasyonlu PF4 kontrol plazması

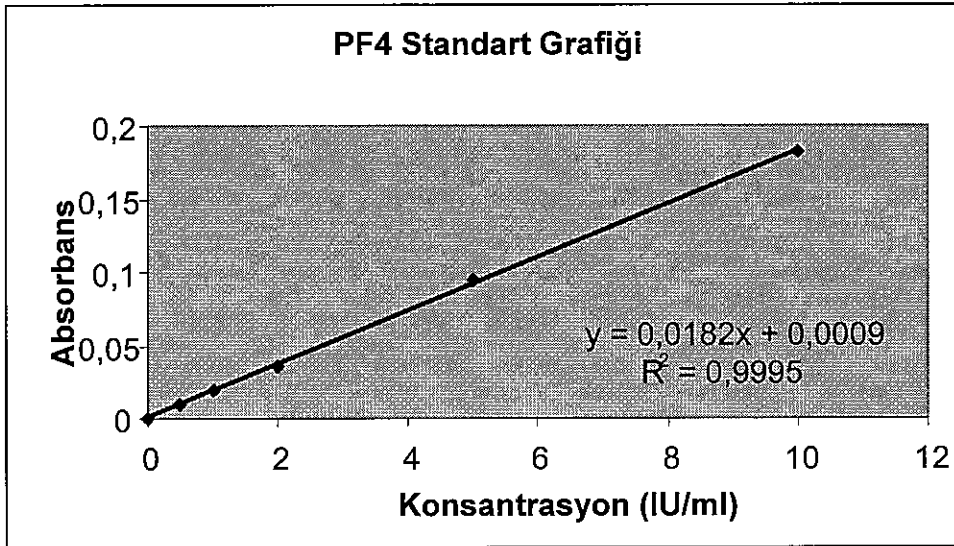
5. HRP bağı anti-PF4 monoklonal antikoru
6. HRP için dilüsyon çözeltisi
7. Yıkama tamponu
8. Deney tamponu
9. TMB substratı
10. Stop çözeltisi

Yöntem

Deney öncesi plazma numuneleri 1:4 oranında dilüe edildi. Kuyucuklara 200 µl standart/kontrol ve numunelerden eklenirken kör kuyucuğuna sadece 200 µl dilüsyon tamponu eklendi. Plak üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra kuyucuklar ters çevrilerek içeriği boşaltıldı. Kuyucuklara 300 µl yıkama tamponu konularak 5 defa yıkandı. Plak temiz bir süzgeç kâğıdı üzerinde ters çevrildi ve plak içeriği tamamen boşaltıldı. Anti-PF4-HRP immunkonjugatından her kuyucuğa 200 µl eklendi. Plak üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra kuyucuklar 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı. Tüm kuyucuklara TMB substratından 200 µl eklendi ve plak üzeri kapatılarak 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. Her kuyucuğa 50 µl H₂SO₄ eklenerek reaksiyon durduruldu ve 10 dakika beklendi. Süre sonunda 450 nmdeki absorbanslar okundu. Standart absorbanslarına karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirildi ve, plazma PF4 düzeyleri ng/ml olarak hesaplandı.

Standart Hazırlanması

Konsantrasyonu 10 IU/ml (10 ng/ml) olan PF4 stok çözeltisinden ependorf tüplerinde 0,5, 1, 2, 5 ve 10 IU/ml'lik standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar kit prospektüsünde belirtildiği gibi çalışılarak absorbansları okundu ve absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.1.3. PF4 standart grafiği

Hesaplama

PF4 konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

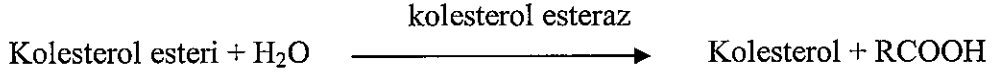
3.2.3. Serumda Ölçülen Parametreler

3.2.3.1. Total kolesterol (TK) tayini

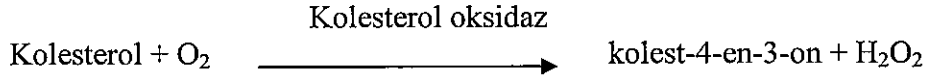
Kolesterol düzeyleri, kit (Kat.No: 2040, Futura System) kullanılarak ölçüldü.

Prensip

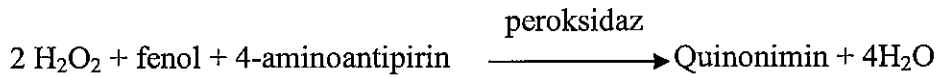
Kolesterol esterleri, enzimatik olarak kolesterol esterazla kolesterol ve serbest yağ asitlerine hidroliz edildiler.



Serbest kolesterol, kolesterol oksidazla kolest-4-en-3-on ve hidrojen peroksit okside olur.



Hidrojen peroksit, fenol ve 4-aminoantipirin ile peroksidaz varlığında birleşerek, 500 nm'de ölçülebilen kromoforu oluşturur



Oluşan kırmızı renkli quinoniminin renk şiddeti, kolesterol konsantrasyonuyla doğru orantılıdır ve spektrofotometrik olarak 520 nm'de ölçülebilir.

Ayırıcılar

Reaktif 1

- 1- PIPES (piperazin-N,N'-bis(2-etansülfonik asit)) tamponu (50 mmol/L, pH 6.8)
- 2- Fenol (3 mmol/L)
- 3- Kolesterol oksidaz > 300 U/L
- 4- Kolesterol esteraz > 300 U/L
- 5- Peroksidaz > 2000 U/L
- 6- ATP (4 mmol/l)
- 7- 4-aminoantipirin (0.25 mmol/L)

8- Sodyum azid < % 0.1

Reaktif 2

Kolesterol standardı (200 mg/dl)

Yöntem

Ayıracılar	Kör	Standart	Numune
Distile su (µl)	10	—	—
Standart (µl)	—	10	—
Numune (µl)	—	—	10
Reaktif 1 (ml)	1.0	1.0	1.0

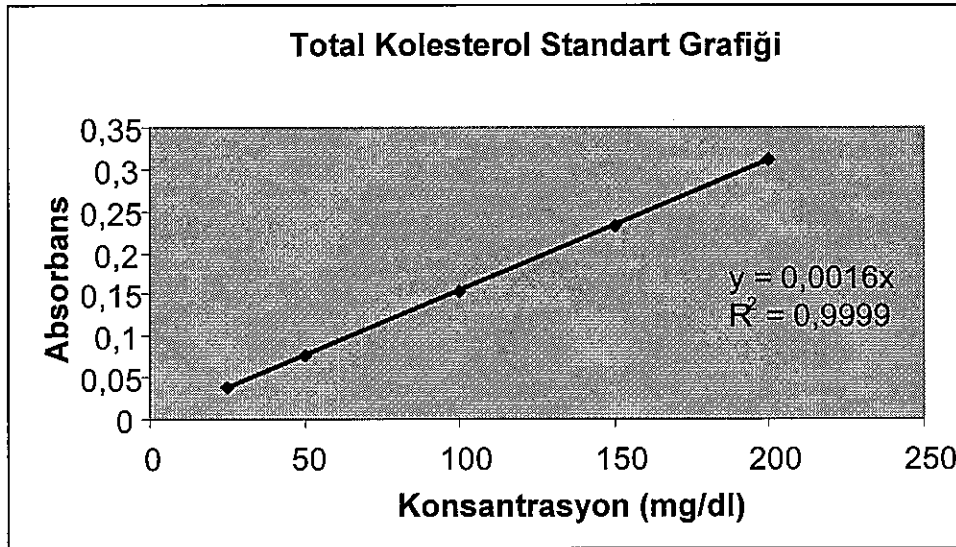
Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra, oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildiler ve köre karşı 520 nm'deki absorpsanlar kaydedildi.

Standart Hazırlanması

Konsantrasyonu 200 mg/dl olan kolesterol stok çözeltisinden ependorf tüplerinde 0, 25, 50, 100, 150 ve 200 mg/dl'lik standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar kit prospektüsünde belirtildiği gibi çalışılarak absorpsanları okundu ve absorpsan değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları içeren standart grafiği çizildi.

Hesaplama :

Total kolesterol (TK) (mg/dl) = (A_{numune} / A_{kalibratör}) x kalibratör konsantrasyonu



Şekil 3.1.4. TK standart grafiği

3.2.3.2. Yüksek Dansiteli Lipoprotein-Kolesterol (HDL-K) Tayini

HDL-K tayini, kit kullanılarak (Kat No:10018, Human) yapıldı.

Prensip

Presipitasyonla, HDL-K ölçümü esasına dayanır. Polianyonik sürfaktanlar ve $MgCl_2$ kullanılarak şilomikronlar, VLDL ve LDL lipoproteinleri çöktürülür. Süpernatanda, modifiye enzimler yardımıyla HDL-K konsantrasyonu doğrudan ölçülür.

Ayırıcılar

Reaktif 1	Fosfotungustik asit $MgCl_2$
Reaktif 2	PIPES tamponu (50 mmol/L, pH 6.8) Fenol (3 mmol/L) Kolesterol oksidaz > 300 U/L Kolesterol esteraz > 300 U/L Peroksidaz > 2000 U/L ATP (4 mmol/l) 4-aminoantipirin (0.25 mmol/L) Sodyum azid < % 0.1
Standart/kontrol	Kolesterol/Liyofilize serum (200 mg/dl)

Yöntem:

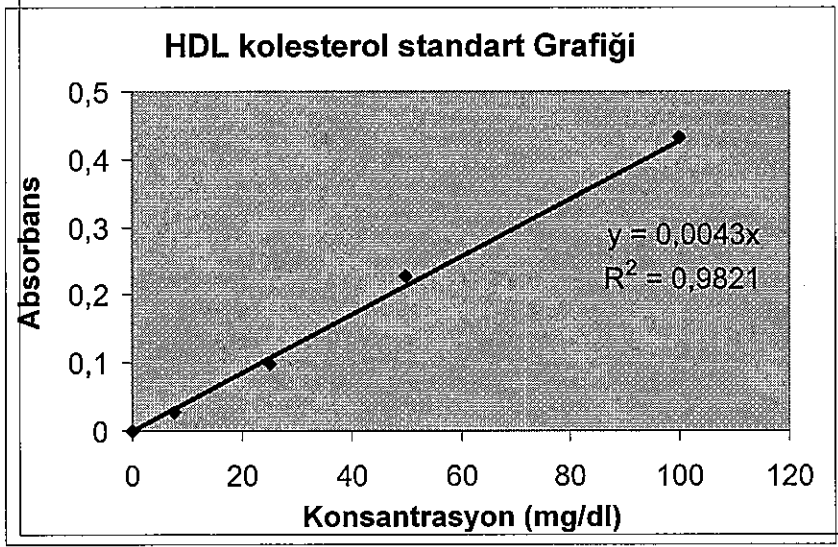
Numune (serum)/standart/kontrol	500 μ l
Reaktif 1	1000 μ l
Karıştırılır ve 37 °C' de 10 dakika inkübe edildi. 10 dakika 4.000 g'de santrifüj edildi	
Reaktif 2	1000 μ l
Karıştırılır ve 37 °C' de 5 dakika inkübe edilir. 520 nm' de absorbans köre karşı ölçülür.	

Standart Hazırlanması

Konsantrasyonu 100 mg/dl olan kolesterol stok çözeltisinden ependorf tüplerinde 0, 10, 25, 50 ve 100 mg/dl'lik standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar kit prospektüsünde belirtildiği gibi çalışılarak absorbansları okundu ve absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları içeren standart grafiği çizildi.

Hesaplama :

HDL-K kolesterol (mg/dl)= (A_{numune} / A_{kalibratör}) x standart konsantrasyonu



Şekil 3.1.5. HDL-K standart grafiği

3.2.3.3. Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (LDL-K) tayini

LDL-K, kit (Kat No: 3275, Futura System) kullanılarak ölçüldü.

Prensip

Özel sürfaktanların yardımıyla, doğrudan LDL-K ölçümü esasına dayanır. Polianyonik sürfaktanlar kullanılarak şilomikronlar, VLDL-K, ve HDL-K'deki kolesterol aktiviteleri azaltılır. İkinci basamakta modifiye enzimler yardımıyla, LDL'deki kolesterol konsantrasyonu ölçülür.

Ayırıcılar

Reaktif 1

PIPES tamponu (50 mmol/L, pH 6.8)
Kolesterol esteraz (600 U/L)
Kolesterol oksidaz (500 U/L)
Katalaz (600 kU/L)
Askorbat oksidaz (3 kU/L)
TOOS (N-etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-m-toluidin) (2 mmol/L)

Reaktif 2

PIPES tamponu (50 mmol/L, pH 6.8)
Peroksidaz (4 kU/L)

4-aminoantipirin (4 mmol/L)
Sodyum azid < % 1

Standart/kontrol

Kolesterol/Liyofilize serum

Yöntem:

Ayıraçlar	Kör	Standart	Numune
Distile su (µl)	4	—	—
Standart (µl)	—	4	—
Numune (µl)	—	—	4
Reaktifi 1 (µl)	300	300	300

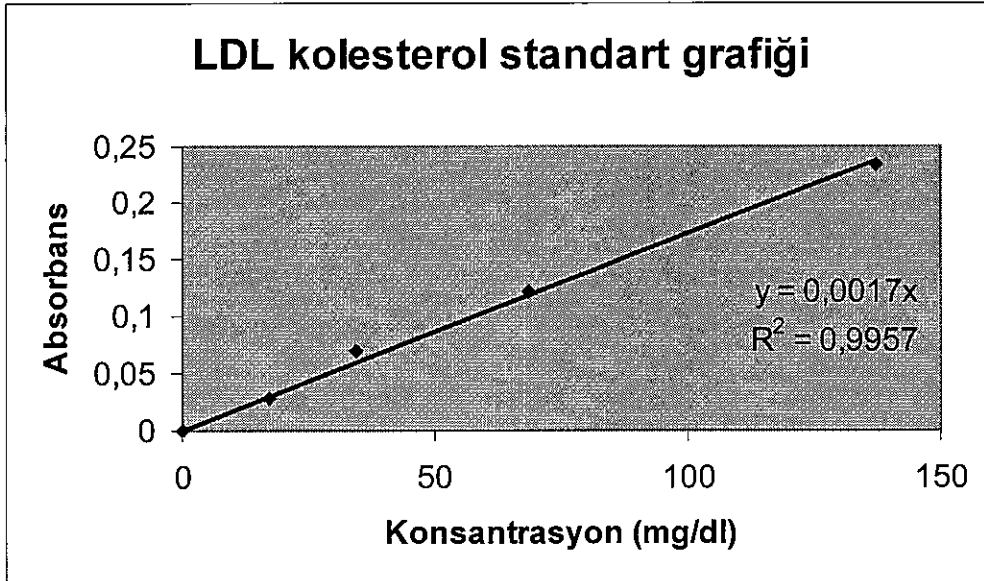
Tüpler iyice karıştırılıp 5 dakika beklendikten sonra, numunenin absorbansı köre karşı 600nm de okundu.

Standart Hazırlanması

Konsantrasyonu 140 mg/dl olan kolesterol stok çözeltisinden ependorf tüplerinde 0, 20, 40, 75, 100 ve 140 mg/dl'lik standartlar hazırlandı. Hazırlanan standartlar kit prospektüsünde belirtildiği gibi çalışılarak absorbansları okundu ve absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları içeren standart grafiği çizildi.

Hesaplama :

LDL-K (mg/dl) = (A_{numune} / A_{kalibratör}) x standart konsantrasyonu



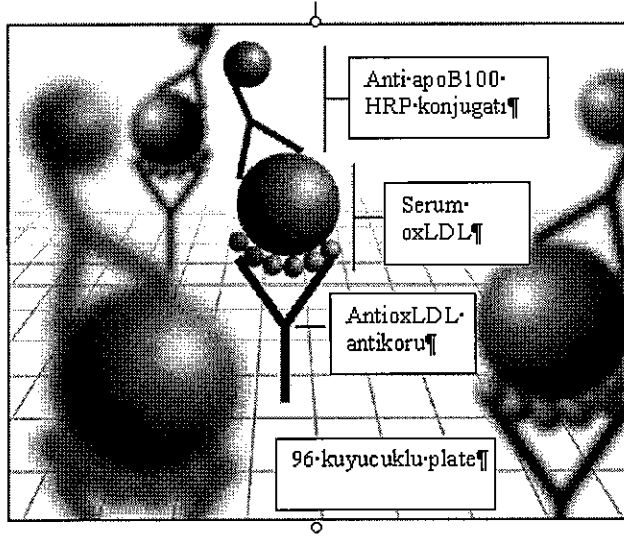
Şekil 3.1.6. LDL-K standart grafiği

3.2.3.4. Okside LDL (oxLDL) tayini

oxLDL konsantrasyonları, kit (Immun Diagnostik, Kat.No: K7810) kullanılarak ölçüldü.

Prensip

oxLDL ELISA yöntemi, immunometrik (Sandiviç ELISA) prensibe dayalı ölçüm yapmaktadır. Katı faz monoklonal antikor, serumda bulunan ox-LDL antijenine karşı geliştirilmiştir ve oxLDL-antikor bağlanmasının ürünü, sonra HRP (horseradish peroxidase) işaretli monoklonal anti-apoB100 antikorunu ile belirlenir. Ortama kromojenik bir substrat olan tetrametilbenzidin (TMB) eklenmesinden sonra oluşan sarı renkli ürünün 450 nm dalga boyundaki absorbansı oxLDL konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Hazırlanan standart grafiği yardımıyla serum oxLDL miktarı ölçülür.



Şekil 3.1.7. oxLDL ölçüm prensibi

Ayrıçlar

1. Dilüsyon tamponu
2. Referans çözeltisi
3. Pozitif kontrol
4. Negatif kontrol
5. Horseradish peroksidaz (HRP) antikor konjugatı
6. TMB substratı
7. Yıkama tamponu
8. Stop çözeltisi (0.36 N sülfürik asit)
9. Anti-OxLDL antikorunu ile kaplanmış 96 kuyucuklu ELISA plak

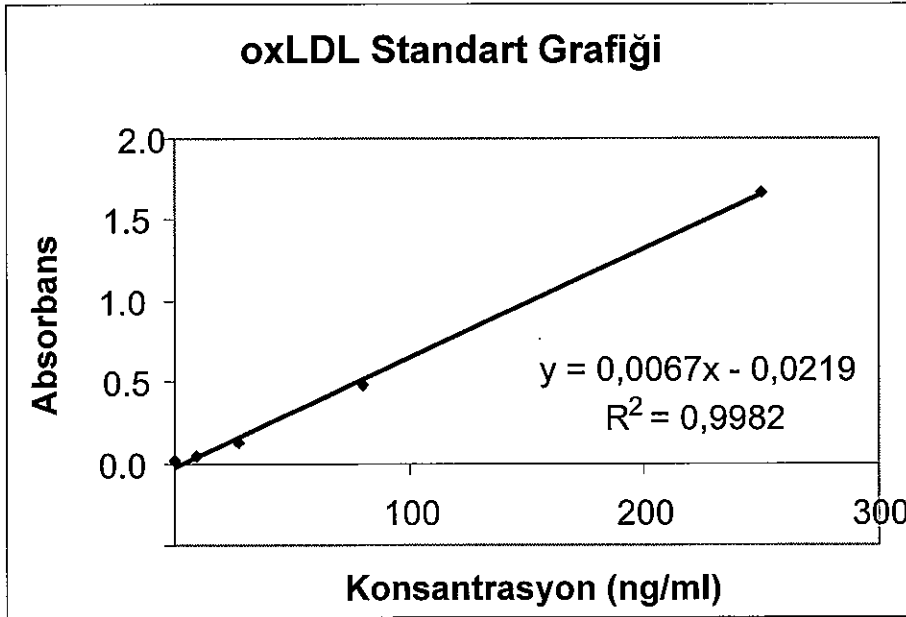
oxLDL tayini

Serum örnekleri dilüsyon tamponu ile 1:10 oranında dilüe edildi. Kuyucuklar 250 µl yıkama tamponuyla 5 defa yıkandı. Temiz bir süzgeç kâğıdı üzerinde ters çevrilen plak içeriği tamamen boşaltıldı ve kuyucukların kurumamasına özen gösterildi. 96 kuyucuğun standart ve kontrol ve numune konulurken, kör kuyucuğuna

sadece 100 µl dilüsyon tamponu eklendi. Plak üzeri kapatılarak 4 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra, kuyucuklar ters çevrilerek içeriği boşaltıldı. Kuyucuklar 250 µl yıkama tamponuyla 5 defa yıkandı. Temiz bir süzgeç kâğıdı üzerinde ters çevrilen plak içeriği tamamen boşaltıldı ve kuyucukların kurumamasına özen gösterildi. 100 µl seyreltilmiş konjugattan her kuyucuğa ilave edildi. Plak üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra kuyucuklar 5 defa 250 µl yıkama tamponuyla yıkandı. Temiz bir süzgeç kağıdı üzerinde ters çevrilen petrinin içeriği tamamen boşaltıldı. Substrattan 100 µl eklendi ve plak üzeri kapatılarak 20 dakika karanlıkta ve oda ısısında inkübe edildi. 50 µl stop solüsyonu eklendi ve karıştırıldı. Mavi rengin sarıya dönüşmesi gözlemlendikten sonra hemen 450 nmdeki absorpsiyonlar okundu. oxLDL konsantrasyonları, standart grafiğinden ng/ml olarak hesaplandı.

Standart Hazırlanması

Toz halinde bulunan standartlar 500 µl bidistile su ile çözüldü ve 0, 9, 27, 80 ve 250 ng/ml'lik standart solüsyonlar hazırlandı ve numune gibi çalışılarak konsantrasyonlara karşı absorpsiyon değerlerini içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.1.8. oxLDL standart grafiği

Hesaplama

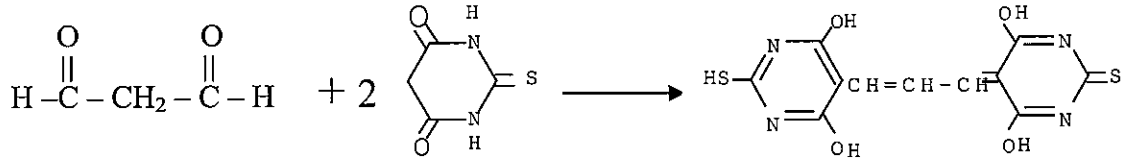
oxLDL konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.3.5. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikleri (TBARS) Tayini

Serum TBARS düzeyleri, Wasowicz ve arkadaşlarının (262) fluorometrik metoduna göre tayin edildi.

Prensip

Bu metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA'nın bir molekülünün, 2 molekül 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi ile oluşan bileşiğin asidik ortamda n-bütanol fazına ekstrakte edilerek, 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boylarında fluorometrik olarak okunması esasına dayanır.



malondialdehit 2 - tiyobarbitürik asit

kromojen (pembe)

Ayırıcılar

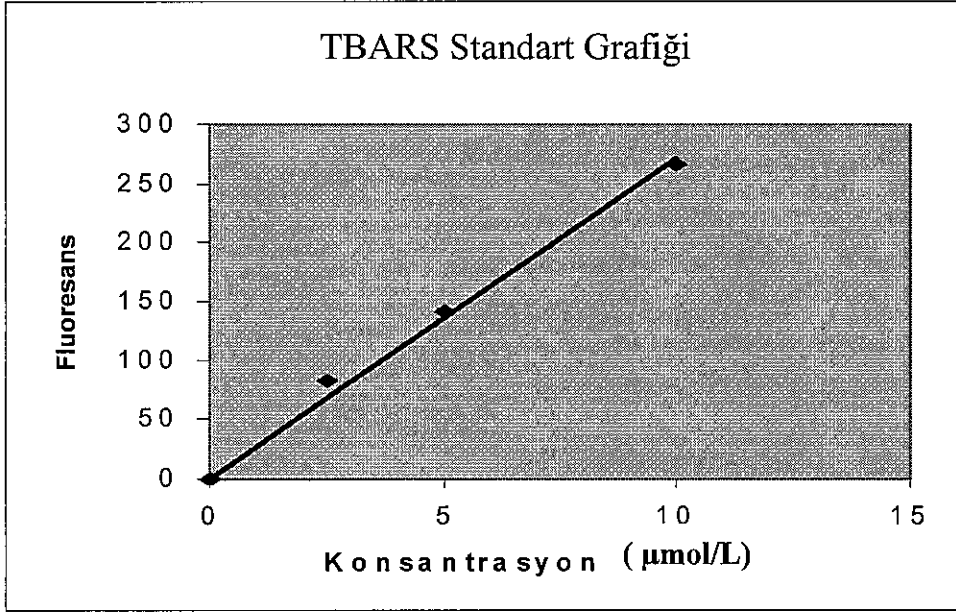
- 1- 2-tiyobarbitürik asit (29 mM) (8.75 M asetik asit içinde hazırlanır).
- 2- Hidroklorik asit (5 M)
- 3- n-Bütanol
- 4- 1,1,3,3,-tetraetoksipropan standardı (Sigma, T9889). Bu standarttan 0.0, 2.5, 5.0 ve 10.0 nmol/ml lik standart solüsyonları hazırlanıp, aynen numune gibi çalışıldıktan sonra standart grafiği çizildi.

Yöntem :

50 µL numune, içinde 1 ml arık su bulunan cam tüplere kondu. 1 ml TBA eklendikten sonra, tüpün ağzı sıkı bir şekilde kapatılarak 1 saat 100°C'de kaynar su banyosunda tutuldu. Numuneler çeşme suyu altında hemen soğutulduktan sonra, 25 µL HCl eklenerek son pH'nın 1.6 - 1.7 arasında olması sağlandı. 3.5 ml n-bütanol eklenerek, numuneler 5 dakika vortekslendi. MDA, numunelerin +4°C' de 5 dakika 1500 x g' de santrifügasyonu sonucu bütanol fazına geçirildi. Bütanol fazının floresansı 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boyları kullanılarak spektrofluorometrede ölçüldü. Numunelerin MDA içerikleri standart grafiğinden hesaplandı.

Standart Hazırlanması

1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak 0, 2.5, 5 ve 10 µmol/L' lik standart solüsyonlar hazırlandı ve numune gibi çalışılarak konsantrasyonlara karşı floresans değerlerini içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.1.9. TBARS standart grafiği

Hesaplama

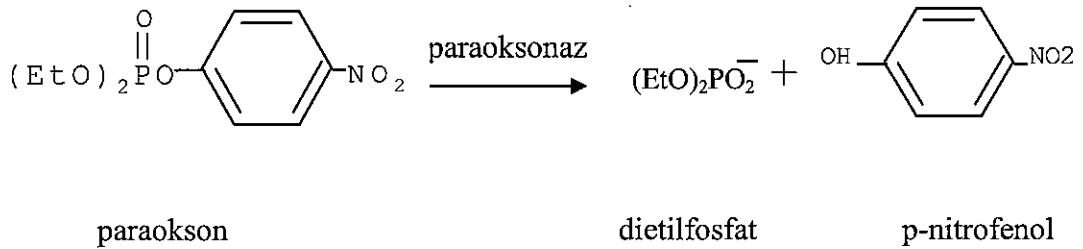
TBARS konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.3.6. Paraoksonaz-1 (PON1) Aktivitesinin Tayini

Paraoksonaz-1 (PON1) aktivitesi, Göçmen ve arkadaşlarının (263) modifiye ettiği Furlong (264) ve Mackness'ın (265) metodları kullanılarak ölçüldü.

Prensip

Paraokson (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat), serumda bulunan paraoksonaz ile dietil fosfata ve p-nitrofenole dönüşür. Oluşan p-nitrofenolün 405 nm dalga boyunda vermiş olduğu absorbans artışı PON aktivitesi ile orantılıdır.



Ayırma

- 1- Tris-HCl tamponu (0.1 M, pH:8) (1 mM CaCl₂ içerir): 8.3 ml HCl, içerisinde arık su bulunan 1 litrelik balon jøjeye konuldu ve hacim arık su ile 1 litreye tamamlandı. Aynı şekilde, 12,1 gr Tris tartılarak 1 litrelik balon jøjede bir miktar

arıklar su ile iyice çözüldükten sonra, hacim 1 litreye tamamlandı. Her iki çözelti pH 8.0 oluncaya dek uygun oranlarda karıştırıldı. Hazırlanan tampondan bir miktar alınarak ayrı bir 1 litrelik balon jöjeye aktarıldı. Sonra içine 36.5 µg CaCl₂ konuldu ve iyice çözüldü. Hacim aynı tamponla 1 litreye tamamlandı.

- 2- CaCl₂ (1 mM)
- 3- Aseton
- 4- Paraoxon (stok çözeltisi) (120 mM) (Sigma, D9286): 33.024 mg paraoxon tartılarak 900 µL asetonda çözüldü ve hacim arık su ile 1 ml' ye tamamlandı. Bu çözelti +4°C' de 3 hafta stabildir.
- 5- Paraoxon (çalışma çözeltisi) (6 mM): Stok çözelti, Tris-HCl tamponu (50 mM, pH 8.0) ile 1/20 oranında dilüe edilerek hazırlandı. Bu çözelti taze hazırlanıp, hemen kullanılmalıdır.
- 6- Distile su

Yöntem:

Ayıracılar	Kör	Numune
Tris-HCl tamponu (pH:8.0) (µL)	1440	1140
Serum(µL)	60	60
Paraoxon (µL)	—	300
Total (µL)	1500	1500

Ölçüm yapılacağı gün gerektiği kadar deney tüpü hazırlanarak kör ve numune olarak işaretlendi. Her iki tüpe de Tris-HCl tamponu ve 60 µL serum eklendi. Bu tüpler 10 dakika 37°C' de inkübasyona bırakıldılar. İnkübasyon süresinin bitiminde, kör tüpündeki karışım kullanılarak spektrofotometrenin 405 nm' de sıfır ayarı yapıldı. Örnek tüpüne 300 µL paraoxon ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. Karışım alt üst edildikten sonra, hemen spektrofotometre küvetine aktarıldı. Küvet spektrofotometreye yerleştirildi ve 10 dakika boyunca optik dansite değerleri kaydedildi. Ayrıca, p-nitrofenol kullanılarak kendi şartlarımızda (pH:8, 405 nm ve 37°C) molar ekstinksiyon katsayısı (ε) tayin edildi.

Hesaplama:

Elde edilen optik dansite artışlarının ilk 3 dakikası dikkate alınmadı. Lineer artışın olduğu son 7 dakikaya ait optik dansite değerlerinden, 1 dakikadaki ortalama optik dansite (ΔOD/dk) hesaplandı. Bulunan değer aşağıdaki formülde yerine konularak IU/l şeklinde PON aktivitesi hesaplandı.

$$IU/l = \frac{\Delta OD/dk}{\epsilon \times \frac{V_{NUMUNE}}{V_{TOTAL}}}$$

$$\epsilon = 10.10 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

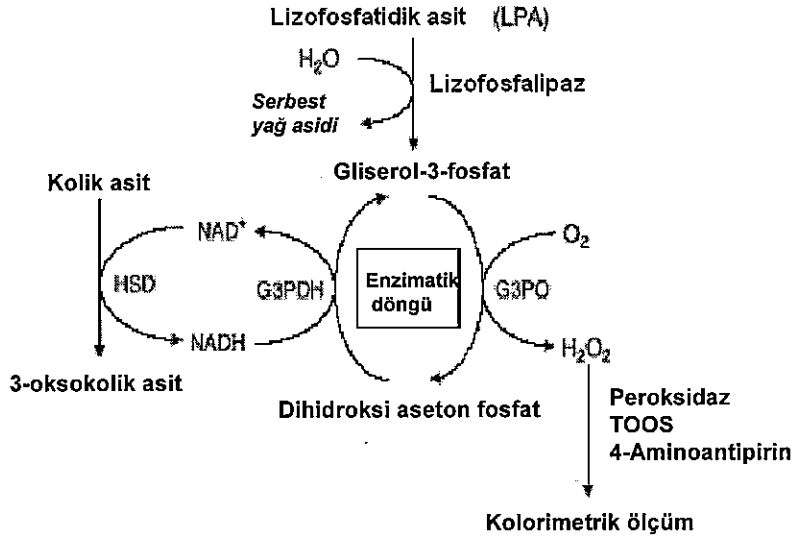
$$IU/l = \frac{(\Delta OD/dk) \times 10^4}{4}$$

3.2.3.7. Lizofosfatidik asit (LPA) tayini

LPA, Kishimoto ve arkadaşlarının (266) metoduna göre ölçüldü.

Prensip

Serumda bulunan LPA bir dizi enzimatik reaksiyona girer. Sonuçta oluşan hidrojen peroksit, 4-aminoantipirinle reaksiyona girerek renkli bir bileşik oluşturur. Bu bileşiğin verdiği absorbans kolorimetrik olarak ölçülür.



Şekil 3.10. LPA'nın enzimatik ölçüm prensibi

Ayırıcılar

Reaksiyon Karışımı

1. Lizofosfolipaz
2. Gliserol-3-fosfat oksidaz (G3PO)
3. 3-alfa-hidroksisteroid dehidrogenaz (HSD)
4. Peroxidaz
5. Gliserol-3-fosfat dehidrogenaz (G3PDH)
6. N-etil-N-(2-hidroksi-3-sulfopropil)-3-metilanolin, sodyum dihidrat (TOOS)
7. 4-aminoantipirin
8. β -nikotinamid adenin dinukleotid disodyum
9. 1-oleoil-2-hidroksi-sn-gliserol-3-fosfat
10. HEPES tamponu (pH 7.6)
11. Triton X-100 (%0.01)

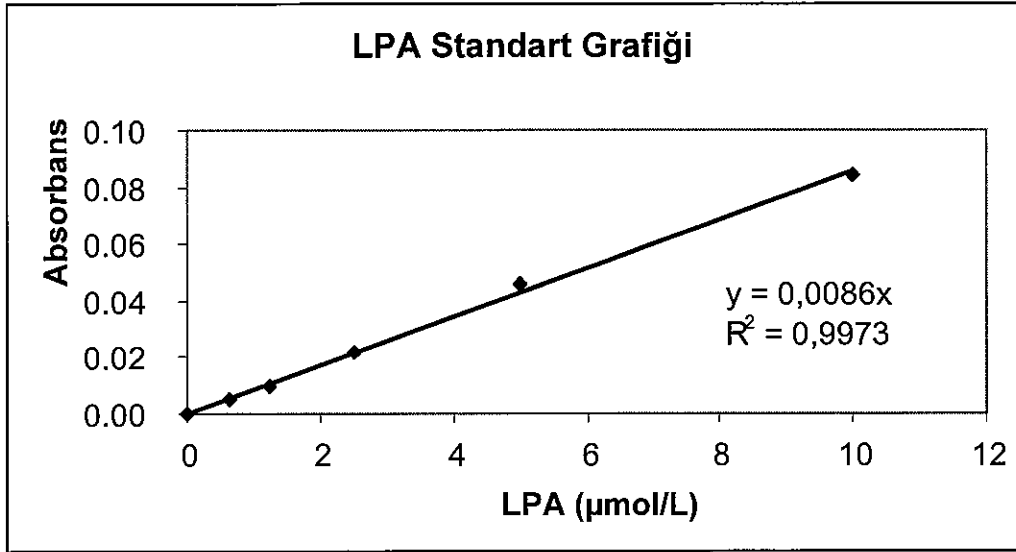
Yöntem

Ayrıçlar	Kör	Örnek	Standart
Reaksiyon karışımı (μ l)	240	240	240
Serum (μ l)	—	9	—
Distile Su (μ l)	9	—	—
LPA (μ l)	—	—	9

Karışımlar 37 °C’de 7-9 dakika inkübe edildi. 7 ve 9. dakikalardaki absorbanlar 570 nm’de ve 700 nm’de ölçüldü. 570 nm’de ölçülen absorban değerinden 700 nm’de ölçülen absorban değeri çıkarıldı. 7-9 dakikalar arasındaki artış hızı lineer regresyon analizi yardımıyla ölçüldü. Serum LPA konsantrasyonları, standart grafiği yardımıyla μ M olarak hesaplandı.

Standart Hazırlanması

Toz halde bulunan LPA, tuz içeren % 0.1 TritonX-100 içeren serum fizyolojik ile çözülerek 0, 0.625, 1.25, 2.5, 5 ve 10 μ M’lık standart solüsyonlar hazırlandı ve numune gibi çalışılarak konsantrasyonlara karşı absorban değerlerini içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.10. LPA standart grafiği

Hesaplama

LPA konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.3.8. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) tayini

H_2O_2 , kit kullanılarak (Assay Designs, Kat. No: 907-015) ölçüldü.

Prensip

Serum örneklerinde bulunan H_2O_2 'in ksilenol turuncusu ile oluşturduğu renkli bileşiğin verdiği absorbans ölçülür.

Ayırıcılar

1. Steril 96 kuyucuklu plak
2. Hidrojen peroksit standardı (100 $\mu\text{g/ml}$)
3. Renk reaktifi (ksilenol turuncusu)

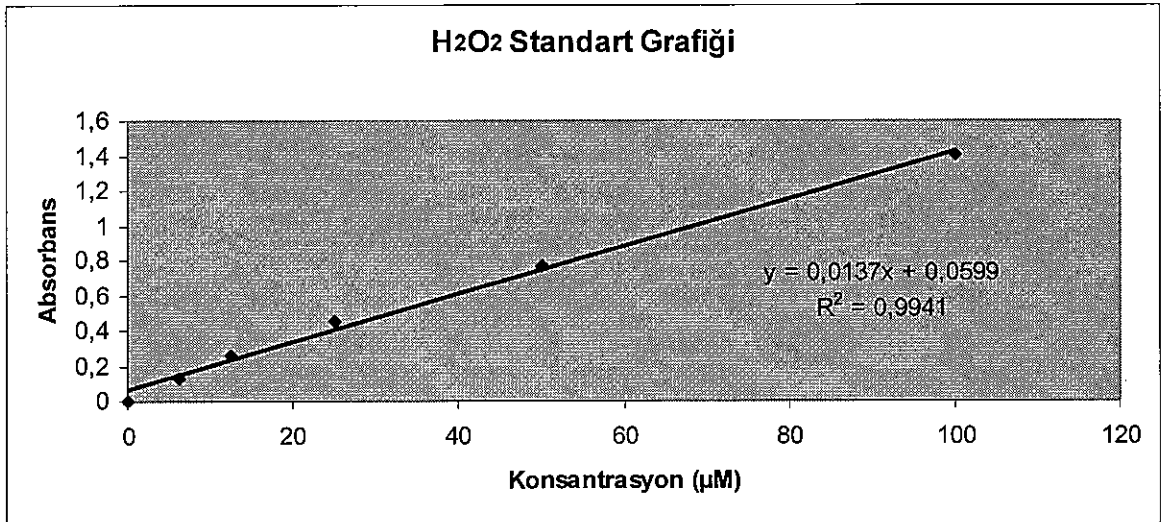
Yöntem

Ayırıcılar	Kör	Örnek	Standart
Serum (μL)	—	50	—
Distile Su (μL)	50	—	—
H_2O_2 (μL)	—	—	50
Renk reaktifi (μL)	100	100	100

Oda ısısında 30 dakika inkübe edilerek 550 nm'deki absorbanslar ölçüldü. Standart konsantrasyonları hesaplanarak grafiğe geçirildi ve serum H_2O_2 konsantrasyonları μM olarak hesaplandı.

Standart Hazırlanması

Kit içinde bulunan H_2O_2 stok çözeltisi dilüe edilerek 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50 ve 100 μM 'lık standart solüsyonlar hazırlandı ve numune gibi çalışılarak konsantrasyonlara karşı absorbans değerlerini içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.1.10. H_2O_2 standart grafiği

Hesaplama

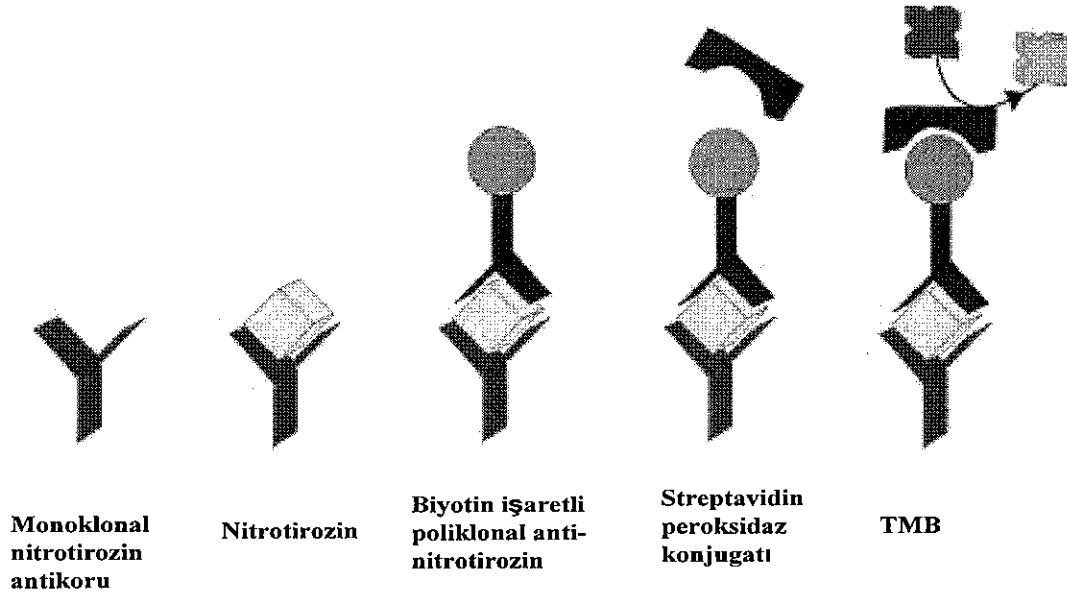
H_2O_2 konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.3.9. Nitrotirozin Tayini

Nitrotirozin düzeyleri, kit (Oxis research, Kat.No: 21055) kullanılarak ölçüldü.

Prensip

Nitrotirozin tayini, ELISA prensibiyle yapılır. Katı faz monoklonal antikora yakalanan antijen daha sonra biyotin işaretli keçi poliklonal anti-nitrotirozin ile belirlenir. Streptavidin peroksidaz konjugatı biyotinlenmiş antikora bağlanır. Ortama tetrametilbenzidin (TMB) substratı eklendikten sonra oluşan sarı renkli ürünün absorbansı 450 nm dalga boyunda ölçülür.



Şekil 3.12. Nitrotirozin deneyinin prensibi

Ayırıklar

1. Dilüsyon tamponu (PBS)
2. Nitrotirozin standartı
3. Nitrotirozin antikoru
4. Streptavidin peroksidaz
5. Yıkama yamponu
6. Stop çözeltisi
7. Daha önceden nitrotirozin antikoru ile kaplanmış plakalar

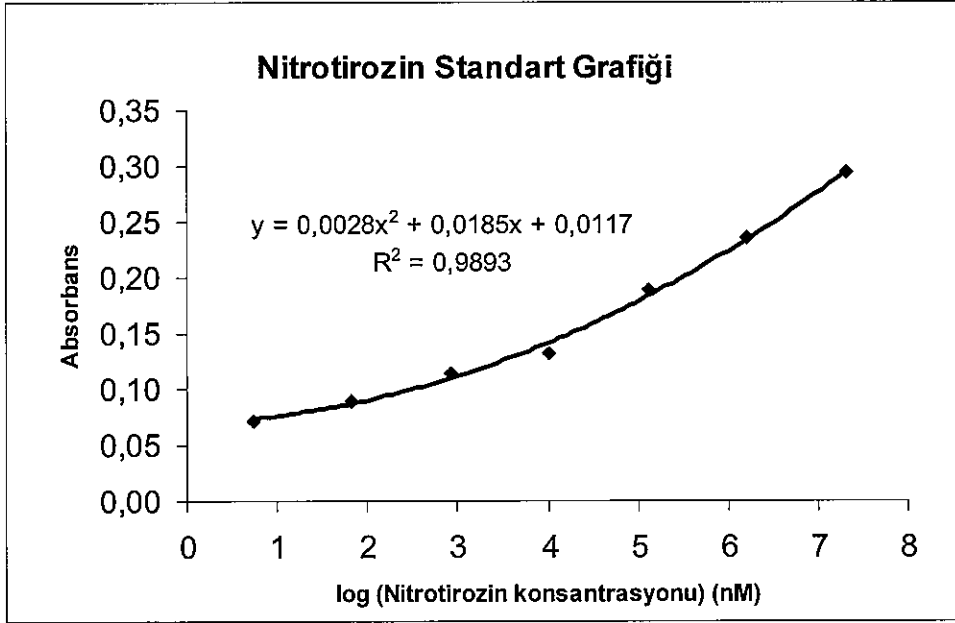
Yöntem

96 kuyucuğun her birine 100 µl standart, kontrol ve serum konulurken, kör kuyucuğuna sadece 100 µl dilüsyon tamponu eklendi. Plak üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra kuyucuklar 4 defa yıkama

tamponuyla yıkandı. Temiz bir süzgeç kağıdı üzerinde ters çevrilen petrinin içeriği tamamen boşaltıldı. 100 µl nitrotirozin antikoru ilave edilerek plak üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra kuyucuklar 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı. Temiz bir süzgeç kağıdı üzerinde ters çevrilen petrinin içeriği tamamen boşaltıldı. 100 µl streptavidin peroksidaz eklendi. Plak üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Kuyucuklar 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı. Temiz bir süzgeç kâğıdı üzerinde ters çevrilen plak içeriği tamamen boşaltıldı. 100 µl TMB substratı konularak üzeri kapatılan plak karanlık bir yere alınarak oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. 100 µl stop solüsyonu eklendi ve karıştırıldıktan sonra 450 nmdeki absorbanlar kaydedildi. Nitrotirozin konsantrasyonları, standart grafikten nM olarak hesaplandı.

Standart Hazırlanması

Sıvı şekilde bulunan 100 µl NT üzerine 900 µl deney tamponu ilave edilerek 200 nM stok NT çözeltisi hazırlandı. Stoktan 5,10, 15, 20, 25, 30 ve 35 nM'lık standart solüsyonlar hazırlandı ve numune gibi çalışılarak konsantrasyonlara karşı absorban değerlerini içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.1.12. Nitrotirozin standart grafiği

Hesaplama

Standart grafiği kullanılarak nitrotirozin konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.5. Karaciğer Dokusunda Ölçülen Parametreler

3.2.5.1. Dokuların Hazırlanışı

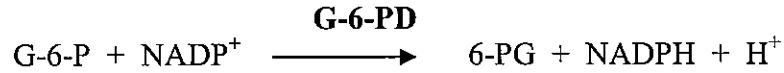
Çalışma zamanına kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilen dokulardan her bir ölçüm için uygun miktarda kesildikten sonra, uygun tampon içinde sonikatör yardımıyla soğukta homojenize edildiler. Tüm parametreler için hazırlanan süpernatantlardan, uygun dilüsyonlar yapılarak doku protein düzeyleri ölçüldü.

3.2.5.2. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz (G-6-PD) Aktivitesinin Tayini

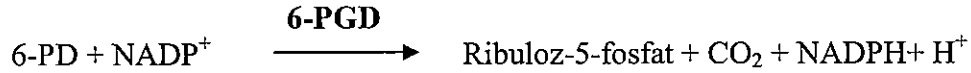
G-6-PD aktivitesi, "Modifiye Zinkham yöntemi" (267) kullanılarak ölçüldü.

Prensip

G-6-PD aktivitesinin ölçümü, NADPH'nin 340 nm'de verdiği absorbans ölçümüne dayanır.



Bu reaksiyon sonunda açığa çıkan 6-fosfoglukonat (6-PG) aşağıdaki reaksiyona katılır.



Reaksiyonun başlangıç safhasında, yani hızın lineer olarak artış gösterdiği dönemde oluşan NADPH miktarı ile G-6-PD enzim aktivitesi orantılıdır. Oluşan NADPH'nin 340 nm'de verdiği absorbans artışı, kinetik olarak izlenerek G-6-PD aktivitesi ölçüldü.

Ayrıçalar

1. NADP⁺ (2 mM)
2. G-6-P (6 mM)
3. MgCl₂ (0.1 M)
4. Tris-HCl tamponu (1M, pH:8.0): 1M Tris ile 1M HCl karıştırılarak, pH: 8'e ayarlandı.
5. Krebs fosfat tamponu (pH 7.4, 119 mM NaCl, 48 mM KCl, 8.7 mM NaHCO₃, 1.3 mM KH₂PO₄, 1.9 mM CaCl₂, 11.7 mM glukoz içerir)

Homojenat Hazırlanması

Dondurulmuş karaciğerlerden yaklaşık 70-100 mg kesildi ve serum fizyolojik ile birkaç kez yıkandıktan sonra, 2 ml soğuk Krebs fosfat tamponunda (pH 7.4) homojenize edildiler. 50.000 g de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildiler. Süpernatantlarda G-6-PD aktivitesi tayin edildi.

Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Deney tüplerine 550 µl distile su, 100 µl NADP⁺, 100 µl Tris-HCl tamponu ve 100 µl MgCl₂ pipetlenerek reaksiyon karışımı hazırlandı.

Yöntem

Ayıraçlar	Kör	Numune
Reaksiyon karışımı (µl)	850	850
Süpernatant (µl)	50	50
G-6-P (µl)	-	100
Distile su (µl)	100	-

Kör küvetine distile su, numune küvetine de G-6-P eklenerek reaksiyon başlatıldı. 340 nm'deki 1 dakikalık optik dansite değerleri 30°C'de, 10 dakika boyunca kaydedildi.

Aktivitenin Hesaplanması

Bir dakikalık absorbanst artış (ΔOD/dak) hesaplandı. Daha sonra bu değer aşağıdaki formüle yerleştirilerek, gram protein başına düşen enzim aktivitesi hesaplandı.

$$(G-6-PD) IU/g \text{ protein} = (\Delta OD/\Delta t) / [\epsilon \times \% g \text{ protein} \times v/V]$$

$$(G-6-PD) IU/g \text{ protein} = [(\Delta OD/dak) \times 10^5] / 6.22 \times \text{protein}^a \times \text{Homojenat hacmi}^b$$

a: % g

b: mikrolitre süpernatant/ml reaksiyon karışımı

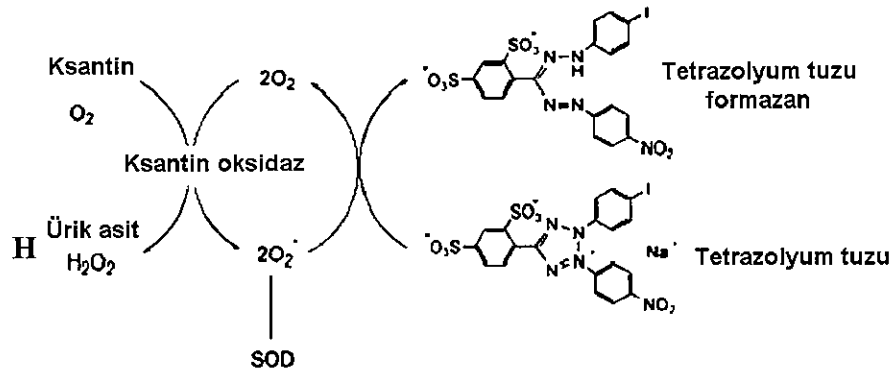
$$(G-6-PD) IU/g \text{ protein} = [(\Delta OD/dak) \times 10^5] / 311 \times \% g \text{ protein}$$

3.2.5.3. Süperoksit Dismutaz(SOD) Aktivitesinin Tayini

SOD aktivitesi, kit kullanılarak ölçüldü (Cayman, Katalog No:706002).

Prensip

SOD kiti tetrazolyum tuzu kullanarak, ksantin oksidaz ve hipoksantin aracılığıyla oluşan süperoksit radikallerini tayin eder. Bir ünite SOD aktivitesi, süperoksitin %50 sinin dismutate edilmesi için gerekli olan enzim miktarını ifade eder.



Dondurulmuş karaciğerlerden yaklaşık 100-200 mg kesilerek PBS (pH 7.4) ile birkaç kez yıkandılar. Dokular 1-2 ml, soğuk HEPES tamponunda (20 mM, pH:7.2 tamponu 1 mM EGTA, 210 mM mannitol ve 70 mM sukroz içerir) homojenize edildiler. Homojenatlar 1.500 g de ve 4°C'de 5 dakika santrifüj edildiler. Süpernatantlarda SOD aktivitesi tayin edildi.

Yöntem

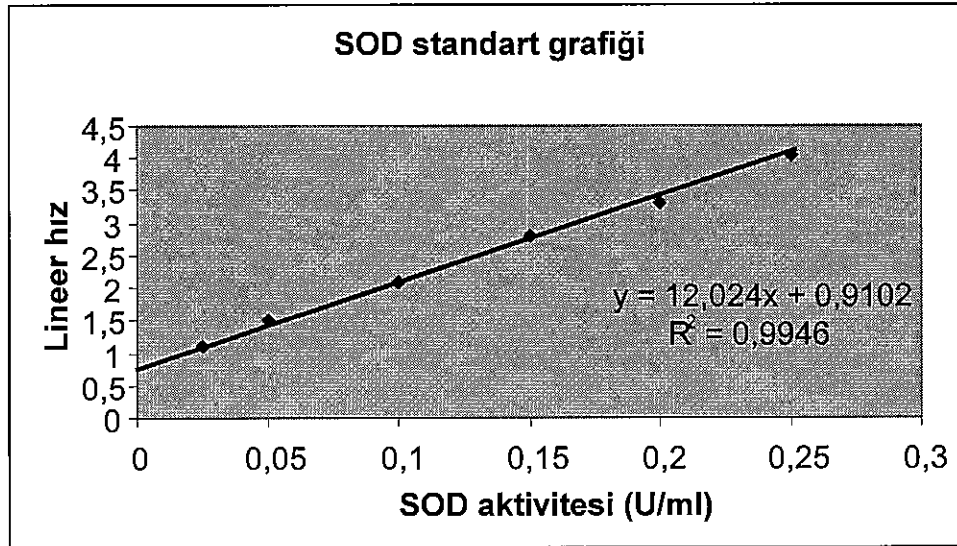
Elde edilen süpernatant HEPES tamponu ile (20 mM, pH:7.2) 10 kat dilüe edilerek ölçüm için kullanıldı.

Ayrıçalar	Kör	Numune	Standart
Sığır eritrosit SOD (Cu/Zn) (µl)	-	-	10
Radikal dedektör (µl)	200	200	200
Süpernatant (µl)	-	10	-
Distile su (µl)	10	-	-
Ksantin oksidaz (µl)	20	20	20

Ortama en son 20 µl ksantin oksidaz eklendi ve 96 lı kuyucuklu plak hemen karıştırıldıktan sonra, 25 °C'de ve 450 nm'de köre karşı kontrol ve numune tüplerindeki absorbanans değişimi 20 dakika boyunca kaydedildi.

Standart Hazırlanması

SOD kitinde yazıldığı gibi, 20 µl standart 1.98 ml deney tamponu ilave edilerek 1.25 U/ml stok SOD çözeltisi hazırlandı. Stoktan 0, 0.025, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 ve 0.25 U/ml'lik standart solüsyonlar hazırlandı ve numune gibi çalışılarak aktivitelere karşı lineer hız değerlerini içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.2.1. SOD standart grafiği

Aktivitenin Hesaplanması

Standart grafiği kullanılarak SOD aktivitesi hesaplandı.

$$\text{SOD (U/mg protein)} = \frac{\left(\frac{\text{Numunenin lineer hızı} - y \text{ kesişim noktası}}{\text{Eğim}} \times 0.0023 \right) \times \text{Dilüsyon faktörü}}{\text{Protein (mg)}}$$

3.2.5.4.Katalaz (KAT) Aktivitesinin Tayini

KAT aktivitesi, Aebi'nin (268) yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Prensip

Hidrojen peroksit (H₂O₂), KAT'ın katalizlediği reaksiyon sonucunda O₂ ve H₂O'ya parçalanır. Bu reaksiyonun temel prensibi, reaksiyon karışımındaki H₂O₂'in azalan absorbansının 240 nm'de ölçülmesidir.



Ayıracılar

1. Fosfat tamponu (50 mmol/l, pH:7.0): KH₂PO₄ ve Na₂HPO₄ kullanılarak hazırlandı.
2. H₂O₂ (30 mmol/l): Fosfat tamponu içerisinde taze olarak hazırlandı.

Homojenat Hazırlanması

Dondurulmuş karaciğerlerden yaklaşık 100-200 mg kesilerek PBS (pH 7.4) ile birkaç kez yıkandılar. Dokular 1-2 ml, soğuk fosfat tamponunda (50 mmol/l, pH:7.0) homojenize edildiler. Homojenatlar 1.500 g de ve 4°C'de 5 dakika santrifüj edildiler. Süpernatantlarda katalaz aktivitesi tayin edildi.

Yöntem

Süpernatant fosfat tamponu ile 1/20 oranında dilüe edildi ve aşağıdaki prosedür için kullanıldı.

Ayıracılar	Kör	Numune
Fosfat tamponu (µl)	700	-
Süpernatant (µl)	1400	1400
H ₂ O ₂ (µl)	-	700

Reaksiyon H₂O₂ eklenmesiyle başlatıldı. Başlangıç absorbansının 0.500 civarında olmasına dikkat edildi. 20 sn boyunca 240 nm ve 25 °C'deki absorbans azalışları kaydedildi.

Aktivitenin Hesaplanması

KAT aktivitesi, "birinci dereceden reaksiyonun hız sabiti" (k) kullanılarak hesaplandı.

$$k = 2.3/\Delta t \times \log (A_0/A_{15})$$

$$k = 2.3/15 \times \log (A_0/A_{15}) = 0.153 \times \log (A_0/A_{15}) \text{ s}^{-1} \text{ ml}$$

Litredeki k değeri hesaplanacağı için çıkan sonuç 1000 ile çarpıldı.

$$k = 153 \times \log (A_0/A_{15}) \text{ s}^{-1} \text{ L}^{-1}$$

k : Birinci dereceden reaksiyonun hız sabiti.

A₀ : 0. saniyedeki absorbans değeri.

A₁₅ : 15. saniyede absorbans değeri.

Numune 20 defa dilüe edildiği için, bulunan değer 20 ile çarpıldı. Çıkan sonuç, stok homojenattaki protein konsantrasyonuna bölünerek KAT'ın aktivitesi k/g protein olarak belirlendi.

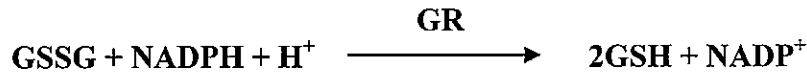
$$\text{KAT [k/g protein]} = \frac{[\log (A_0/A_{15})] \times 3060}{\text{protein (gram)}}$$

3.2.5.5. Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Tayini

Glutasyon Redüktaz aktivitesi, kit kullanılarak (Cayman, Katalog No. 703202) ölçüldü.

Prensip

Glutasyon redüktaz (GR), ortamda bulunan NADPH'ı kullanarak okside glutasyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) indirger. Sonuçta, NADPH'ın oksidasyon hızına bağlı olarak absorbansta oluşan azalma 340 nm'de ölçülür.



Homojenat Hazırlanması

Yaklaşık 50-100 mg lık kesilen karaciğerler, PBS çözeltisiyle yıkandı ve 1ml potasyum fosfat tamponunda soğuk buz içine konan ependorflarda homojenize

edildi. Homojenat, 10,000 x g de 15 dakika 4°C de santrfüj edildi. Süpernatantlarda GR aktivitesi ölçüldü.

Yöntem

Elde edilen süpernatant fosfat tamponu ile 3 kat dilüe edilerek ölçüm için kullanıldı.

Ayrıçlar	Kör	Numune	Standart
Fosfat tamponu (µl)	120	100	100
GSSG (µl)	20	20	20
Glutasyon redüktaz (µl)	-	-	20
Süpernatant (µl)	-	20	-
NADPH (µl)	50	50	50

Ortama en son 50 µl NADPH eklendi ve 96 lı kuyucuklu plak hemen karıştırıldıktan sonra, 25 °C'de ve 340 nm'de köre karşı standart ve numune tüplerindeki absorbans değişimi 5 dakika boyunca kaydedildi.

Aktivitenin hesaplanması

Dakikada oluşan absorbans değişimleri (ΔA_{340}) hesaplandı. Daha sonra, bu değerler aşağıdaki formülde yerine konularak GR aktivitesi hesaplandı.

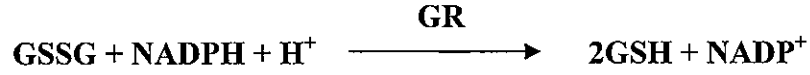
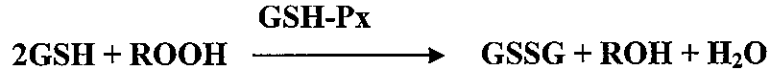
$$\text{GR (IU/g protein)} = \frac{\left(\frac{\Delta A_{340}/\text{dakika}}{0.00373} \times \frac{0.19}{0.02} \right) \times \text{dilüsyon faktörü}}{\text{Protein (gram)}}$$

3.2.5.6.Selenyum-Bağımlı Glutasyon Peroksidaz (Se-GSH-Px) Aktivitesinin Tayini

Se-GSH-Px aktivitesi, Fecondo ve Augusteyn'in (269) enzimatik yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Prensip

Birinci aşamada GSH, Se-GSH-Px tarafından katalizlenen bir reaksiyonla, t-bütül hidroperoksit (t-BuOOH) kullanılarak okside edilir. İkinci aşamada, ortama eksojen olarak eklenen glutasyon redüktaz (GR), yine ortama eksojen olarak eklenen NADPH'ı kullanarak okside glutasyonu (GSSG) yeniden redükler. Sonuçta, NADPH'in absorbansında oluşan azalma 340 nm'de ölçülür.



Ayıracılar

1. Fosfat tamponu (50 mM, pH : 7.2): K₂HPO₄ ve KH₂PO₄ kullanılarak hazırlandı. Tampon, kahverengi şişede, 4°C' de 1 yıl stabildir.
2. Reaksiyon karışımı:
EDTA (0.3 mM),
NADPH (0.1 mM) (Sigma, N 1630),
GR (0.5 U) (Sigma, G 6004),
NaN₃ (0.5 mM).
2.21 mg EDTA, 1.666 mg NADPH, 14 mg GR ve 0.65 mg NaN₃ tartılıp 15 ml fosfat tamponunda çözüldü.
- 3- GSH (2.5 mM) (Sigma, G 4251)
- 4- t-BuOOH (0.4 mM) (Sigma, B 2633)

Homojenat hazırlanması

Yaklaşık 50-100 mg kesilen karaciğerler, PBS çözeltisiyle yıkandı ve 1ml potasyum fosfat tamponunda (50 mM, pH: 7.2) soğuk buz içine konan ependorflarda homojenize edildi. Homojenat, 10,000 x g de 15 dakika 4°C de santrifüj edildi. Süpernatantlarda Se-GSH-Px aktivitesi ölçüldü.

Yöntem

Süpernatantların her biri için, GSH içeren (GSH (+)) ve GSH içermeyen (GSH (-)) olmak üzere ikişer deney tüpü hazırlandı.

Ayıracılar	GSH (+)	GSH (-)
Reaksiyon karışımı (µl)	750	750
Süpernatant (µl)	50	50
GSH (µl)	100	-
Distile su (µl)	-	100
t-BuOOH (µl)	100	100

t-BuOOH eklenmesiyle birlikte her numunede 340 nm'de ve 37 °C'de GSH (+) ve GSH (-) deneylerinin 3 dakika süresince absorbans ölçümleri yapıldı.

Aktivitenin hesaplanması

GSH (+) ve GSH (-) tüplerine ait absorbans farkları (ΔOD) bulundu. Daha sonra, bu değerler aşağıdaki formülde yerine konularak Se-GSH-Px aktivitesi hesaplandı.

$$\text{IU/g protein} = (\Delta\text{OD}/\Delta t[\varepsilon \times \% \text{ g protein} \times V/V])$$

$$\text{IU/g protein.} = [(\Delta\text{OD}/\text{dak} \times 10^5)]/6.22 \times \text{protein}^a \times \text{homojenat hacmi}^b$$

a: % g

b: mikrolitre homojenat/ml reaksiyon karışımı

$$\text{GSH-Px (IU/g protein)} = [(\Delta\text{OD}/\text{dak} \times 10^5)]/311 \times \% \text{ g protein}$$

3.2.5.7. Glutatyon-S-Transferaz (GST) Aktivitesinin Tayini

GST aktivitesi, Cohen ve arkadaşlarının (270) yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Prensip

GSH ve 1-kloro-2,4-dinitrobenzen'in substrat olarak kullanıldığı metodun prensibi, GST enzimi tarafından tiyoeter-2,4-dinitrofenil glutatyon bileşiğinin oluşması ve bu sırada 340 nm'deki absorpsiyon değişiminin GST aktivitesi ile ilişkili olması esasına dayanır.

Ayırıcılar

1. Fosfat tamponu (0.1 M, pH: 6.5): K_2HPO_4 ve KH_2PO_4 kullanılarak hazırlandı.
2. 1-kloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) (10 mM): 0.0020 g CDNB önce 200 ml etanolde çözüldü ve üzerine 800 ml tampon eklenerek total hacim 1 litreye tamamlandı.
3. GSH (10 mM): 0.003070 g GSH 1ml tamponda çözüldü.

Homojenat hazırlanması

Yaklaşık 80-100 mg lık kesilen karaciğerler, PBS çözeltisiyle yıkandı ve 1ml potasyum fosfat tamponunda (100 mM, pH: 6.5) soğuk buz içine konan ependorflarda homojenize edildi. Homojenat, 10,000 x g de 15 dakika 4°C de santrifüj edildi. Süpernatantlarda GST aktivitesi ölçüldü.

Yöntem

Ayırıcılar	Numune
GSH (µl)	100
CDNB (µl)	100
Tampon (µl)	725
Süpernatant (µl)	75

Deneyden önce tampon 30°C'de 5 dk. bekletildi. Substratın (CDNB) eklenmesiyle reaksiyon başlatıldı ve 340 nm'deki absorpsiyon değerleri 6 dakika boyunca kaydedildi.

Aktivitenin Hesaplanması

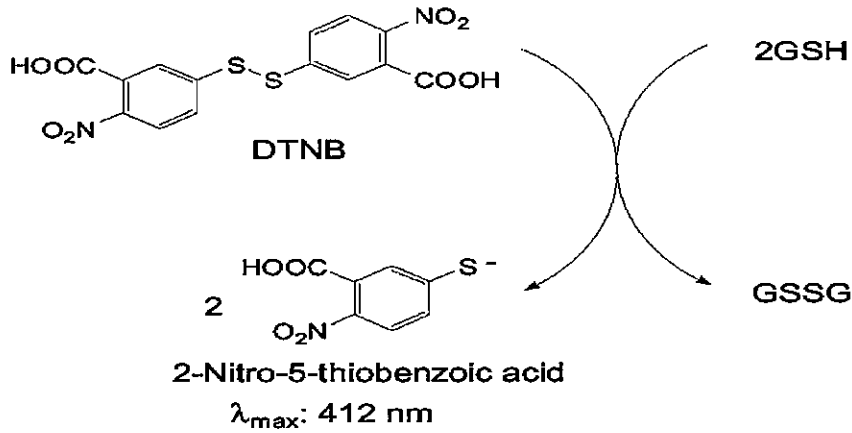
Absorbans ölçümlerinin ΔOD 'si hesaplanarak, sonuçlar U/g protein olarak belirlendi.

3.2.5.8. Redükte Glutatyon (GSH) Tayini

Redükte glutatyon düzeyleri, Seldak ve Linsey'in (271) doku GSH ölçüm yöntemi ile Fairbanks ve Klee'nin (272) GSH ölçüm yönteminin bir kombinasyonu oluşturularak ölçüldü.

Prensip

Nonprotein sülfidril gruplarının hepsi redükte glutatyon formundadır. 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) bir disülfid kromojendir ve sülfidril bileşikler ile indirgenerek koyu sarı bir renk verir. Oluşan sarı rengin absorbansı 412 nm'de ölçülür.



Şekil 3.2.1. GSH ölçüm prensibi

Ayırıcılar

1. Trikloroasetik asit (% 50 (w/v)).
2. Fosfat solüsyonu (Na_2HPO_4) (0.3 M). Solüsyon, 4 °C' de uzun süre stabildir.
3. DTNB solüsyonu: 40 mg 5,5'- ditiyobis (2-nitrobenzoik asit), 1g / dl' lik sodyum sitrat solüsyonu içinde çözüldükten sonra, hacim bu solüsyon ile 100 ml' ye tamamlanır. Bu solüsyon 4°C' de uzun süre dayanıklıdır.
4. GSH (Sigma, G 4251)

Homojenat Hazırlanması

Yaklaşık 50-100 mg lık kesilen karaciğerler, PBS çözeltisiyle yıkandı ve 2 ml potasyum fosfat tamponunda (50 mM, pH: 6.7, içinde 1mM EDTA bulunmaktadır) soğuk buz içine konan ependorflarda homojenize edildi. Homojenat, 10,000 x g de 15 dakika 4°C de santrifüj edildi. Süpernatantlarda GSH miktarı ölçüldü.

Yöntem:

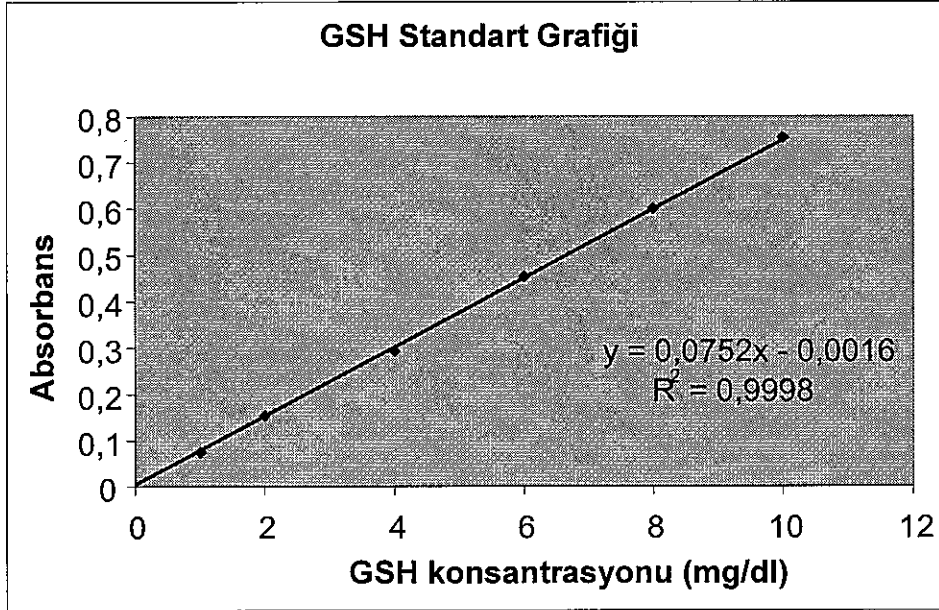
1 ml süpernatant üzerine 0.8 ml bidistile su ve 0.2 ml % 50' lik TCA eklendi. Tüpler iyice vortekslendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen süzüntüye aşağıdaki işlem uygulandı.

Ayrıçalar	Kör	Standart	Numune
Süzüntü (µl)	-	-	500
% 50 TCA (µl)	300	-	-
Distile su (µl)	200	-	-
Fosfat solüsyonu (µl)	2000	2000	2000
DTNB (µl)	250	250	250
Standart (µl)	-	500	-

Tüm tüpler iyice karıştırıldı ve 4 dakika içinde 412 nm' de absorbanları okundu.

Standart Hazırlanması

GSH kullanılarak, konsantrasyonları 1, 2, 4, 6, 8, ve 10 mg/dL olan GSH standartları distile su içinde hazırlandı ve aynen numune gibi çalışıldı. Her bir standart 3 kez çalışıldı ve absorbanlarının ortalamaları alındı. Standartlar için elde edilen absorban değerleri, konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi.



Şekil 3.2.2.2. GSH standart grafiği

Hesaplama

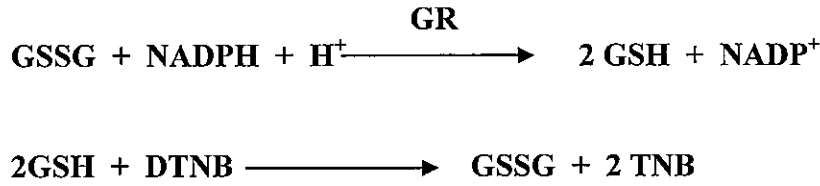
Numunelerin GSH içerikleri, standart grafiğinden hesaplandı. Numunelerin protein konsantrasyonları ölçüldü. Her bir numuneye ait GSH sonuçları, mg /g protein olarak belirlendi.

3.2.5.9. Okside Glutatyon (GSSG) Tayini

Okside glutatyon (GSSG) konsantrasyonu Ferreira (273), ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak ölçüldü.

Prensip

Öncelikle ortamda bulunan GSH, 4-vinil piridin (4-VP) ile inhibe edilir. GSSG, NADPH ve glutatyon redüktaz (GR) ile enzimatik olarak GSH'a indirgenir. Oluşan GSH, non-enzimatik olarak 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyona girer ve 2-nitro-5-tiyobenzoik asit (TNB) meydana gelir. TNB'nin optik dansitesinde zamana bağlı olarak meydana gelen artış hızı, ortamdaki GSSG konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.



Ayırıcılar

Fosfat/EDTA solüsyonu [(fosfat (0.125 mol/l)],[EDTA (6.3 mmol/l)], pH:7.5

1. NADPH (0.3 mmol/l)
2. DTNB (6 mmol/l)
3. Glutatyon redüktaz (GR)
4. 4-Vinilpiridin (4-VP)

Homojenat hazırlanması

Yaklaşık 50-100 mg lık kesilen karaciğerler, PBS çözeltisiyle yıkandı ve 2 ml potasyum fosfat tamponunda (50 mM, pH: 6.7, içinde 1mM EDTA bulunmaktadır) soğuk buz içine konan ependorflarda homojenize edildi. Homojenat, 10,000 x g de 15 dakika 4°C de santrifüj edildi. Süpernatantlarda GSSG miktarı ölçüldü.

Yöntem

1 ml süpernatant üzerine 0.8 ml bidistile su ve 0.2 ml % 50' lik TCA eklendi. Tüpler iyice vortekslendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, süzgeç kağıdından süzüldü. Elde edilen filtrata aşağıdaki yöntem uygulandı.

500 µl filtrat ile 5 µl 4-VP karıştırılarak oda ısısında 60 dakika inkübe edildi. Bu inkübasyon karışımı aşağıdaki yöntemde kullanıldı.

Ayır�lar		Numune
NADPH	(�l)	700
DTNB	(�l)	100
�nkubasyon karışımı	(�l)	100

4 dakika 30  C' de inkübe edildi.

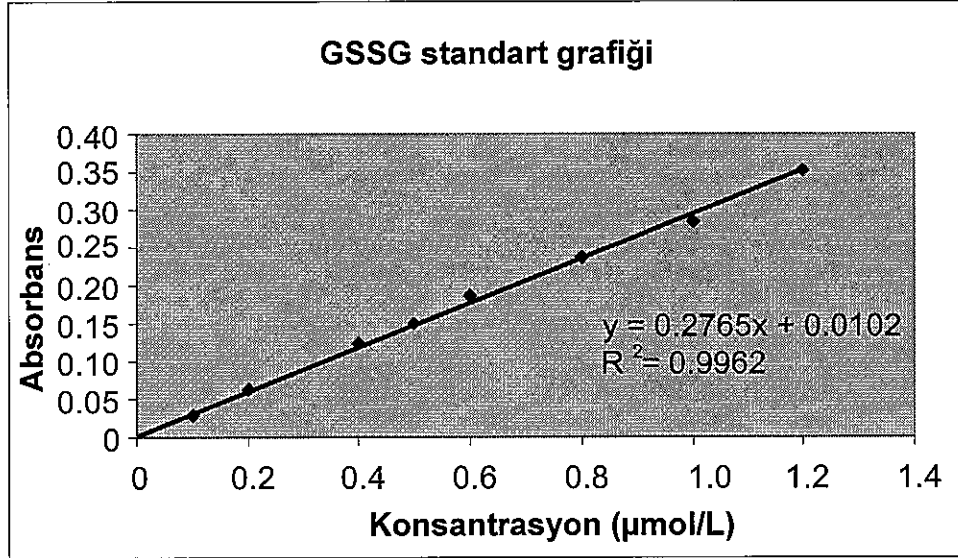
GR	(�l)	20
----	------	----

412 nm dalga boyunda ve 30  C'de 6 dakika boyunca absorbans artışı kaydedildi.

Numunelerin GSSG konsantrasyonları standart grafiğinden hesaplandı. Ayrıca, numunelerin protein konsantrasyonları tayin edildi. GSSG konsantrasyonu  mol/g protein şeklinde verildi.

Standart Hazırlanması

GSSG kullanılarak, konsantrasyonları 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.0 ve 1.2  mol/l olan GSSG standartları distile su içinde hazırlandı ve numune gibi çalışıldı. Her bir standart 3 kez çalışıldı ve absorbanslarının ortalamaları alındı. Standartlar için elde edilen absorbans değerleri, konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi ve sonuçta aşağıda gösterilen grafik elde edildi.



Şekil 3.2.3. GSSG standart grafiği

Hesaplama

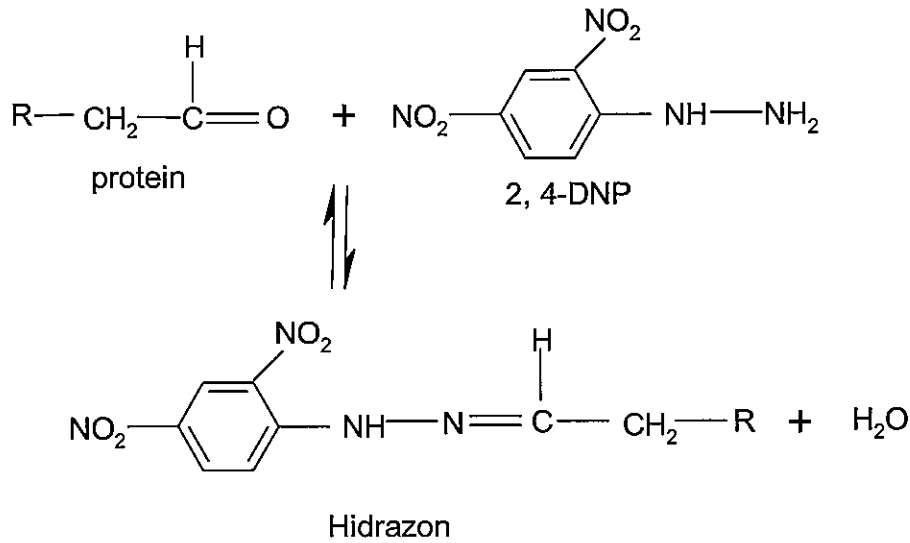
Numunelerin GSSG konsantrasyonları, standart grafiğinden hesaplandı. Numunelerin protein konsantrasyonları  l ld . Her bir numuneye ait GSSG sonuçları, mg /g protein olarak belirlendi.

2.5.10. Protein Karbonil Grupları Tayini

Protein karbonil (PK) grupları kit (Cayman, Katalog. No:10005020.) kullanılarak ölçüldü.

Prensip

Protein karbonil ölçümü için, klasik bir karbonil reaktifi olan 2,4- dinitrofenil hidrazin (DNPH) kullanır. DNPH, protein karbonil grupları ile birleştiğinde renkli bir hidrazon oluşturur ve oluşan hidrazonun absorbanansı 360 nm' de okunur.



Ayırıcılar

1. 2, 4 - dinitrofenil hidrazin (DNP), (10 mM)
2. Hidroklorik asit (2,5 M)
3. Trikloroasetik asit (%10, %20 (w/v))
4. Sodyum hidroksit (1 M)
5. Guanidin hidroklorit
6. Etanol
7. Etil Asetat

Homojenat hazırlanması

Yaklaşık 200-300 mg kesilen karaciğer PBS (pH 7.4) ile birkaç kez yıkandı. Kesitler, yaklaşık 1-2 ml soğuk potasyum fosfat tamponunda (50 mM, pH 6.7, 1 mM EDTA) soğuk buz içine konan ependorflarda homojenize edildikten sonra 10,000 x g de 15 dakika 4°C de santrifüj edildiler. Süpernatantlarda PK düzeyleri ölçüldü.

Yöntem

Her numuneden 200'er µl numune tüpüne, 200 µl kontrol tüpüne konuldu. Numune tüpüne 800 µl DNPH, kontrol tüpüne 800 µl HCl ilave edilerek 1 saat inkübe edildi. Daha sonra bütün tüpler sırası ile %20 ve %10 TCA eklenerek 5 dakika inkübe ve her basamağın ardından 4 C⁰'de 10,000 g'de 10 dakika santrifüj edildiler. Pelletler (1:1) etanol/etil asetat karışımı içerisinde resüspanse edildikten

sonra 4 C⁰'de 10,000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bu basamak iki kez tekrarlandı. Daha sonra, protein peletleri 500 µl guanidin hidroklorit içerisinde vortekslenerek resüspanse edilerek 4⁰C'de 10,000 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Absorbanslar, 360 nm dalga boyunda plate reader kullanarak ölçüldü.

Hesaplama:

Kontrolün absorbansı numune absorbansından çıkartılarak aradaki absorbans farkı bulundu. Bulunan bu değer dilüsyon faktörü ile çarpılıp dinitrofenilhidrazin için 370 nm'de molar absorblama katsayısı ve protein miktarına bölünerek karbonil miktarı belirlendi.

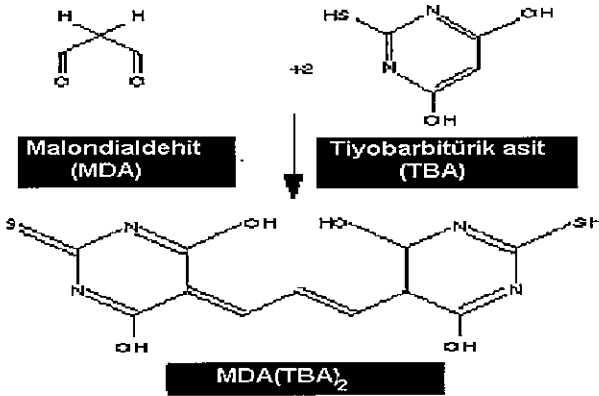
$$\text{Protein karbonil (nmol/ml)} = \left[\frac{\text{Absorbans}}{0.011} \right] \times \left(\frac{500}{200} \right)$$
$$\text{Protein karbonil (nmol/mg protein)} = \frac{\text{Protein karbonil (nmol/ml)}}{\text{Protein (mg/ml)}}$$

3.2.5.11. TBARS Tayini

MDA düzeyleri, Gümüşlü ve arkadaşları (274) ile Wasowicz ve arkadaşlarının yöntemleri (262) kullanılarak ölçüldü.

Prensip

Bu metodun temel prensibi, bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın 1 molünün 2 mol 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan bileşiğin, asidik ortamda n-bütanol fazına ekstrakte edilerek, 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boylarında spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır.



Şekil 3.2.4.1. TBARS reaksiyonu

Homojenat hazırlanması

Karaciğer dokuları, serum fizyolojikle yıkanıp küçük parçalara ayrıldıktan sonra, 50 mM fosfat tamponu içinde, sonifikatör yardımıyla soğukta homojenize edildiler.

Ayrıçalar

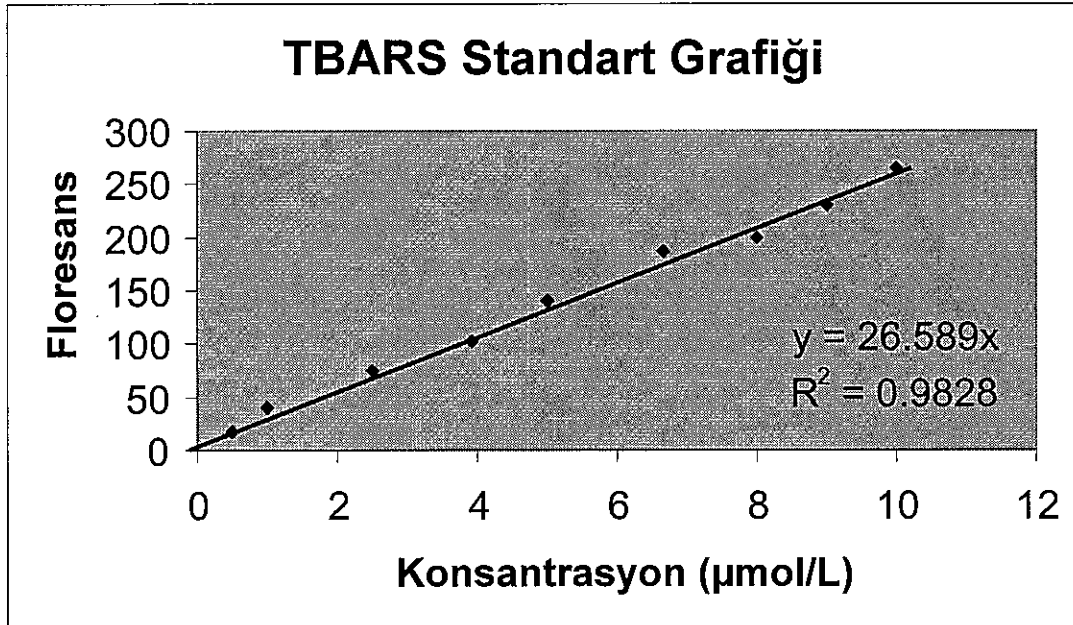
1. 2-tiyobarbitürük asit (TBA) (29 mM) (8.75 M asetik asit içinde hazırlanır).
2. Hidroklorik asit (5 M)
3. n-Bütanol
4. 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Sigma, T 9889)

Yöntem:

Tüplere 1 ml distile su kondu. Bu tüplere 50 µl numune ilave edildi. 1 ml TBA eklendikten sonra tüplerin ağzı sıkıca kapatıldı ve 60 dakika 100°C' de kaynayan su banyosunda inkübe edildi. Tüpler, oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra, her birinin üzerine 25 µl HCl eklenerek, pH'nın 1.6-1.7 olması sağlandı. Daha sonra 3.5 ml n-bütanol eklenerek tüpler 5 dakika vortekslendi. Floresansı ölçülecek olan TBARS, numunelerin 4°C' de 3500 x g' de 10 dakikalık santrifügasyonları sonucu bütanol fazına geçirildi. Bütanol fazının floresansı 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boylarında spektrofluorometrede ölçüldü. TBARS konsantrasyonları, grafikten nmol / ml olarak hesaplandı. TBARS sonuçları, nmol / mg protein şeklinde verildi.

Standart Hazırlanması

1,1,3,3-tetraetoksipropan kullanılarak 0.5, 1, 2.5, 4, 5, 7, 8, 9 ve 10 µmol/L' lik standart solüsyonlar hazırlandı ve numune gibi çalışılarak konsantrasyonlara karşı floresans değerlerini içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.2.4. TBARS standart grafiği.

Hesaplama

Numunelerin TBARS içerikleri, standart grafiğinden hesaplandı. Numunelerin protein konsantrasyonları ölçüldü. Her bir numuneye ait TBARS sonuçları, µmol/g protein olarak belirlendi.

2.5.12. Antioksidan Potansiyel (AOP) Tayini

AOP tayini, kit (Cayman, Kat.No: 709001) kullanılarak yapıldı.

Homojenat Hazırlanması

Çalışma zamanına kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilen dokular, küçük parçalara ayrıldıktan sonra, potasyum fosfat tamponu (pH 7.4) içinde sonikatör yardımıyla soğukta homojenize edildi. Karışım 10,000 x g de 15 dakika 4°C de santrifüj edildi. Süpernatantlarda AOP düzeyleri ölçüldü.

Prensip

Kullanılan kit, vitaminler, proteinler, lipidler, glutatyon, ürik asit ve benzeri gibi antioksidanların kombine potansiyellerini ölçer. Deneyin prensibi, numunede bulunan antioksidanların 2,2'-azino-di-3-etilbenziazolin sulfonatın (ABTS) metmyoglobin varlığında ABTS^{•+} ye oksidasyonunu inhibe etme potansiyellerine dayanır. Oluşan ABTS^{•+} 'nin absorbanı 750 nm' de okunur.

Ayırıcılar

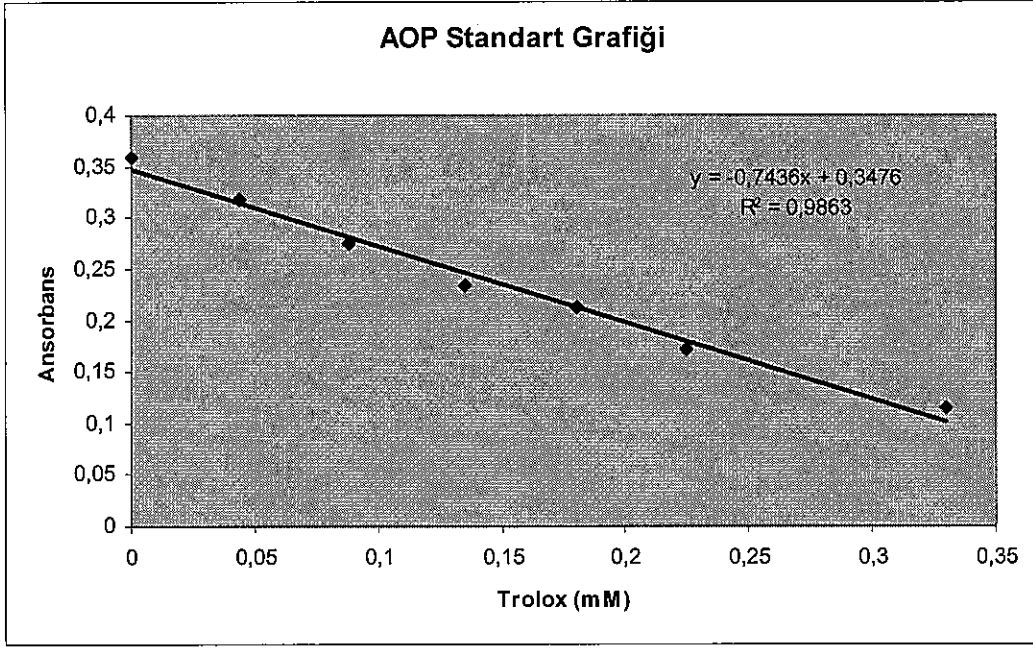
1. Potasyum fosfat tamponu (5mM) (pH 7.4)
2. ABTS (2,2'-azino-di-3-etilbenziazolin sulfonat)
3. Metmyoglobin
4. Trolox
5. H₂O₂

Yöntem:

96 kuyucuğa her bir standart ve numuneden 10 µl konuldu. Üzerlerine 10 µL ABTS ve 150 µl trolox ilave edildi. Reaksiyon 10 µl H₂O₂ eklendikten sonra başlatıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika beklendikten sonra, plate reader kullanılarak 750 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. AOP konsantrasyonları, standart grafiğinden mM olarak hesaplandı. AOP sonuçları, mM / mg protein şeklinde verildi.

Standart Hazırlanması

Liyofilize toz şeklinde bulunan trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilikasid) 1 ml distile suda çözülerek troloks stok çözeltisi hazırlandı. Stoktan 0.044, 0.088, 0.135, 0.180, 0.225 ve 0.330 mM'lık standart solüsyonlar hazırlandı ve numune gibi çalışılarak konsantrasyonlara karşı absorban değerlerini içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.2.5. AOP standart grafiği.

Hesaplama

Numunelerin AOP içerikleri, standart grafiğinden hesaplandı. Numunelerin protein konsantrasyonları ölçüldü. Her bir numuneye ait AOP sonuçları, mmol/g protein olarak belirlendi.

3.2.5.13. Nitrat/Nitrit Tayini

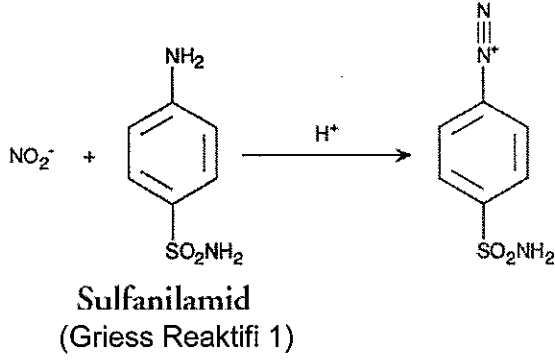
Nitrit (NO_2) ve nitrat (NO_3) düzeyleri, kit (Cayman Chemical Ann Arbor, MI, Kat.No: 780001) kullanılarak ölçüldü.

Prensip

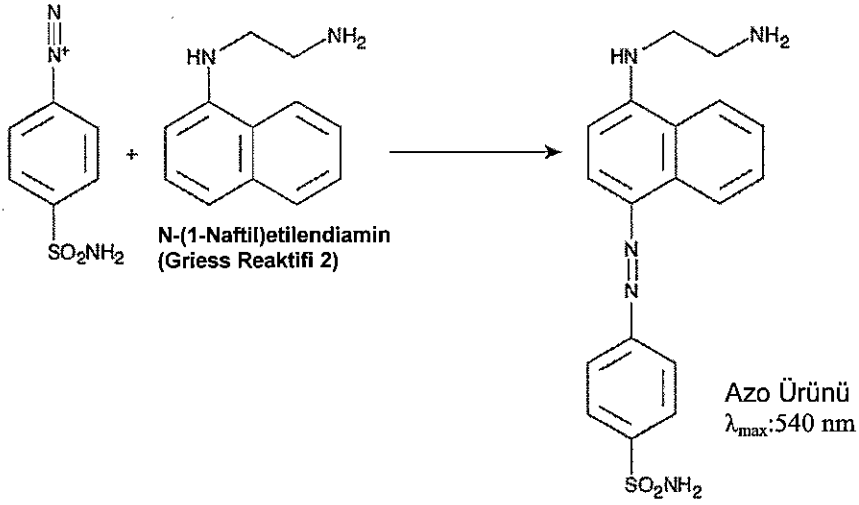
Birinci aşamada, nitrat nitrat redüktaz yardımıyla nitrite dönüşür.



İkinci aşamada, Griess reaktifi ilavesi ile nitrit menekşe renkli diazo bileşiğine dönüşür.



Oluşan azo kromoforunun 540 nm’de verdiği absorbans ortamdaki NO_2^- konsantrasyonuyla orantılıdır.



Ayırıcılar

1. Deney tamponu
2. Nitrat redüktaz
3. Enzim kofaktörü
4. Nitrat standartı
5. Nitrit standartı
6. Griess reaktifi 1 ve 2

Homojenat Hazırlanması

Çalışma zamanına kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilen dokular, küçük parçalara ayrıldıktan sonra, PBS tamponu içinde (pH 7.4) sonikatör yardımıyla soğukta homojenize edildiler. Homojenat $10,000 \times g$ de 20 dakika 4°C de santrifüj edildi. Süpernatantlarda NO_2 ve NO_3 düzeyleri ölçüldü.

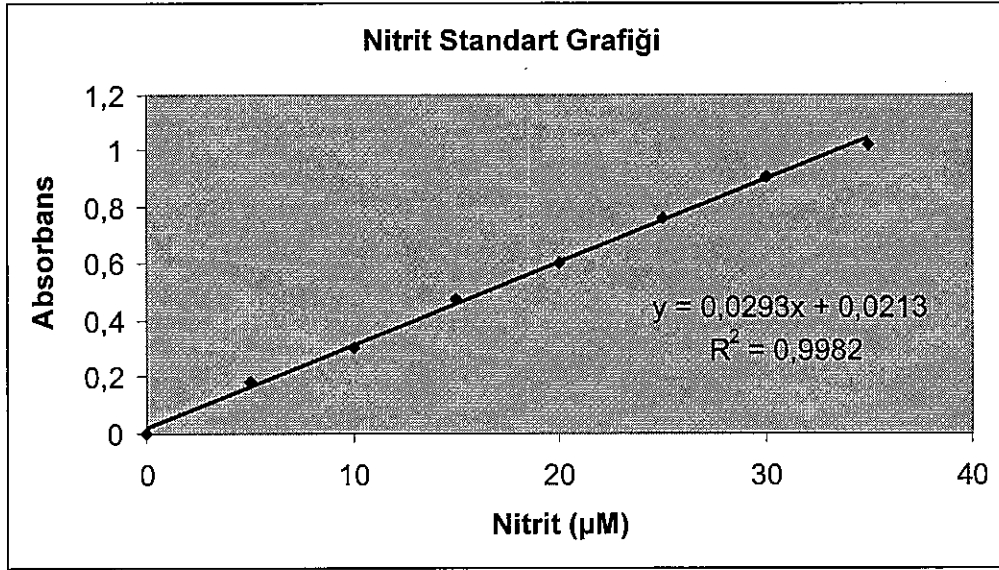
Nitrat+ nitrit tayini

96 kuyucuğun her birine 80 µl standart ve numuneler konulurken kör kuyucuğuna sadece 200 µl deney tamponu eklendi. Standart ve numune kuyucuklarına 10 µl enzim kofaktör karışımı ve 10 µl nitrat redüktaz enzim karışımı eklendikten sonra plakanın üzeri kapatıldı. Oda ısısında 1 saat beklenerek inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda 50 µl Griess Reaktifi 1 (R1) ve hemen ardından 50 µl Griess Reaktifi 2 (R2) ilave edildi. Oda ısısında 10 dakika beklenerek oluşan renk 540 nm dalga boyunda ölçüldü. Nitrit konsantrasyonları, standart grafiğinden µM olarak hesaplandı. Sonuçlar, µM / mg protein şeklinde verildi

96 kuyucuğun her birine 100 µl standart ve numuneler konulurken, kör kuyucuğuna sadece 200 µl deney tamponu eklendi. Standart ve numune kuyucuklarına 50 µL Griess Reaktifi 1 (R1) ve hemen ardından 50 µl Griess Reaktifi 2 (R2) ilave edildi. Oda ısısında 10 dakika beklenerek renk oluşumu 540 nm dalga boyunda ölçüldü. Nitrat konsantrasyonları, standart grafikten µM olarak hesaplandı. Sonuçlar, µM / mg protein şeklinde verildi.

Standart Hazırlanması

Sıvı şekilde bulunan 100 µl nitrit üzerine 900 µl deney tamponu ilave edilerek 200 µM stok nitrit çözeltisi hazırlandı. Stoktan 5,10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µM'lık standart solüsyonlar hazırlandı ve numune gibi çalışılarak konsantrasyonlara karşı absorbans değerlerini içeren standart grafiği çizildi.



Şekil 3.2.6. Nitrit standart grafiği.

Konsantrasyonun Hesaplanması

Standart grafiği kullanılarak nitrat ve nitrit konsantrasyonları hesaplandı.

$$[\text{Nitrat} + \text{Nitrit}] (\mu\text{M}) = \left(\frac{A_{540} - y \text{ kesişim noktası}}{\text{Eğim}} \right) \left(\frac{200 \mu\text{L}}{\text{Numune hacmi} (\mu\text{L})} \right) \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

$$[\text{Nitrit}] (\mu\text{M}) = \left(\frac{A_{540} - y \text{ kesişim noktası}}{\text{Eğim}} \right) \left(\frac{200 \mu\text{L}}{\text{Numune hacmi} (\mu\text{L})} \right) \times \text{Dilüsyon faktörü}$$

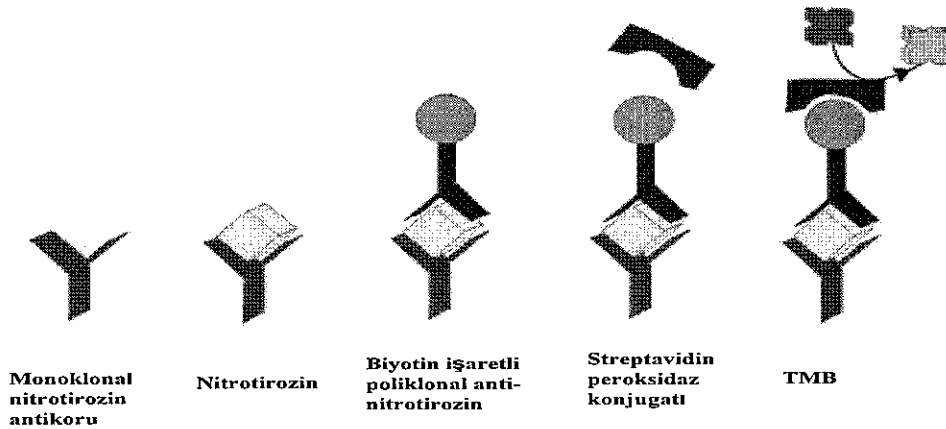
$$[\text{Nitrat}] (\mu\text{M}) = [\text{Nitrat} + \text{Nitrit}] - [\text{Nitrit}]$$

3.2.5.14 Nitrotirozin Tayini

Nitrotirozin düzeyleri, kit (Oxis research, Kat.No: 21055) kullanılarak ölçüldü.

Prensip

Nitrotirozin, ELISA prensibiyle ölçülür. Katı faz monoklonal antikorcea yakalanan antijen daha sonra biyotin işaretli keçi poliklonal anti-nitrotirozin ile belirlenir. Streptavidin peroksidaz konjugatı biyotinlenmiş antikora bağlanır ve ortama ilave edilen tetrametilbenzidin (TMB) substratı ile oluşan sarı renkli ürünün absorbansı 450 nm dalga boyunda ölçüldü.



Şekil 3.2.7. Nitrotirozin ölçüm prensibi

Ayır lar

1. Dilüsyon tamponu (PBS)
2. Nitrotirozin standartı
3. Nitrotirozin antikoru
4. Streptavidin peroksidaz
5. Yıkama yamponu (Tween-20 içerir)
6. Stop çöztisi
7. Daha önceden nitrotirozin antikoru ile kaplanmış plakalar

Homojenat Hazırlanması

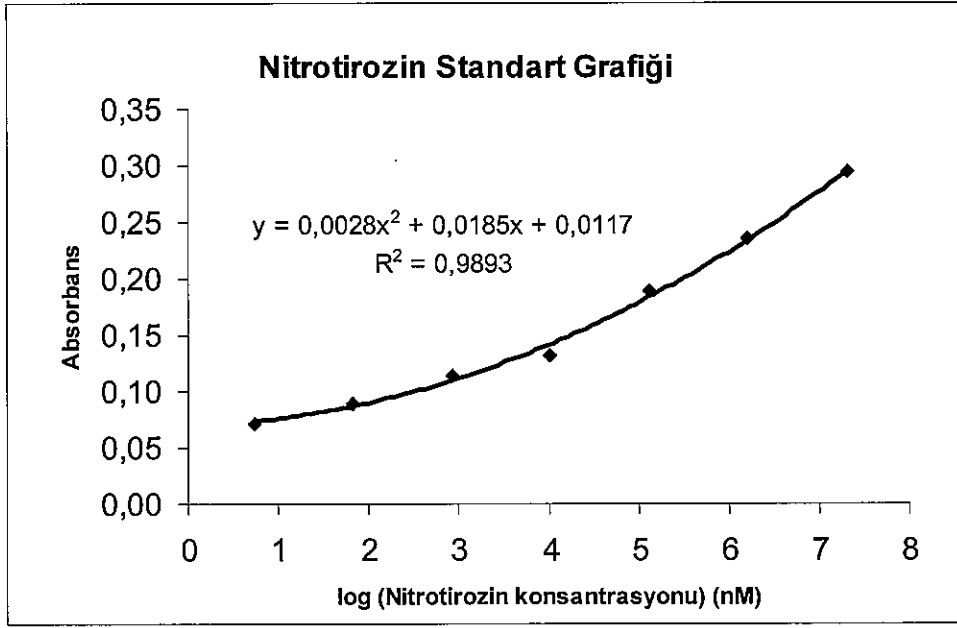
Çalışma zamanına kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edilen dokular, küçük parçalara ayrıldıktan ve serum fizyolojik ile birkaç defa yıkandıktan sonra, fosfat tamponu (50 mM, pH 7.4) içinde sonikatör yardımıyla soğukta homojenize edildiler. Homojenat 10,000 x g de 15 dakika 4°C de santrifüj edildi. Süpernatantlarda nitrotirozin düzeyleri ölçüldü.

Yöntem

96 kuyucuğun her birine 100 µl standart, kontrol ve numuneler konulurken, kör kuyucuğuna sadece 100 µl dilüsyon tamponu eklendi. Plak, üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra kuyucuklar 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı. Temiz bir süzgeç kağıdı üzerinde ters çevrilen petrinin içeriği tamamen boşaltıldı. 100 µl nitrotirozin antikoru ilave edildikten sonra plak üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Sürenin bitiminden sonra, kuyucuklar 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı. Temiz bir süzgeç kağıdı üzerinde ters çevrilen plakin içeriği tamamen boşaltıldı. 100 µl streptavidin peroksidaz eklendi. Plak üzeri kapatılarak 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Kuyucuklar 4 defa yıkama tamponuyla yıkandı. Temiz bir süzgeç kağıdı üzerinde ters çevrilen plak içeriği tamamen boşaltıldı. 100 µl TMB substratı konularak üzeri kapatılan plak, karanlık bir yere alınarak oda ısısında 30 dakika inkübe edildi. 100 µl stop solüsyonu eklendi ve karıştırıldıktan sonra 450 nmdeki absorbanslar kaydedildi. Nitrotirozin konsantrasyonları, standart grafikten nM olarak hesaplandı. Sonuçlar, nM / mg protein şeklinde verildi.

Standart Hazırlanması

Sıvı şekilde bulunan 100 µl nitrotirozin üzerine 900 µl deney tamponu ilave edilerek, 4.5 µM stok NT çöztisi hazırlandı. Stoktan 0, 2.1, 6.2, 18.5, 55.6, 166.7, 500 ve 1500 nM'lık standart solüsyonlar hazırlandı ve numune gibi çalışılarak konsantrasyonlara karşı absorbans değerlerini içeren standart grafiği çizildi.



Hesaplama:

Nitrotirozin konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.5.15 Protein Tayini

Dokuların protein içerikleri, Lowry' nin metoduna göre bovine serum albümin (BSA) standardı kullanılarak ölçüldü (275).

Prensip

Alkali şartlarda Cu^{+2} iyonu proteinlerdeki peptid bağları bir kompleks oluşturur. Oluşan kompleks, sarı renkli Folin Ciocalteu reaktifi (polifosfomolibdik ve polifosfotungstik asit) ile reaksiyona girer ve molibdenyum ve tungsten mavisine indirgenen kararsız bir ürün oluştururlar. Oluşan mavi rengin absorbansı 750 nm' de okunur.

Ayıraçlar

1. D Reaktifi:

Na_2CO_3 (% 2 susuz) (10 ml)

CuSO_4 (% 1) (0.1 ml)

Na-K tartarat (% 2) (0.1 ml)

2. NaOH (1 N)

3. Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF) reaktifi (Sigma F-9252): FCF, protein tayini için, distile su ile 1/1 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

4. Bovin serum albumin (BSA) (Sigma, A 7906)

Yöntem:

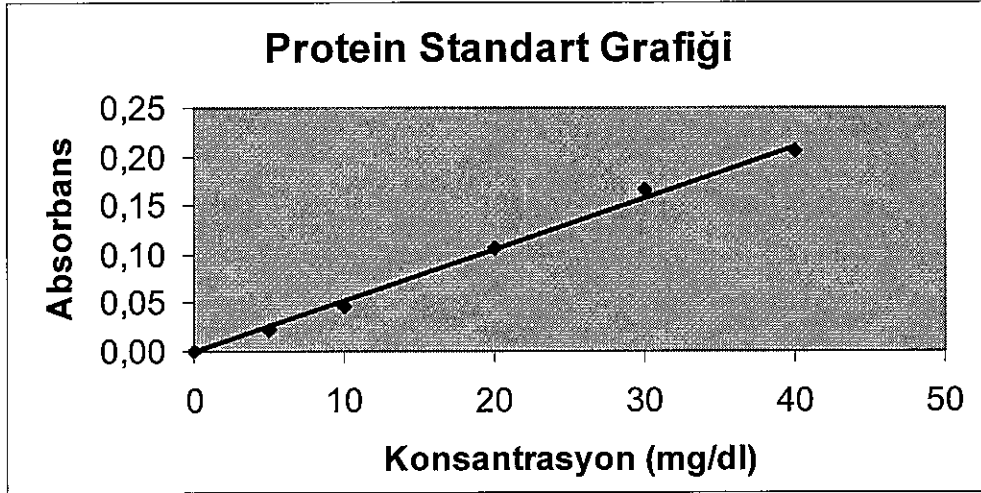
Çalışmamızda karaciğer dokusunda ölçülen parametreler protein başına hesaplandığı için, süpernatantlar her bir parametre için gerekli olan dilüsyonlara uygun olarak hazırlandı. Dilüe edilen süpernatantlarda protein tayini aşağıdaki prosedüre göre yapıldı.

Ayırıcılar	Kör	Standart	Numune
Distile su (ml)	0.1	—	—
Standart (ml)	—	0.1	—
Numune (ml)	—	—	0.1
NaOH (ml)	0.1	0.1	0.1
D Reaktifi (ml)	1.0	1.0	1.0
Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi.			
FCF reaktifi (ml)	0.1	0.1	0.1
Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.			
Distile su (ml)	2.0	2.0	2.0

Kör, standart ve numune tüpleri birkaç kez alt üst edildikten sonra, standartların ve numunelerin absorbanları 750 nm' de köre karşı okundu. Numunelerin protein konsantrasyonları, grafikten hesaplandı.

Standart Hazırlanması

Protein standartları, 5, 10, 20, 30 ve 40 mg/dl konsantrasyonlarda BSA kullanılarak hazırlandı ve aynen numune gibi 3'er kez çalışıldı. Standartların absorban değerleri, konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi ve böylece standart grafiği elde edilmiş oldu.



Hesaplama:

Protein konsantrasyonları, standart grafiği kullanılarak hesaplandı.

3.2.6. Aortun Patolojik İncelenmesi

Damar lümenlerindeki değişikliklerin incelenmesi "classification of vascular lesions of the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association" uyarınca yapıldı (276). Kesilen aortlar %10 formaldehit çözeltisinde fikse edildi. Distal, orta ve proksimal segmentlerden alınan örnekler, parafine gömülerek 5µm kalınlığında kesildi ve hematoxylin-eosin ve Verhoeff Van Gieson's elastin boyasıyla boyandı. Amerikan Kalp Derneği Ateroskleroz Sınıflaması yapıldı.

3.2.7. Morfometrik Analiz:

Morfometrik analiz için ölçümler, her vakanın en çok etkilenen segmentlerinin kesitleri seçilerek Verhoeff Van Gieson's elastin boyalı preparatlar üzerinde yapıldı. Ölçümlerde, ışık mikroskobu (Zeiss Axioscope 2 plus, Zeiss, Göttingen, Germany), mikroskop üzerine monte edilmiş dijital kamera (Zeiss, Axiocam MRC TV2/3" C, Germany) ve özel görüntü analiz yazılımı [Axiovision Release 4.2 (06-2004)] bileşenlerini içeren sistem kullanıldı. İnternal elastik lamina çevresi (IELC), intima alanı, media alanı, intima genişliği ve media genişliği ölçüldü. Bu ölçümler uyarınca, intimadan mediaya kadar olan çap (Lumen + intima çapı (DLI) = IELC/π) ve IEL alanı (IEL alanı=IELC²/4π) hesaplandı. Bunlara ek olarak kalınlık ve ateroskleroz gösterimi için Ruengsakulrach ve arkadaşlarının (277) belirttiği 3 metot kullanıldı: 1) lüminal daralma yüzdesi (100 X intima alanı/IEL alanı), 2) intima kalınlık indeksi (ITI) (intima kalınlığı/media kalınlığı) 3) intimanın mediaya oranı (IMR) (maksimal intimal kalınlığın görüldüğü bölgedeki intima kalınlığı/ media kalınlığı).

3.3. İstatiksel Analizler

İstatiksel değerlendirilmeler, SPSS paket programı kullanılarak yapıldı. Tüm sonuçlar, ortalama ± standart hata şeklinde verildi. Kontrol ve deney gruplarının ağırlıkları, günlük yem ve su tüketimleri, ölçülen diğer tüm parametrelerin ortalama ± standart hata değerleri ve gruplar arası farklılıklar, "Oneway Anova" ile hesaplandı. Kontrol ve deney gruplarına ait korelasyon analizleri, "Pearson Testi" kullanılarak yapıldı.

3.4. Kullanılan Gereçler ve Kimyasal Maddeler

3.4.1. Gereçler

Spektrofotometreler (Beckman model 26, Shimadzu UV- 1601)
Flow sitometri cihazı (Becton Dickinson, FACS calibur)
Su banyosu (Precitherm PFV Boehringer-Mannheim, Memmert)
Santrifüj (Heraeus Sepetech Biofuge 15R)
Hassas terazi (Sartorius 2472)
Derin dondurucu (Karteknik marka)
Buz dolabı (Ariston, No-frost)
Santrifüj tüpleri
Deney tüpleri
Heparinli tüpler

Ependorf tüpler (1.5 ml'lik ve 2 ml'lik)
Otomatik pipetler (Gilson marka, 20-200 ve 100-1000 µl kapasiteli)
Cam pipetler (1, 2, 3, 5 ve 10 ml'lik)
Cam balonjojeler, mezürler, erlenmayerler ve beherler, huniler
Süzgeç kağıtları

Kimyasal Malzemeler

Tüm kimyasal maddeler, Merck ve Sigma' dan temin edildi.

BULGULAR

4.1. Genel Görünüm

Kontrol grubunu oluşturan sıçanların genel görünüm ve davranışlarında herhangi bir farklılık ve göze çarpan bir değişiklik gözlenmemiştir. Kolesterolle beslenen grupların hareketlerinde yavaşlama ve şişmanlama meydana geldiği görülmüştür. Sıçanların tüylerinin beyaz ve parlak olduğu gözlenmiştir.

4.2. Günlük Yem Tüketimleri

Kontrol ve deney grubu hayvanlarının günlük yem tüketimleri Tablo 4.2.1 ve Şekil 4.2.1'de gösterilmiştir. Tüm grupların günlük yem tüketimleri 2 ay 20 günlük deney süresince takip edilmiş ve elde edilen bulgular 100 gram vücut ağırlığı başına tüketilen yem miktarı (g/gün/100 g) olarak belirlenmiştir. İstatiksel analiz sonucunda, K, A ve R grupları arasında yem tüketimleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Kolesterolle beslenen sıçanlar K, A ve R grupları ile yem tüketimleri açısından kıyaslandığında, kolesterolle beslenenlerin daha çok yem tükettikleri görülmüştür. Günlük yem tüketimleri kıyaslandığı zaman, Kol+R grubunda en yüksek yem tüketiminin olduğu bulunmuştur (Tablo 4.2.1 ve Şekil 4.2.1). Kontrol, A ve R grubu sıçanlar arasında yem tüketimleri açısından anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Normal yemle beslenen sıçanların yem tüketimlerine göre, kolesterolle beslenen sıçanların yem tüketimlerinde artma meydana gelmiştir. Kol+R grubu sıçanlarının yem tüketimi ve kolesterol verilen hayvanların yem tüketimi arasında fark bulunamamıştır.

İlaç verilmeden önce ve sonrasındaki günlük yem tüketimleri kıyaslandığında, tüm grupların 2 aylık dönem sonunda yem tüketiminde artış olduğu bulunmuştur.

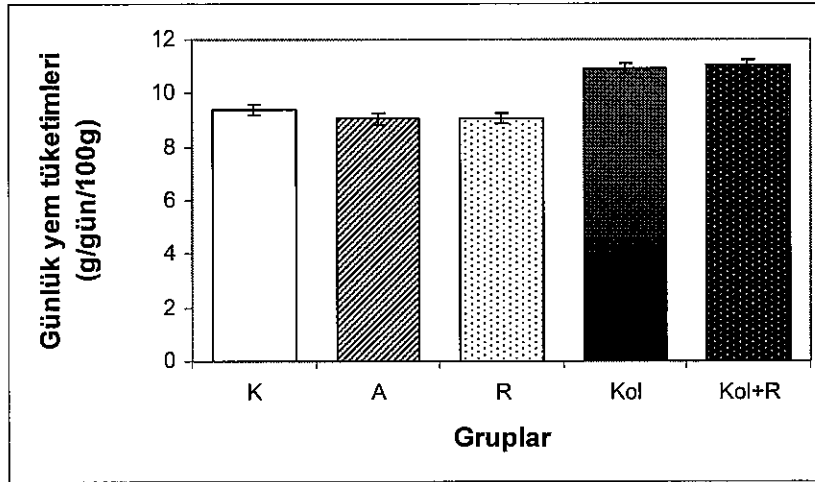
4.3. Günlük Su Tüketimleri

Kontrol ve deney grubu hayvanlarının günlük su tüketimleri Tablo 4.2.1 ve Şekil 4.2.2'de gösterilmiştir. Tüm grupların su tüketimleri 2 ay 20 günlük deney süresince takip edilmiş ve elde edilen bulgular 100 gram vücut ağırlığı başına tüketilen su miktarı (ml/gün/100 g) olarak hesaplanmıştır. Yapılan istatiksel analiz sonucunda, Kol ve Kol+R grubuna ait sıçanların günlük su tüketimlerinin, kontrollere, A ve R grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulunmuştur ($p<0.05$). Kol+R grubunun su tüketiminin K, A ve R grubuna göre daha fazla olduğu bulunmuştur. Günlük su tüketimleri, ilaç verilmeden önce ve ilaç verildikten sonra incelendiği zaman, en yüksek su tüketimlerinin Kol+R grubunda olduğu bulunmuştur. Kontrol, A ve R sıçan gruplarına göre, Kol ve Kol+R sıçan gruplarının su tüketiminde artma meydana geldiği bulunmuştur. Resveratrol verilen grupla Kol grubu kıyaslandığı zaman, aralarında fark olmadığı bulunmuştur.

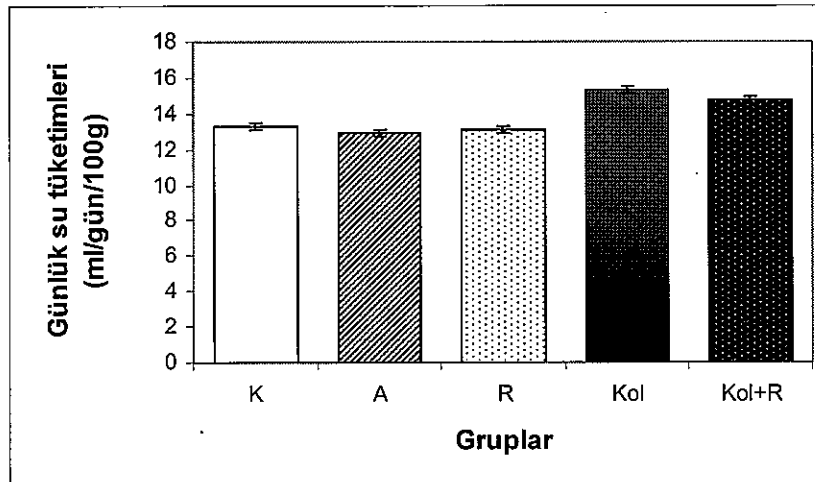
Tablo 4.2.1. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının günlük yem ve su tüketimleri (ortalama±SEM).

	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
Günlük yem tüketimleri (g/gün/100g)	9.36 ± 0.18	9.04 ± 0.32 a: p>0.05	9.05 ± 0.37 b: p>0.05 c: p>0.05	10.93 ± 0.23 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	11.05 ± 0.28 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p>0.05
Günlük su tüketimleri (ml/gün/100g)	13.33 ± 0.24	12.94 ± 0.45 a: p>0.05	13.10 ± 0.52 b: p>0.05 c: p>0.05	15.30 ± 0.71 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	14.73 ± 0.32 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p>0.05

K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + Resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, ı: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması.



Şekil 4.2.1. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının günlük yem tüketimleri.

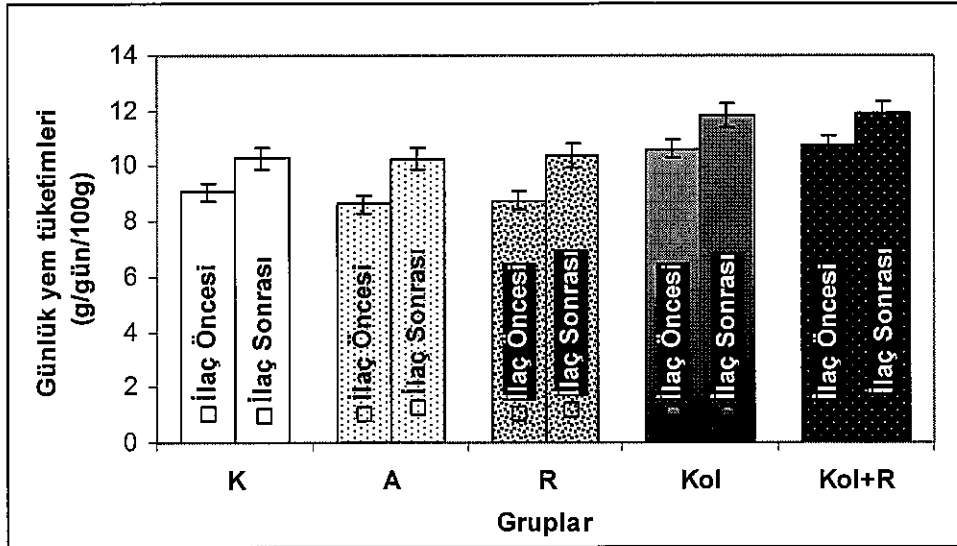


Şekil 4.2.2. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının günlük su tüketimleri.

Tablo 4.2.2. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ilaç öncesi ve sonrası günlük yem tüketimleri.

Gruplar	Günlük yem tüketimleri (g/gün/100g) (ortalama±SEM)		
	İlaç öncesi	İlaç sonrası	p
K	9.06 ± 0.20	10.28 ± 0.12	p< 0.05
A	8.63 ± 0.27 a: p>0.05	10.28 ± 0.46 a: p>0.05	p< 0.005
R	8.76 ± 0.34 b: p>0.05 c: p>0.05	10.38 ± 0.44 b: p>0.05 c: p>0.05	p< 0.05
Kol	10.63 ± 0.17 d: p< 0.001 e: p< 0.001 f: p> 0.001	11.82 ± 0.41 d: p< 0.001 e: p< 0.001 f: p< 0.001	P<0.005
Kol+R	10.76 ± 0.25 g: p<0.005 h: p< 0.05 ı: p< 0.05 i: p> 0.05	11.90 ± 0.38 g: p< 0.005 h: p< 0.005 ı: p< 0.005 i: p> 0.05	p< 0.001

K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + Resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, ı: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması.

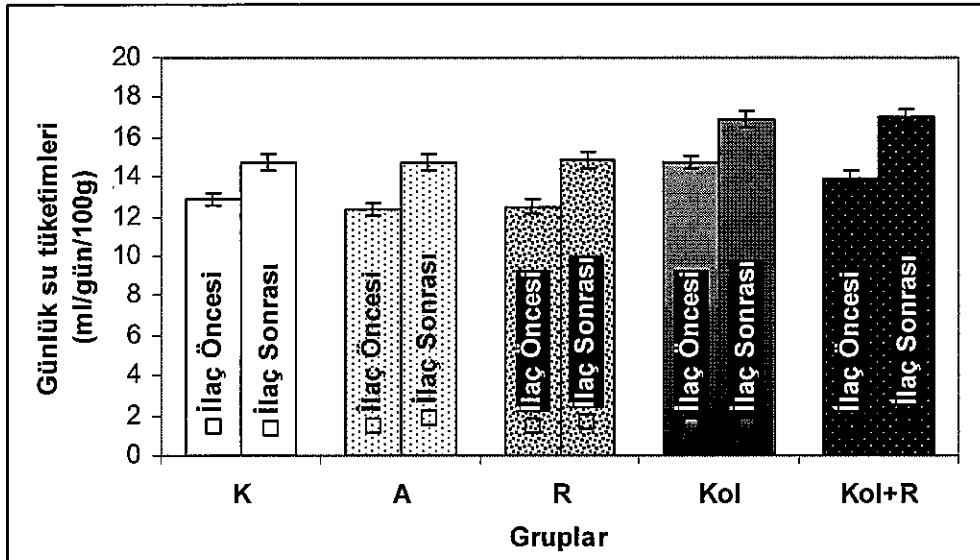


Şekil 4.2.3. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ilaç öncesi ve sonrası günlük yem tüketimleri.

Tablo 4.3.1. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ilaç öncesi ve sonrası günlük su tüketimleri.

Gruplar	Günlük su tüketimleri (ml/gün/100g) (X±SEM)		
	İlaç öncesi	İlaç sonrası	p
K	12.87 ± 0.26	14.71 ± 0.17	p< 0.001
A	12.35 ± 0.38 a: p>0.05	14.70 ± 0.65 a: p>0.05	p< 0.01
R	12.52 ± 0.48 b: p>0.05 c: p>0.05	14.85 ± 0.63 b: p>0.05 c: p>0.05	p< 0.05
Kol	14.76 ± 0.75 d: p< 0.001 e: p< 0.001 f: p> 0.001	16.91 ± 0.58 d: p< 0.005 e: p< 0.005 f: p< 0.01	P<0.01
Kol+R	13.96 ± 0.24 g: p<0.05 h: p< 0.001 ı: p< 0.005 i: p> 0.05	17.02 ± 0.56 g: p< 0.005 h: p< 0.005 ı: p< 0.005 i: p> 0.05	p< 0.001

K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, ı: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması.



Şekil 4.3.1. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ilaç öncesi ve sonrası günlük su tüketimleri.

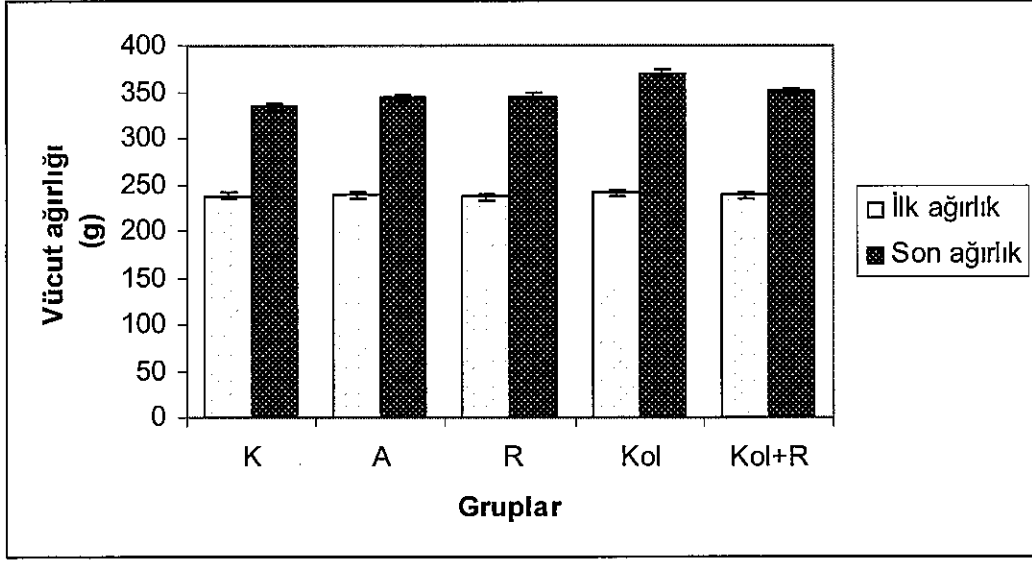
4.4. Vücut Ağırlık Değişimleri

Deney süresince tüm gruplardaki sıçanların vücut ağırlık değişimleri kaydedilmiştir (Tablo 4.4.1, Şekil 4.4.1). Kontrol ve deney grubu hayvanlarının ilk ve son ağırlıkları arasındaki farklara göre yapılan istatistiksel analiz sonucunda, deney başlangıcında, tüm grupların vücut ağırlıklarının farklı olmadığı görülmüştür. Deney sonunda yapılan ağırlık ölçümlerinde ise, tüm grupların son ağırlıklarının başlangıç ağırlıklarından anlamlı olarak arttığı bulunmuştur. Kolesterolle beslenmenin etkisi incelendiğinde, 2 ay 20 gün kolesterolle beslenme sonucu 3 aylık sıçanların vücut ağırlıklarının K,A ve R gruplarına göre anlamlı derecede arttığı görülmüştür ($p<0.001$). Sadece resveratrol uygulanması, hayvanların vücut ağırlığını değiştirmezken, 3 aylık sıçanlar 2 ay kolesterolle beslendikten sonra 20 gün süreyle resveratrol verilmesinin, Kol grubuna göre vücut ağırlıklarında azalmaya yol açtığı bulunmuştur ($p<0.001$).

Tablo 4.4.1. Kontrol ve deney grubu hayvanların vücut ağırlıkları değişimleri.

Gruplar	Vücut ağırlığı (g) ($X \pm SEM$)		P değeri
	Deney Başlangıcındaki Ağırlık	Deney Sonundaki Ağırlık	
K	238.33 \pm 2.07	334.17 \pm 3.36	$p< 0.001$
A	238.50 \pm 3.66 a: $p>0.05$	344.17 \pm 2.90 a: $p>0.05$	$p< 0.001$
R	236.67 \pm 1.88 b: $p>0.05$ c: $p>0.05$	345.00 \pm 5.43 b: $p>0.05$ c: $p>0.05$	$p< 0.001$
Kol	240.83 \pm 1.93 d: $p>0.05$ e: $p>0.05$ f: $p>0.05$	370.42 \pm 4.19 d: $p< 0.001$ e: $p< 0.001$ f: $p< 0.001$	$p< 0.001$
Kol+R	239.00 \pm 2.29 g: $p>0.05$ h: $p>0.05$ ı: $p>0.05$ i: $p> 0.05$	350.83 \pm 4.52 g: $p< 0.005$ h: $p> 0.05$ ı: $p> 0.05$ i: $p< 0.001$	$p< 0.001$

K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + Resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, ı: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması.



Şekil 4.4.1. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının vücut ağırlıkları.

4.5. Kontrol ve deney gruplarının trombosit CD40, CD40L, P-selektin, ve ROS düzeyleri.

Kontrol ve deney grubunda bulunan sıçanların kan hücrelerinin FS-SS grafikleri sonucunda elde edilen hücre dağılımları Şekil 4.5.1-4.5.5 arasında gösterilmiştir.

4.5.1. CD40 düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarında sıçanların trombosit CD40 düzeyleri Tablo 4.5.1 ve Şekil 4.5.2’de verilmiştir. Alkol ve Kol gruplarında, kontrollerine göre CD40 düzeylerinin arttığı, R grubunda ise azaldığı bulunmuştur. Kolesterolle beslenme sonucu trombositlerdeki CD40 ekspresyonu hem yüzde hem de MFI olarak artarken, Kol+R grubundaki CD40 ekspresyonu Kol grubu ile kıyaslandığı zaman, anlamlı derecede azalma olduğu görülmüştür. CD40 düzeylerindeki yüzde değişimleri Tablo 4.5.2’ de verilmiştir. Buna göre, CD40 düzeylerindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubu sıçanlarda (%180.01) olduğu tespit edilmiştir.

4.5.2. CD40L düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının trombosit CD40L düzeyleri Tablo 4.5.1 ve Şekil 4.5.3’de verilmiştir. Trombositlerdeki CD40L ekspresyon yüzdesi A, Kol ve Kol+R gruplarında, kontrollerine kıyasla anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). Trombosit CD40L düzeyleri MFI açısından karşılaştırıldığında, A ve Kol gruplarında artış görülürken, R grubunda azalma meydana gelmiştir. Kolesterolle beslenen sıçanlarda CD40L ekspresyonu, kontrole göre anlamlı derecede artarken, Kol+R grubunun CD40L ekspresyonunun Kol grubuna göre hem yüzde hem MFI olarak düştüğü görülmüştür ($p<0.001$). CD40L düzeylerindeki yüzde değişimleri Tablo 4.5.2’ de verilmiştir. Kontrol grubu değerlerine göre, CD40L düzeylerindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubu sıçanlarda (%237.50) olduğu tespit edilmiştir.

4.5.3. P-selektin düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının P-selektin düzeyleri Tablo 4.5.1 ve Şekil 4.5.4 ve 4.5.5’de verilmiştir. Etanol ve kolesterol, trombosit P-selektin ekspresyonunu, kontrol sıçanlarına kıyasla hem yüzde hem MFI olarak artırırken ($p<0.001$), resveratrol azaltmaktadır ($p<0.001$). Kol+R grubuna ait sıçanların P-selektin ekspresyonlarında, Kol grubuna göre anlamlı derecede azalma meydana gelmiştir ($p<0.001$). R ve Kol+R grubu kıyaslandığı zaman, Kol+R grubunun P-selektin yüzde ve MFI düzeyinin, R grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulunmuştur. P-selektin düzeylerindeki yüzde değişimleri Tablo 4.5.2’ de verilmiştir. Buna göre, p-selektin düzeylerindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubu sıçanlarda (%121.62) olduğu tespit edilmiştir.

4.5.4. Reaktif Oksijen Türleri (ROS) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının trombosit ROS düzeyleri Tablo 4.5.1 ve Şekil 4.5.6’da verilmiştir. A, Kol ve Kol+R gruplarında, kontrollere göre ROS düzeylerinde anlamlı derecede artma meydana gelmiştir. Kol ve Kol+R grubu karşılaştırıldığında, Kol+R grubunun ROS düzeyinin Kol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur ($p<0.005$). ROS düzeylerindeki yüzde değişimleri

Tablo 4.5.2' de verilmiştir. Buna göre, ROS düzeylerindeki yüzde değişiminin en fazla A grubu sıçanlarda (%112.45) olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.5.1. Kontrol ve deney grubu sıçanların trombosit CD40, CD40L, P-selektin, ve ROS düzeyleri ($\bar{X} \pm \text{SEM}$).

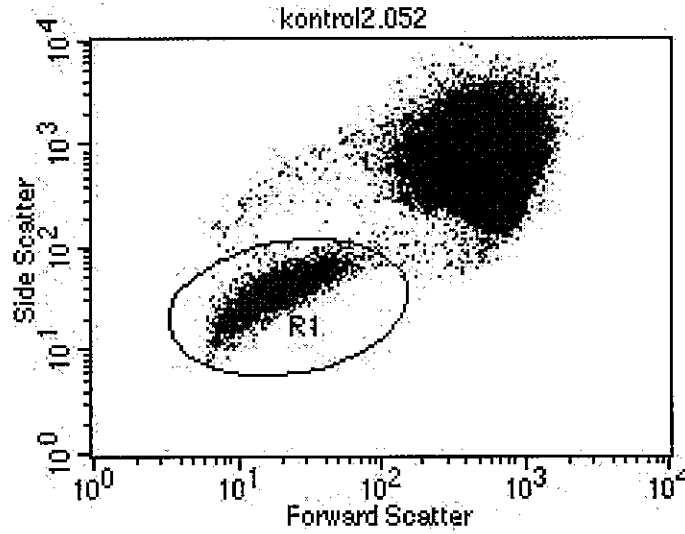
	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
CD40 (%)	0.25 ± 0.02	0.60 ± 0.02 a: p<0.001	0.17 ± 0.01 b: p<0.05 c: p<0.001	0.70 ± 0.03 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	0.30 ± 0.03 g: p>0.05 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
CD40 (MFI)	23.13 ± 1.64	26.45 ± 1.95 a: p>0.05	19.41 ± 1.52 b: p>0.05 c: p<0.005	37.38 ± 1.27 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	29.10 ± 1.46 g: p<0.01 h: p>0.05 ı: p<0.001 i: p<0.001
CD40L (%)	0.08 ± 0.01	0.16 ± 0.01 a: p<0.001	0.10 ± 0.01 b: p>0.05 c: p<0.001	0.27 ± 0.01 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	0.17 ± 0.01 g: p<0.001 h: p>0.05 ı: p<0.001 i: p<0.001
CD40L (MFI)	10.67 ± 0.49	12.39 ± 0.49 a: p<0.05	7.78 ± 0.43 b: p<0.001 c: p<0.001	16.52 ± 0.68 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	11.54 ± 0.51 g: p>0.05 h: p>0.05 ı: p<0.001 i: p<0.001
P-Selektin (%)	0.37 ± 0.02	0.61 ± 0.02 a: p<0.001	0.25 ± 0.02 b: p<0.001 c: p<0.001	0.85 ± 0.03 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	0.60 ± 0.02 g: p<0.001 h: p>0.05 ı: p<0.001 i: p<0.001
P-Selektin (MFI)	18.00 ± 1.18	21.41 ± 0.89 a: p<0.01	13.11 ± 0.48 b: p<0.001 c: p<0.001	25.38 ± 1.01 d: p<0.01 e: p<0.05 f: p<0.01	18.77 ± 0.41 g: p>0.05 h: p<0.05 ı: p<0.001 i: p<0.001
ROS (MFI)	52.53 ± 1.66	111.60 ± 4.62 a: p<0.001	52.35 ± 2.51 b: p>0.05 c: p<0.001	98.71 ± 2.62 d: p<0.001 e: p<0.005 f: p<0.001	75.25 ± 2.47 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001

K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, ı: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması. MFI: Ortalama floresan yoğunluğu.

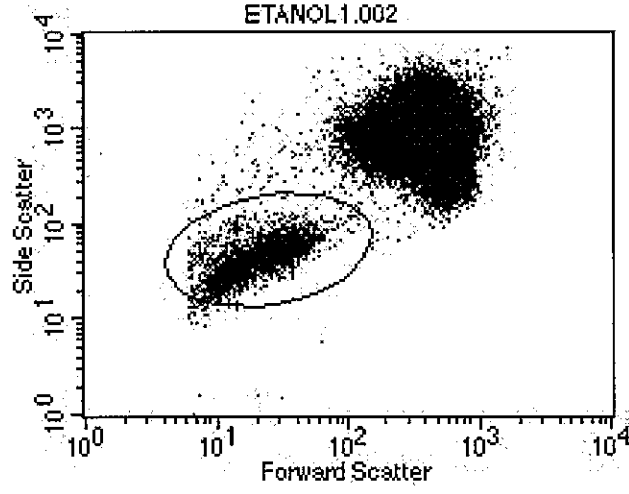
Tablo 4.5.2. Deney gruplarının trombosit CD40, CD40L ve p-selektin ekspresyonları ve ROS düzeylerinin kontrol değerlerine göre yüzde değişimleri.

	% Değişim				
	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
CD40 (%)	100	(+) 140.00	(-) 32.00	(+) 180.01	(+) 20.00
CD40 (MFI)	100	(+) 14.35	(-) 16.08	(+) 61.61	(+) 25.81
CD40L (%)	100	(+) 100.01	(-) 25.00	(+) 237.50	(+) 112.50
CD40L (MFI)	100	(+) 16.12	(-) 27.09	(+) 54.83	(+) 8.15
P-Selektin (%)	100	(+) 64.87	(-) 32.43	(+) 121.62	(+) 62.16
P-Selektin (MFI)	100	(+) 18.94	(-) 27.17	(+) 41.00	(+) 4.28
ROS (MFI)	100	(+) 112.45	(-) 0.34	(+) 87.91	(+) 43.25

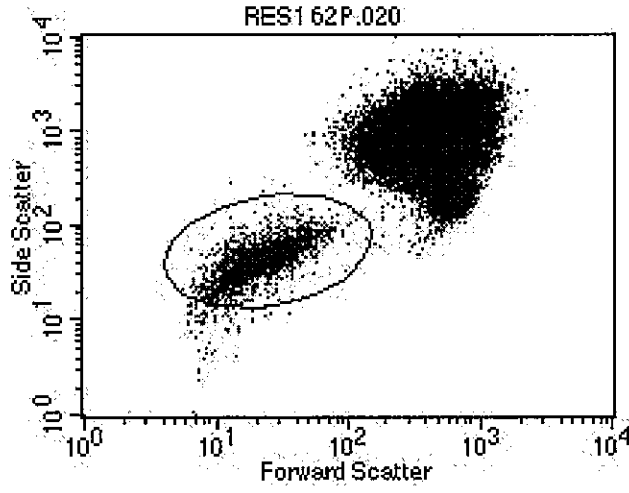
K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + resveratrol grubu. MFI: Ortalama floresan yoğunluğu.



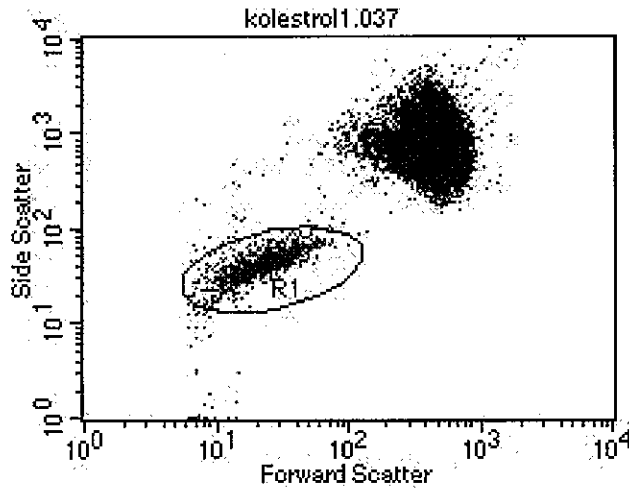
Şekil 4.5.2.1. Kontrol grubundaki sıçana ait kan hücrelerinin FS-SS dağılımı.



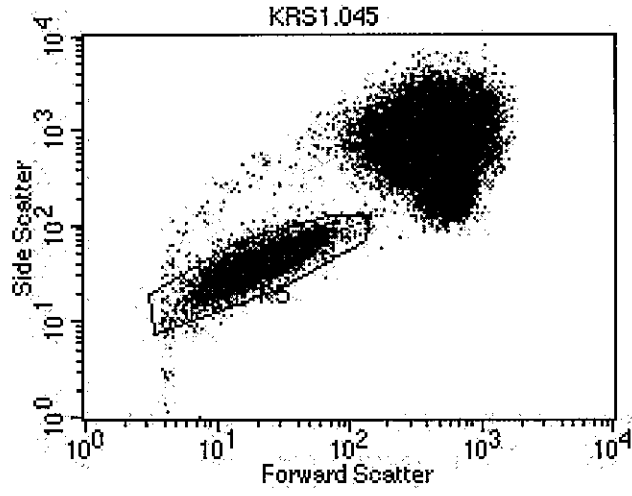
Şekil 4.5.2.2. Etanol grubundaki sıçana ait kan hücrelerinin FS-SS dağılımı.



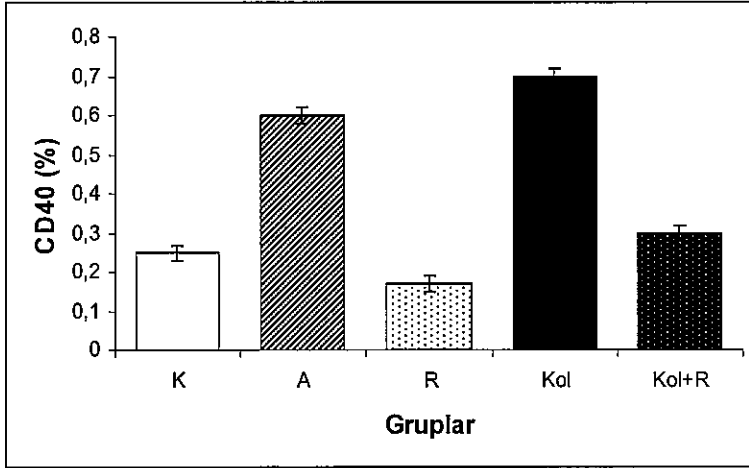
Şekil 4.5.2.3. Resveratrol grubundaki sıçana ait kan hücrelerinin FS-SS dağılımı.



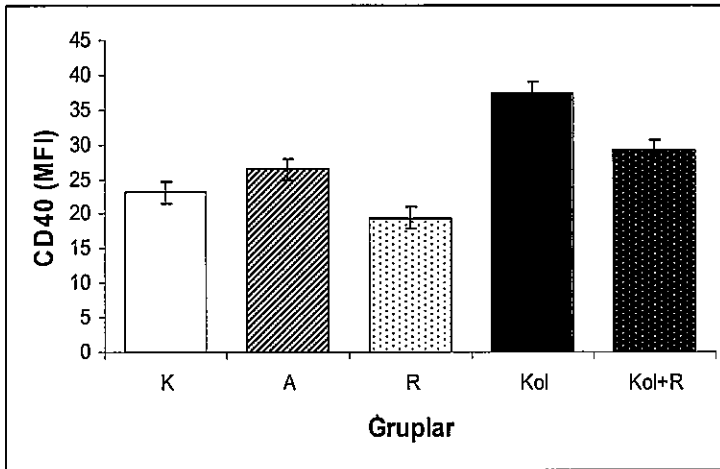
Şekil 4.5.2.4. Kolesterol grubundaki sıçana ait kan hücrelerinin FS-SS dağılımı.



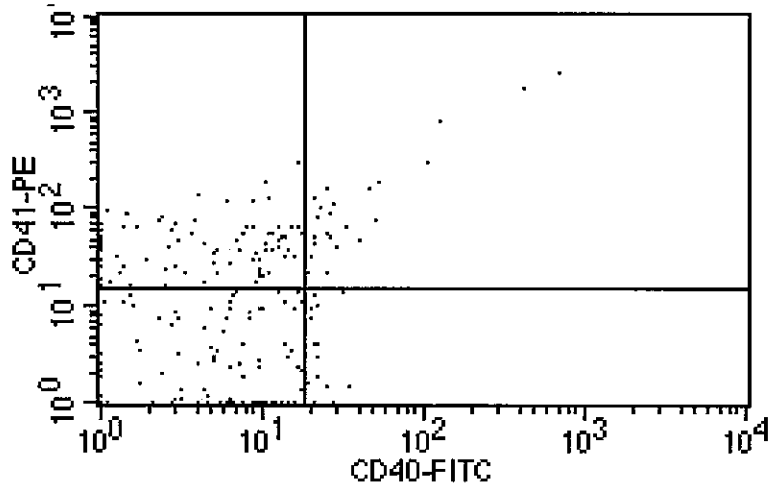
Şekil 4.5.2.5. Kol+R grubundaki sıçana ait kan hücrelerinin FS-SS dağılımı.



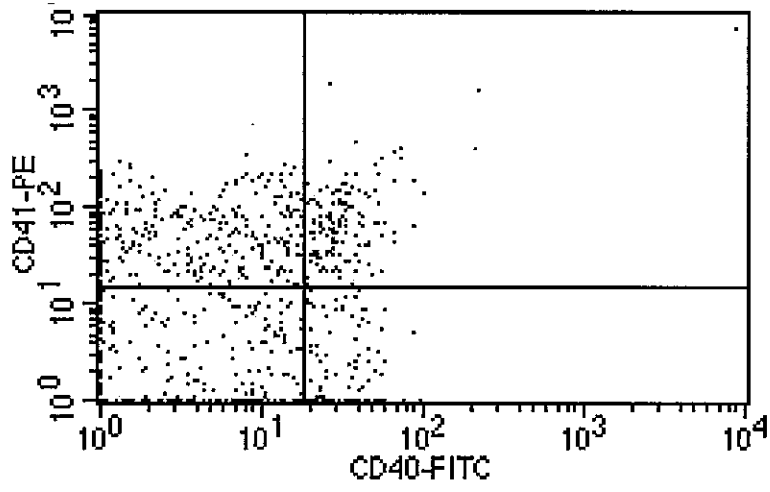
Şekil 4.5.2.6. Kontrol ve deney gruplarının CD40 (%) düzeyleri.



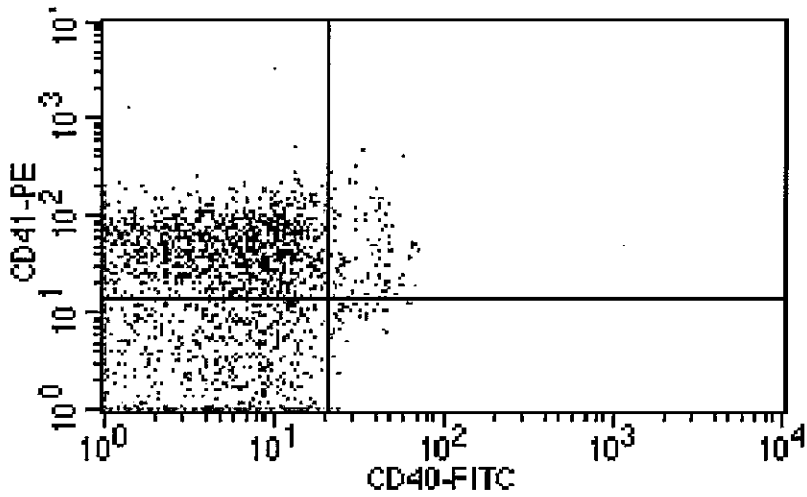
Şekil 4.5.2.7. Kontrol ve deney gruplarının CD40 (MFI) düzeyleri.



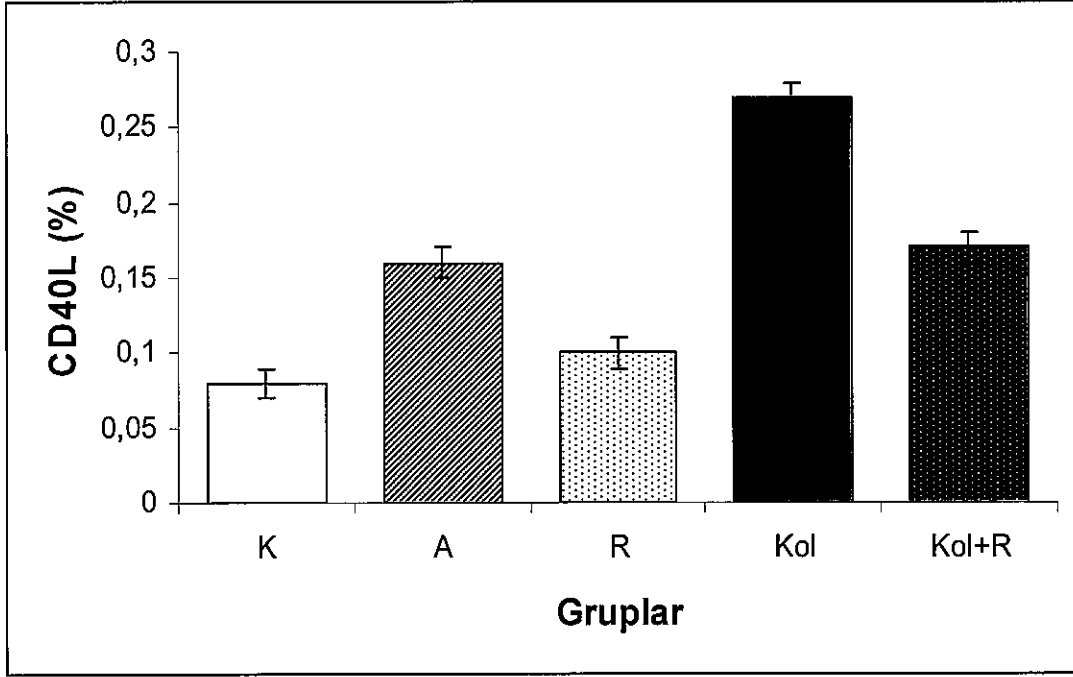
Şekil 4.5.2.8. Kontrol grubu sıçan trombositlerindeki CD41-CD40 ekspresyonu.



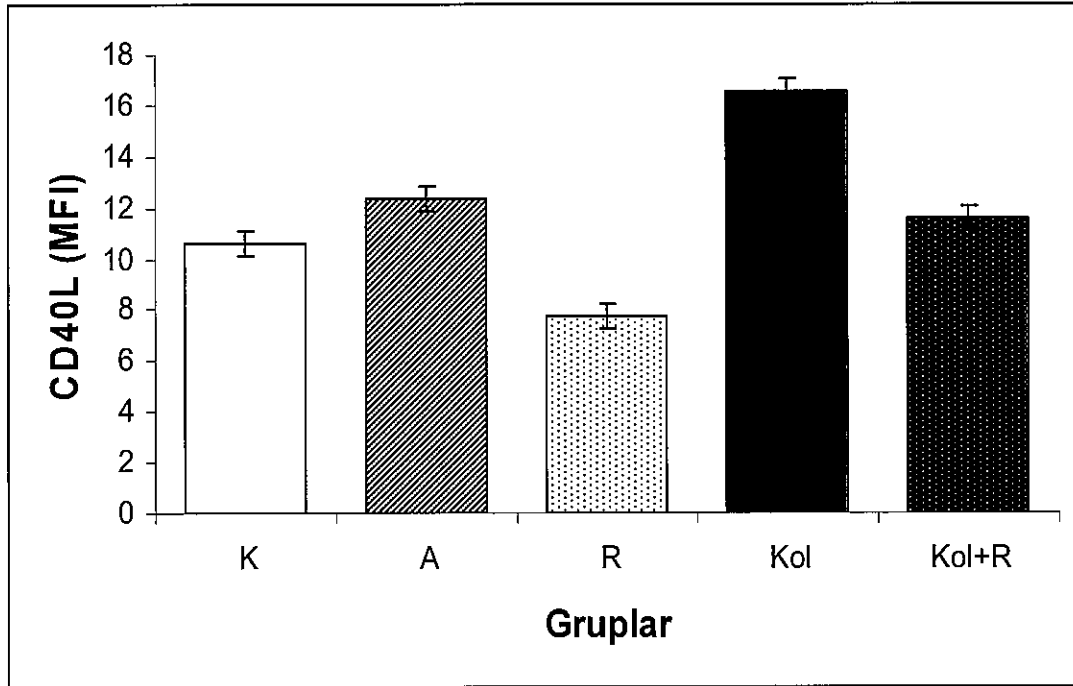
Şekil 4.5.2.9. Etanol grubu sıçan trombositlerindeki CD41-CD40 ekspresyonu.



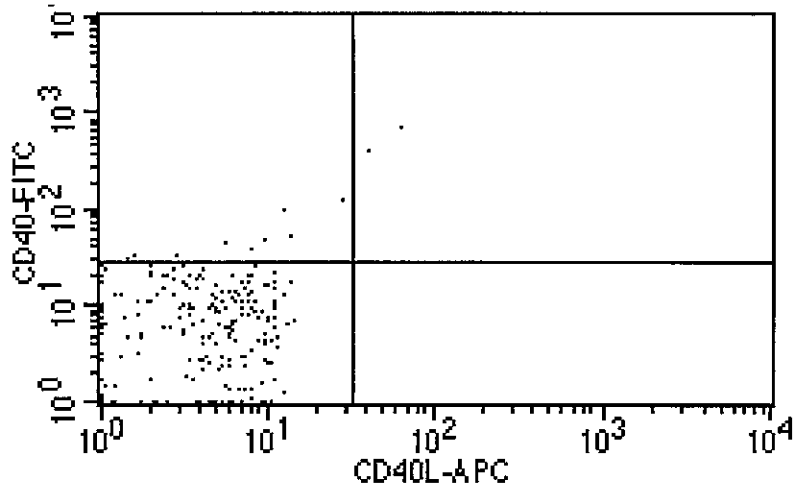
Şekil 4.5.2.10. Kolesterol grubu sıçan trombositlerindeki CD41-CD40 ekspresyonu.



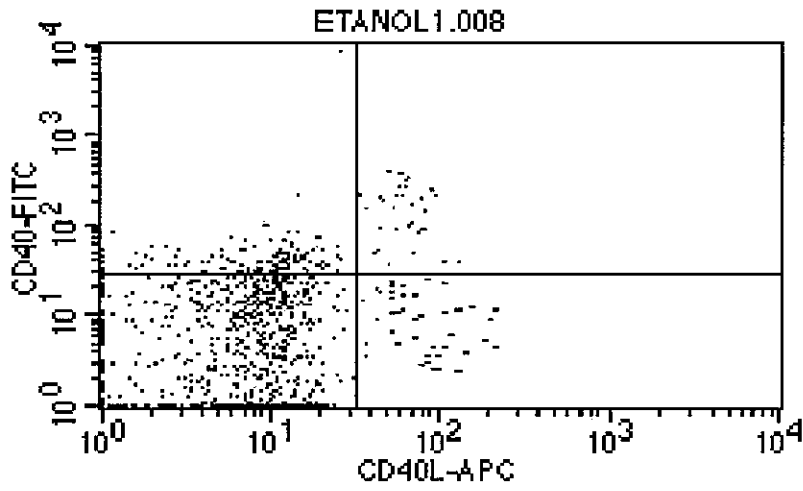
Şekil 4.5.3.1. Kontrol ve deney gruplarının CD40L (%) düzeyleri.



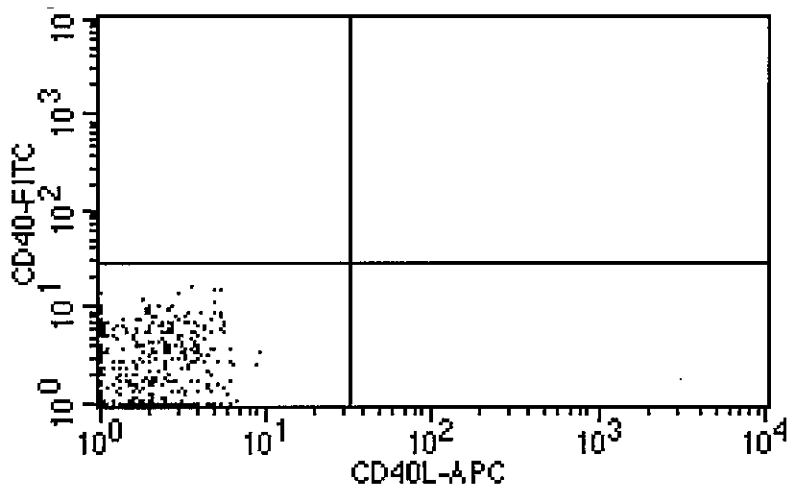
Şekil 4.5.3.2. Kontrol ve deney gruplarının CD40L (MFI) düzeyleri.



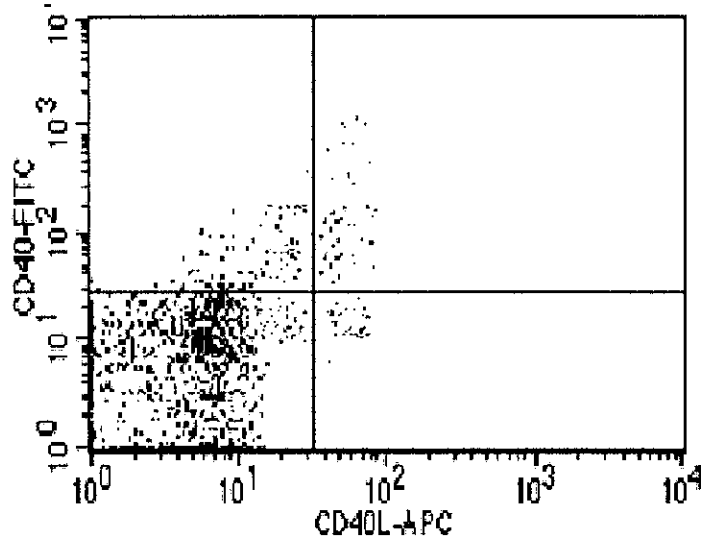
Şekil 4.5.3.3. Kontrol grubu sıçan trombositlerindeki CD40-CD40L ekspresyonu



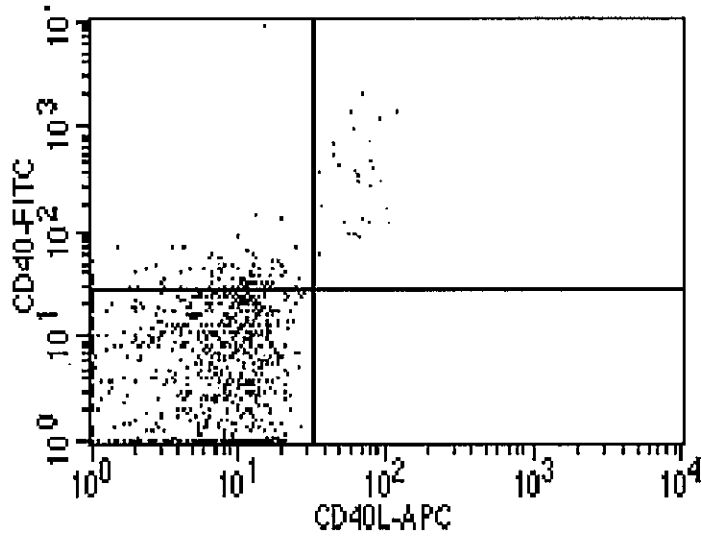
Şekil 4.5.3.4. Etanol grubu sıçan trombositlerindeki CD40-CD40L ekspresyonu



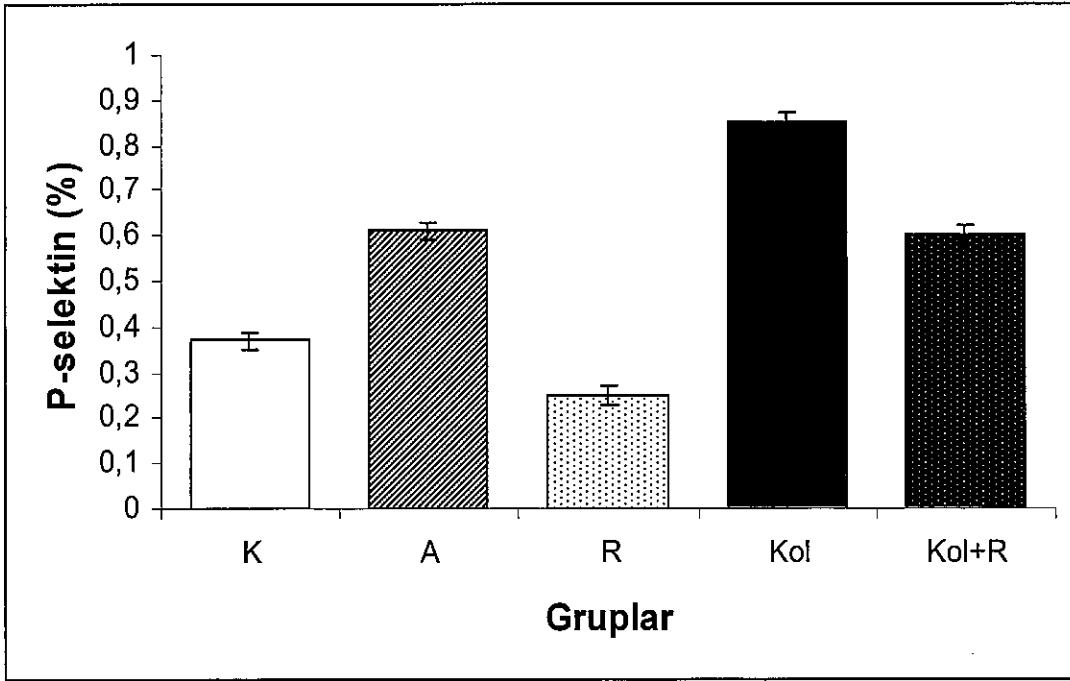
Şekil 4.5.3.5. Resveratrol grubu sıçan trombositlerindeki CD40-CD40L ekspresyonu



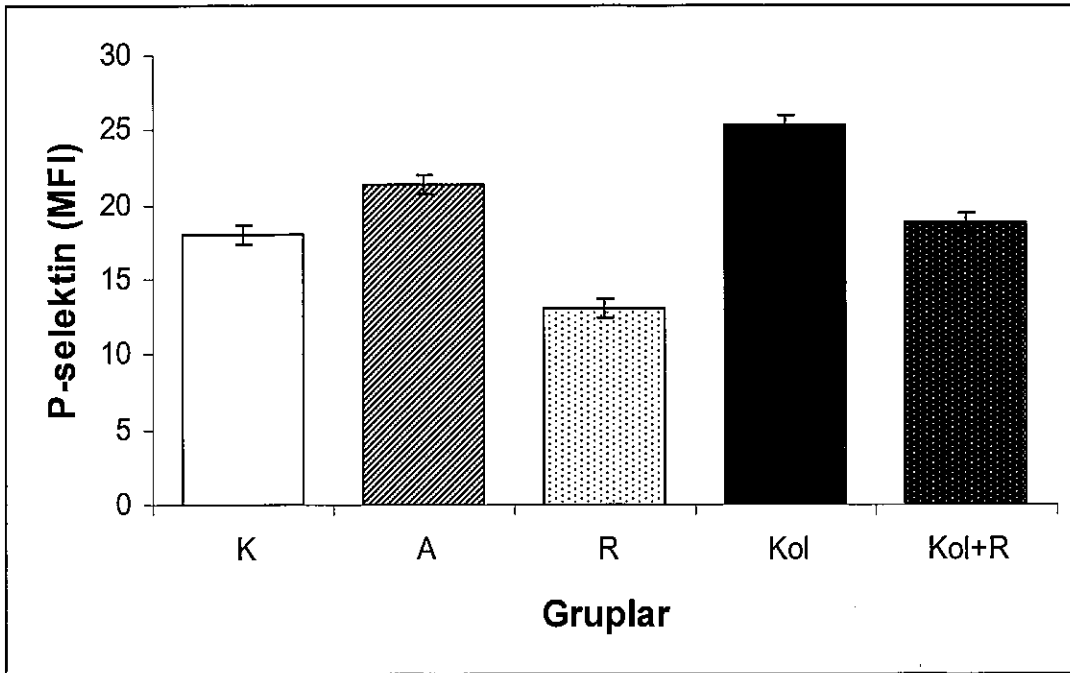
Şekil 4.5.3.6. Kolesterol grubu sıçan trombositlerindeki CD40-CD40L ekspresyonu



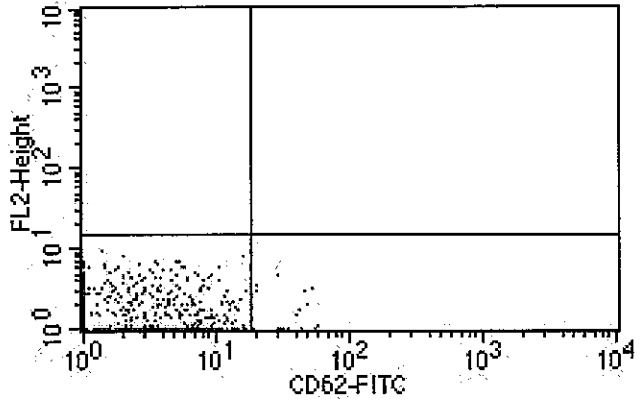
Şekil 4.5.3.7. Kol+R grubu sıçan trombositlerindeki CD40-CD40L ekspresyonu



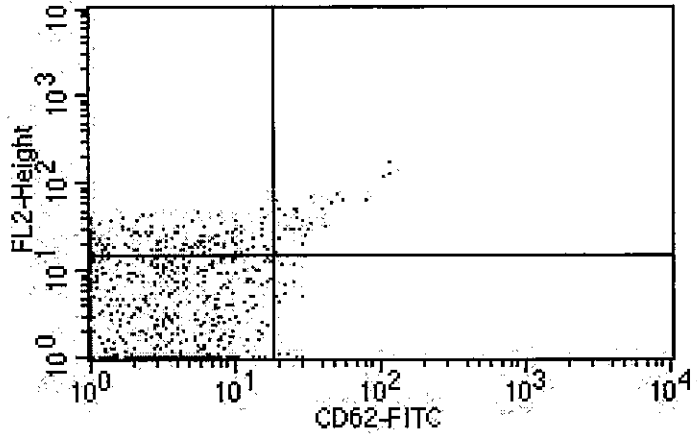
Şekil 4.5.4.1. Kontrol ve deney gruplarının P-selektin (%) düzeyleri.



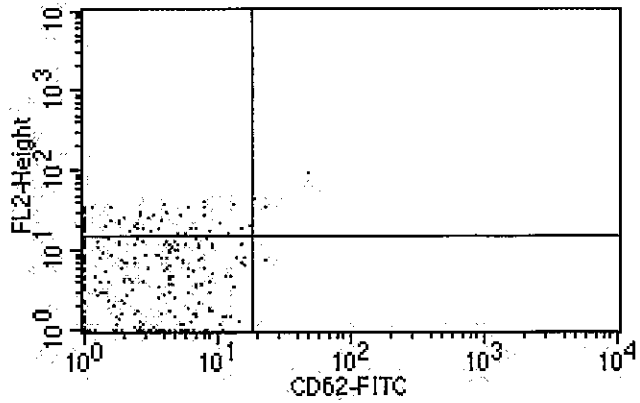
Şekil 4.5.4.2. Kontrol ve deney gruplarının P-selektin (MFI) düzeyleri.



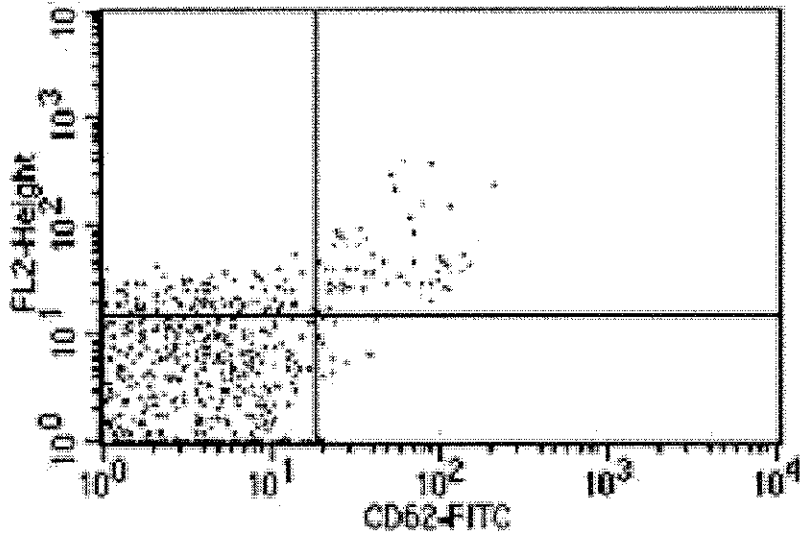
Şekil 4.5.4.3. Kontrol grubu sıçan trombositlerindeki P-selektin ekspresyonu



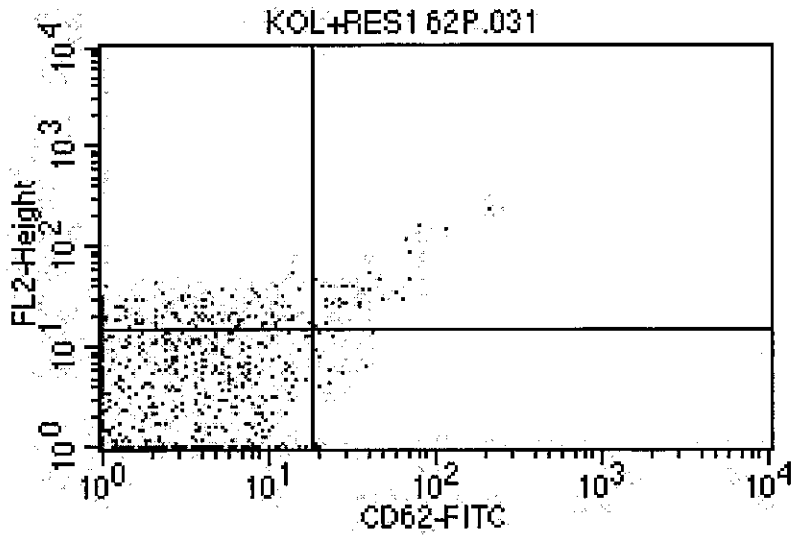
Şekil 4.5.4.4. Etanol grubu sıçan trombositlerindeki P-selektin ekspresyonu



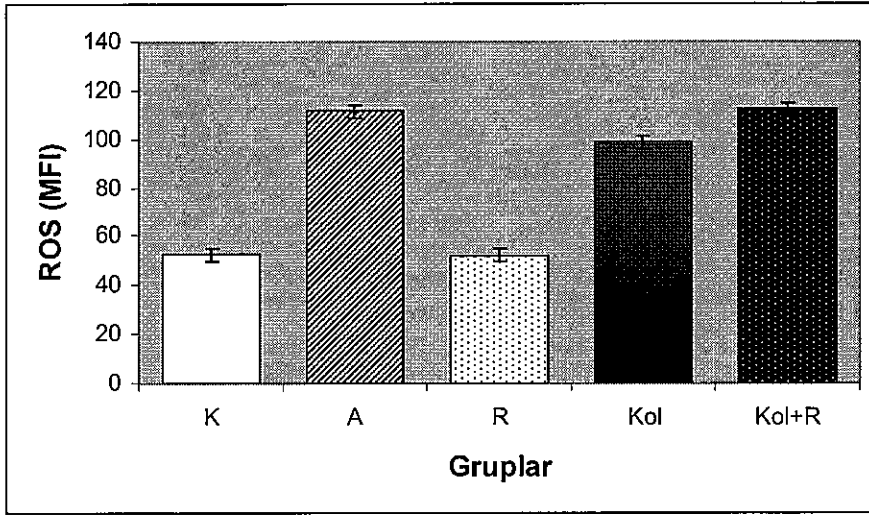
Şekil 4.5.4.5. Resveratrol grubu sıçan trombositlerindeki P-selektin ekspresyonu



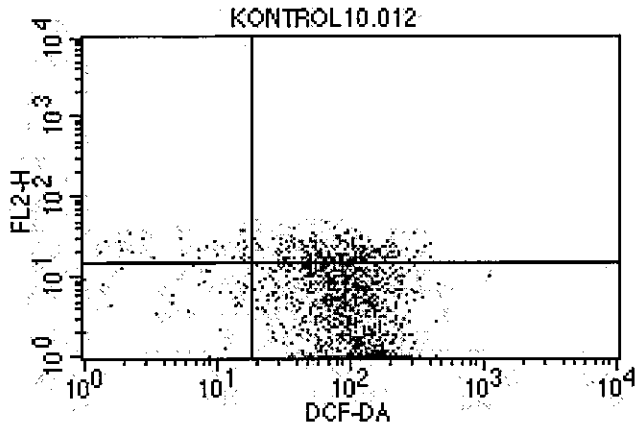
Şekil 4.5.4.6. Kolesterol grubu sıçan trombositlerindeki P-selektin ekspresyonu



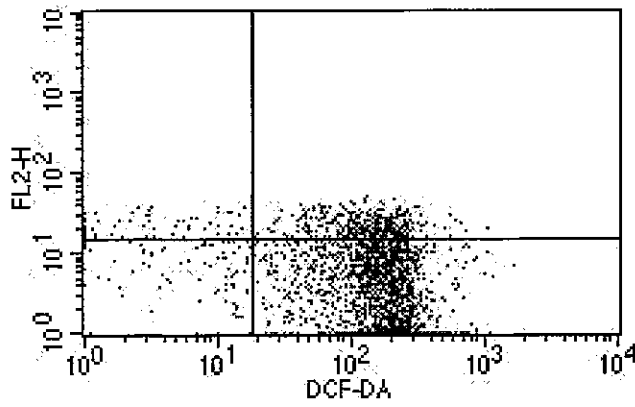
Şekil 4.5.4.7. Kol+Res grubu sıçan trombositlerindeki P-selektin ekspresyonu



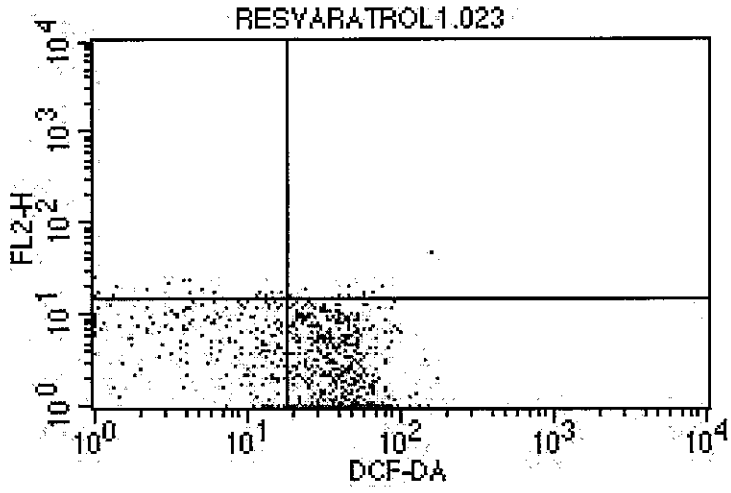
Şekil 4.5.5.1 Kontrol ve deney gruplarının ROS düzeyleri.



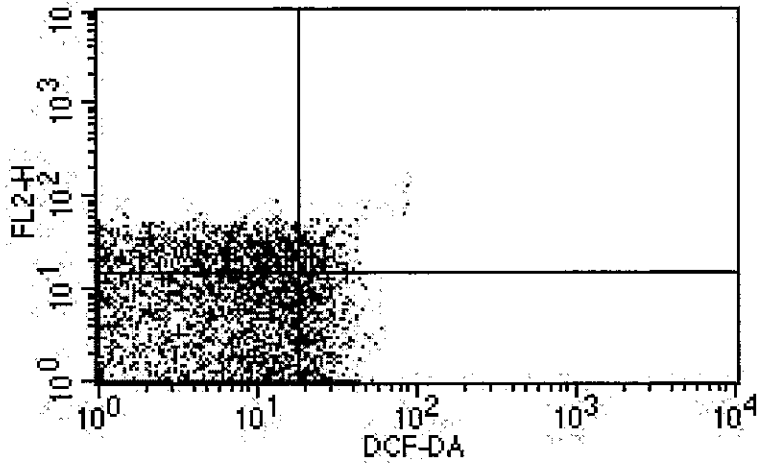
Şekil 4.5.5.2. Kontrol grubu sıçan trombositlerindeki ROS dağılımı.



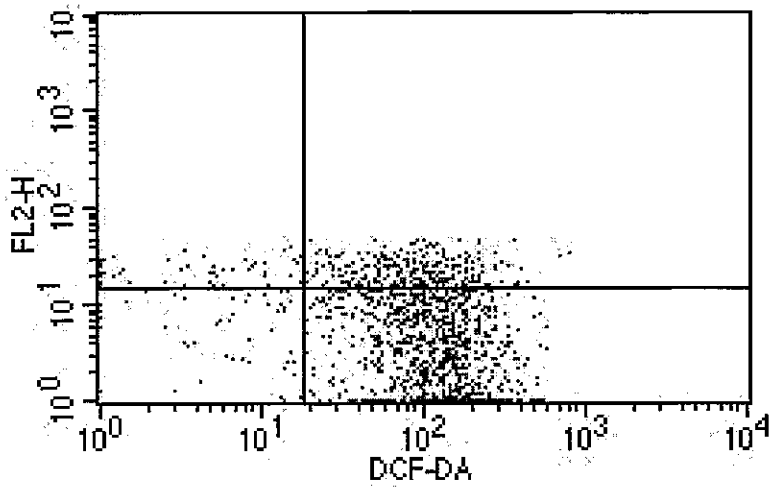
Şekil 4.5.5.3. Etanol grubu sıçan trombositlerindeki ROS dağılımı.



Şekil 4.5.5.4. Resveratrol grubu sıçan trombositlerindeki ROS dağılımı.



Şekil 4.5.5.5. Kolesterol grubu sıçan trombositlerindeki ROS dağılımı.



Şekil 4.5.5.6. Kol+Res grubu sıçan trombositlerindeki ROS dağılımı.

4.6. Kontrol ve Deney Gruplarının Plazma sCD40, IL-6 ve PF4 Düzeyleri.

4.6.1. sCD40 düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarına ait sCD40 düzeyleri Tablo 4.6.1 ve Şekil 4.6.1’de verilmiştir. A, R, Kol ve Kol+R gruplarının sCD40 düzeyleri, kontrollere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Kol ve Kol+R grupları kıyaslandığı zaman, Kol grubunun sCD40 düzeyinin, Kol+R grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulunmuştur ($p<0.01$). sCD40 düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.6.2’ de verilmiştir. Buna göre, sCD40 düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%41.72) olduğu tespit edilmiştir.

4.6.2. IL-6 düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının IL-6 düzeyleri Tablo 4.6.1 ve Şekil 4.6.2’de verilmiştir. Kol ve Kol+R deney gruplarının IL-6 düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). Deney grupları birbiriyle kıyaslandığı zaman, IL-6 düzeyindeki artışın en fazla Kol grubunda olduğu görülmüştür. Kol ve Kol+R grupları kıyaslandığı zaman, Kol grubunun IL-6 düzeyinin, Kol+R grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0.001$). IL-6 düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.6.2’ de verilmiştir. Buna göre, IL-6 düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%161.88) olduğu tespit edilmiştir.

4.6.3. PF4 düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının PF4 düzeyleri Tablo 4.6.1 ve Şekil 4.6.3’te verilmiştir. A, R, Kol ve Kol+R gruplarının PF4 düzeylerinde kontrol gruplarına göre anlamlı derecede artma meydana gelmiştir ($p<0.01$). Kolesterol grupları birbiriyle kıyaslandığı zaman, Kol+R grubundaki artışın Kol grubuna göre daha fazla olduğu ve bu artışın anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.005$). PF4 düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.6.2’ de verilmiştir. Buna göre, PF4 düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla Kol+R grubunda (%53.01) olduğu tespit edilmiştir.

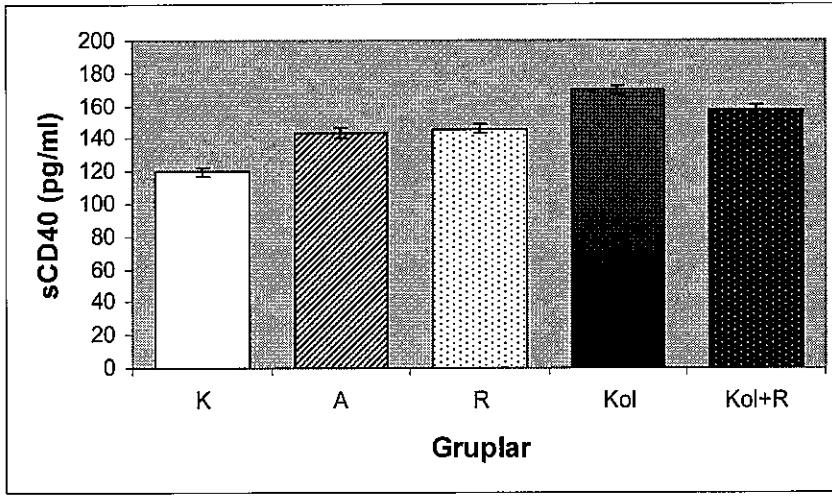
Tablo 4.6.1. Kontrol ve deney grubu sıçanların plazma sCD40, IL-6 ve PF4 düzeyleri ($\bar{X} \pm SEM$).

	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
sCD40 (pg/ml)	119.77 ± 2.32	143.41 ± 2.96 a: p<0.001	146.26 ± 4.31 b: p<0.001 c: p>0.05	169.74 ± 3.07 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	157.36 ± 2.46 g: p<0.001 h: p<0.005 ı: p<0.05 i: p<0.01
IL-6 (pg/ml)	125.51 ± 6.49	133.91 ± 4.23 a: p>0.05	109.92 ± 4.19 b: p>0.05 c: p<0.05	328.68 ± 13.99 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	193.26 ± 10.4 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
PF4 (ng/ml)	7.64 ± 0.39	9.12 ± 0.50 a: p<0.01	9.79 ± 0.42 b: p<0.001 c: p>0.05	10.01 ± 0.18 d: p<0.001 e: p>0.05 f: p>0.05	11.69 ± 0.39 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.005

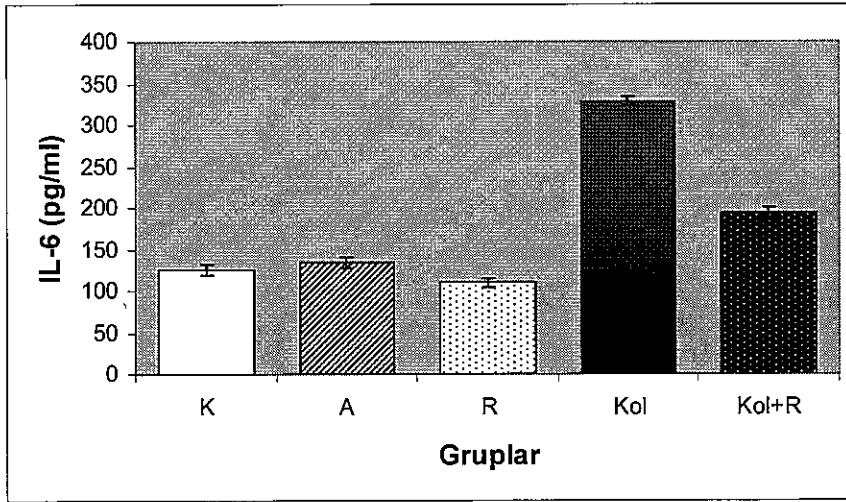
K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, ı: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması.

Tablo 4.6.2. Deney gruplarının sCD40, IL-6 ve PF4 düzeylerinin kontrol değerlerine göre yüzde değişimleri.

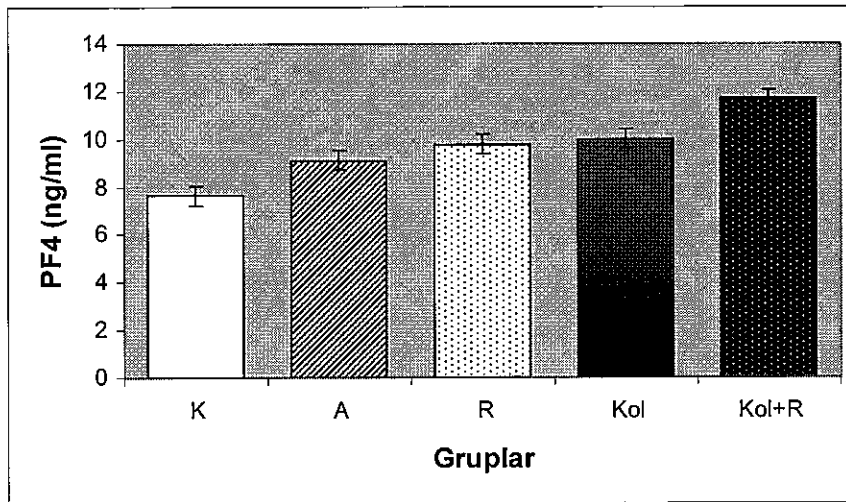
	% Değişim				
	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
sCD40 (pg/ml)	100	(+) 19.74	(+) 22.12	(+) 41.72	(+) 31.39
IL-6 (pg/ml)	100	(+) 6.69	(-) 12.42	(+) 161.88	(+) 53.98
PF4 (ng/ml)	100	(+) 19.37	(+) 28.14	(+) 31.02	(+) 53.01



Şekil 4.6.1. Kontrol ve deney gruplarının sCD40 düzeyleri.



Şekil 4.6.2. Kontrol ve deney gruplarının IL-6 düzeyleri.



Şekil 4.6.3. Kontrol ve deney gruplarının PF4 düzeyleri.

4.7. Kontrol ve deney gruplarının serum PON1 aktiviteleri, TK, HDL-K, LDL-K ve oxLDL düzeyleri.

4.7.1. Paraoksonaz-1 (PON1) aktiviteleri

Kontrol ve deney gruplarındaki sıçanların serum PON1 aktiviteleri Tablo 4.7.1 ve Şekil 4.7.1’de verilmiştir. Tüm deney gruplarında, kontrollerine göre anlamlı derecede PON1 aktivitelerinin düştüğü bulunmuştur ($p<0.001$). Kol ve Kol+R grubu kıyaslandığı zaman, Kol+R grubunda anlamlı derecede azalma meydana geldiği görülmüştür. PON1 aktivitesindeki yüzde değişimleri Tablo 4.7.2’de verilmiştir. Buna göre, PON1 aktivitesindeki yüzde değişiminin en fazla A grubunda (%128.82) olduğu tespit edilmiştir

4.7.2. Total Kolesterol (TK) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının TK düzeyleri Tablo 4.7.1 ve Şekil 4.7.2’de verilmiştir. Tüm deney gruplarının TK düzeyleri kontrollerine göre anlamlı derecede artmıştır ($p<0.001$). Kol ve Kol+R grubu karşılaştırıldığında, Kol+R grubunun TK düzeyinde Kol grubuna göre anlamlı derecede azalma meydana gelmiştir ($p<0.001$). TK düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.7.2’de verilmiştir. Buna göre, TK düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%163.86) olduğu tespit edilmiştir.

4.7.3. Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (HDL-K) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının HDL-K düzeyleri Tablo 4.7.1 ve Şekil 4.7.3’de verilmiştir. A grubunun HDL-K düzeyleri, kontrollerine göre anlamlı derecede azalmıştır ($p<0.05$). Kol ve Kol+R grubu kıyaslandığı zaman, Kol+R grubunun HDL-K düzeyinin Kol grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulunmuştur ($p<0.01$). HDL-K düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.7.2’de verilmiştir. Buna göre, HDL-K düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%11.58) olduğu tespit edilmiştir.

4.7.4. Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol (LDL-K) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının LDL-K düzeyleri Tablo 4.7.1 ve Şekil 4.7.4’de verilmiştir. Tüm grupların LDL-K düzeylerinde, kontrollere göre anlamlı derecede artma meydana gelmiştir ($p<0.001$). Kol ve Kol+R grubu karşılaştırıldığında, Kol+R grubunun LDL-K düzeyinin Kol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur ($p<0.001$). LDL-K düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.7.2’de verilmiştir. Buna göre, LDL-K düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%223.33) olduğu tespit edilmiştir.

4.7.5. oxLDL düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının oxLDL düzeyleri Tablo 4.7.1. ve Şekil 4.7.5’de verilmiştir. Tüm grupların oxLDL düzeylerinde, kontrollerine göre anlamlı derecede artma meydana gelmiştir ($p<0.001$). Kol ve Kol+R grubu birbirleriyle kıyaslandığı zaman, Kol+R grubunun oxLDL düzeyinin, Kol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur ($p<0.001$). oxLDL düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.7.2’de verilmiştir. Buna göre, oxLDL düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%172.40) olduğu tespit edilmiştir.

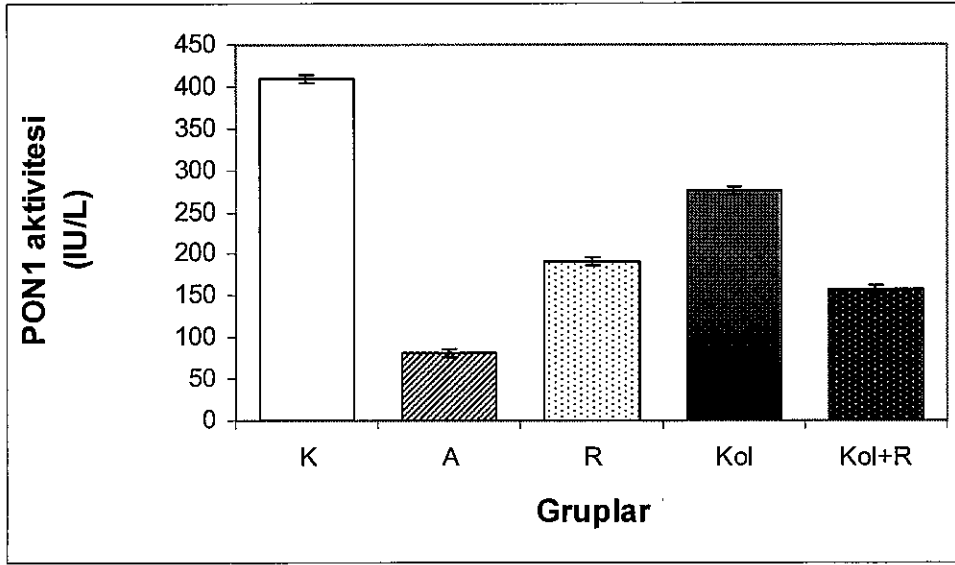
Tablo 4.7.1. Kontrol ve Deney Gruplarının Serum PON1 Aktiviteleri, TK, HDL-K, LDL-K ve oxLDL düzeyleri (ortalama \pm SEM).

	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol + R
PON1 (IU/L)	409.64 \pm 13.22	81.80 \pm 7.47 a: p<0.001	191.90 \pm 7.55 b:p<0.001 c: p<0.001	274.69 \pm 8.84 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	157.36 \pm 2.46 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.05 i: p<0.001
TK (mg/dl)	39.79 \pm 0.64	51.05 \pm 0.75 a: p<0.001	43.23 \pm 0.89 b:p<0.005 c: p<0.001	104.99 \pm 1.63 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	66.50 \pm 0.97 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
HDL-K (mg/dl)	20.21 \pm 0.30	18.71 \pm 0.38 a: p<0.05	19.42 \pm 0.75 b:p>0.05 c: p>0.05	17.87 \pm 0.62 d: p>0.05 e: p>0.05 f: p<0.05	19.94 \pm 0.85 g: p>0.05 h: p>0.05 ı: p>0.05 i: p<0.01
LDL-K (mg/dl)	14.70 \pm 0.25	19.73 \pm 0.77 a: p<0.001	20.53 \pm 0.46 b: p<0.001 c: p>0.05	47.53 \pm 0.64 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	33.62 \pm 0.50 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
oxLDL (ng/ml)	32.17 \pm 0.50	46.43 \pm 1.47 a: p<0.001	55.83 \pm 1.87 b:p<0.001 c: p<0.001	87.63 \pm 2.07 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	73.60 \pm 1.74 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001

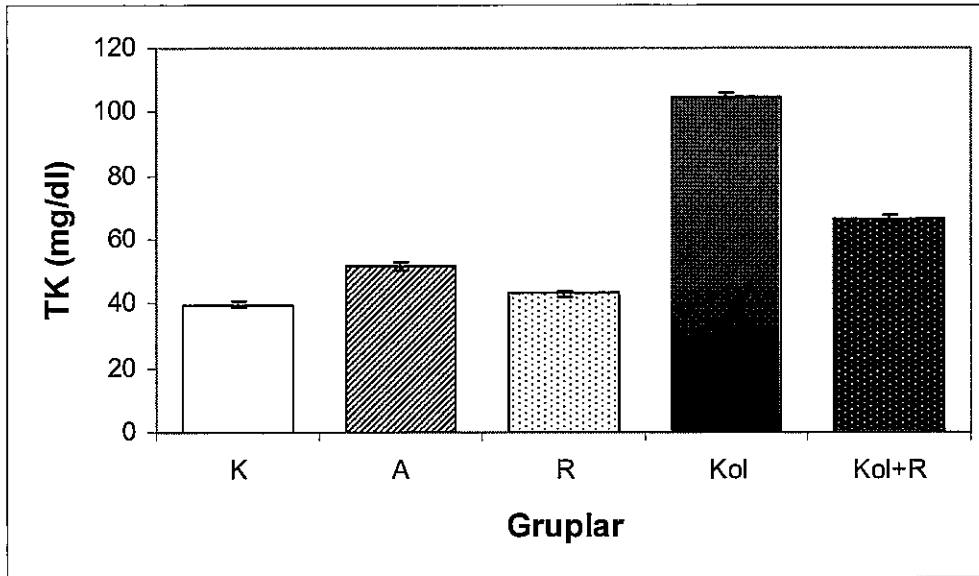
K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, ı: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması

Tablo 4.7.2. Deney gruplarının serum PON1 Aktiviteleri, TK, HDL-K, LDL-K ve oxLDL düzeylerinin kontrol değerlerine göre yüzde değişimleri.

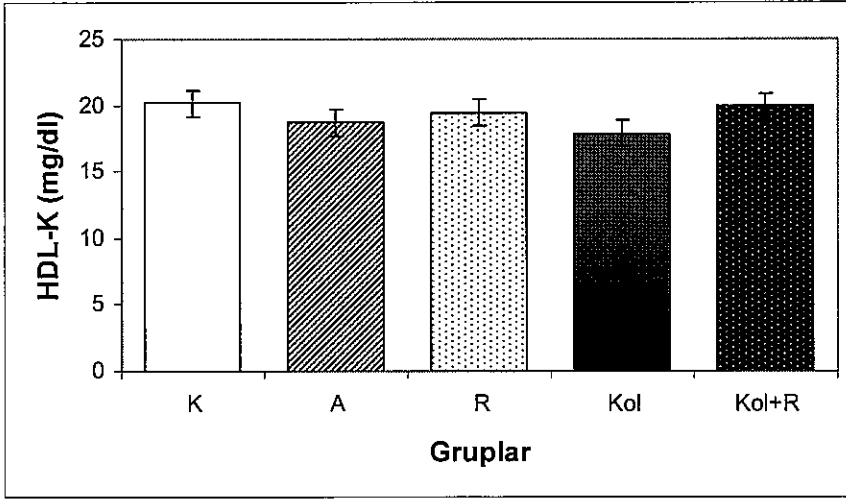
	% Değişim				
	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
PON1 (IU/L)	100	(-) 80.03	(-) 53.15	(-) 32.94	(-) 61.59
TK (mg/dl)	100	(+) 29.94	(+) 8.65	(+) 163.86	(+) 67.13
HDL-K (mg/dl)	100	(-) 7.42	(-) 3.91	(-) 11.58	(-) 1.34
LDL-K (mg/dl)	100	(+) 34.22	(+) 39.66	(+) 223.33	(+) 128.71
oxLDL (ng/ml)	100	(+) 44.33	(+) 73.55	(+) 172.40	(+) 128.78



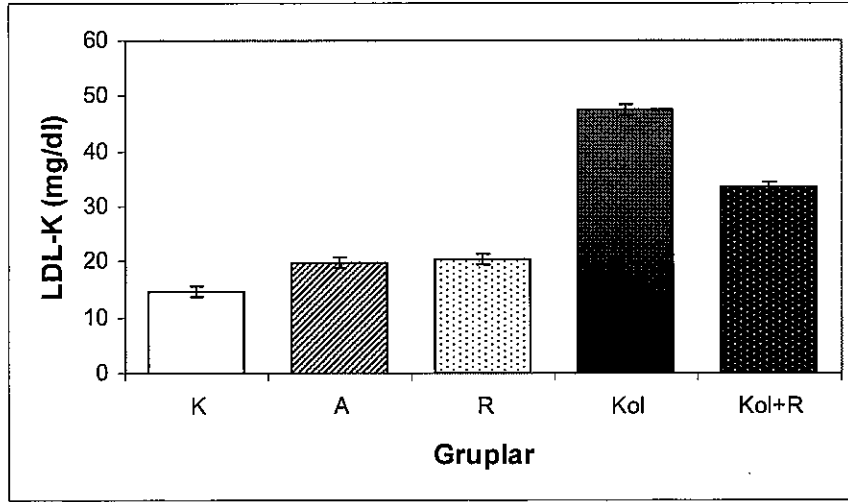
Şekil 4.7.1. Kontrol ve deney gruplarının serum PON1 aktiviteleri.



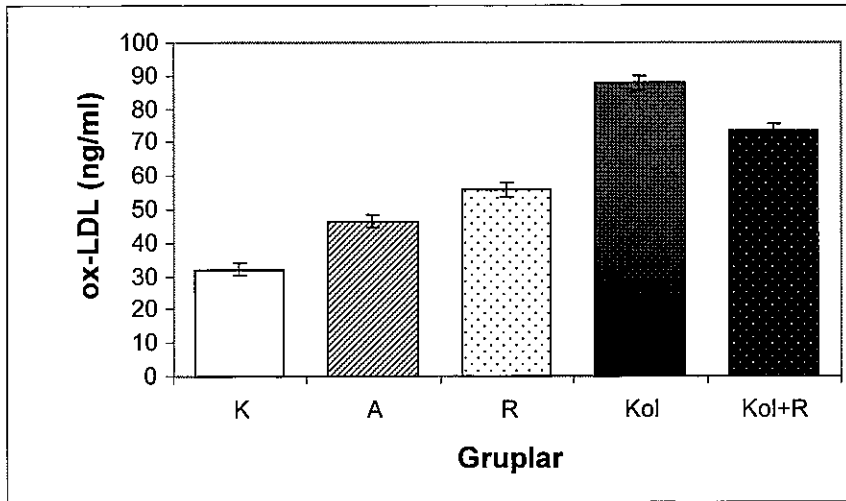
Şekil 4.7.2. Kontrol ve deney gruplarının serum TK düzeyleri.



Şekil 4.7.3. Kontrol ve deney gruplarının serum HDL-K düzeyleri.



Şekil 4.7.4. Kontrol ve deney gruplarının serum LDL-K düzeyleri.



Şekil 4.7.5. Kontrol ve deney gruplarının serum oxLDL düzeyleri.

4.8 Kontrol ve deney gruplarının serum H₂O₂, NT , LPA ve TBARS düzeyleri.

4.8.1. Hidrojen peroksit (H₂O₂) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının H₂O₂ düzeyleri Tablo 4.8.1. ve Şekil 4.8.1’de verilmiştir. Tüm deney gruplarının H₂O₂ düzeyleri, kontrol grubunda göre anlamlı derecede artmıştır (p<0.001). Kol ve Kol+R grupları birbiriyle kıyaslandığı zaman, Kol grubunun H₂O₂ düzeyi, Kol+R grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p<0.001). H₂O₂ düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.8.2’ de verilmiştir. Buna göre, H₂O₂ düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%102.64) olduğu tespit edilmiştir.

4.8.2. Nitrotirozin (NT) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının NT düzeyleri Tablo 4.8.1. ve Şekil 4.8.2’de verilmiştir. A ve Kol grubunun NT düzeyi kontrole göre anlamlı derecede artmıştır (p<0.05). Kol+R grubu Kol ile karşılaştırıldığı zaman, Kol+R grubunda NT düzeyinin düştüğü bulunmuştur (p<0.05). NT düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.8.2’ de verilmiştir. Buna göre, NT düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%25.42) olduğu tespit edilmiştir.

4.8.3. Lizofosfatidik asit (LPA) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının LPA düzeyleri Tablo 4.8.1. ve Şekil 4.8.3’de verilmiştir. Kolesterol uygulanan grupların (Kol ve Kol+R) LPA düzeyleri, K, A ve R gruplarına göre anlamlı derecede artmıştır (p<0.05). Kol+R grubunun LPA düzeyinin, Kol grubuna göre daha düşük olduğu bulunmuştur (p<0.001). LPA düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.8.2’ de verilmiştir. Buna göre, LPA düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%43.13) olduğu tespit edilmiştir.

4.8.4. Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşiklerinin (TBARS) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının TBARS düzeyleri Tablo 4.8.1. ve Şekil 4.8.4’te verilmiştir. Tüm deney gruplarının TBARS düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artmıştır (p<0.005). Kol+R grubunda meydana gelen artışın, Kol grubuna göre daha az olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur (p<0.001). TBARS düzeyindeki yüzde değişimleri Tablo 4.8.2’ de verilmiştir. Buna göre, TBARS düzeyindeki yüzde değişiminin en fazla R grubunda (%254.65) olduğu tespit edilmiştir.

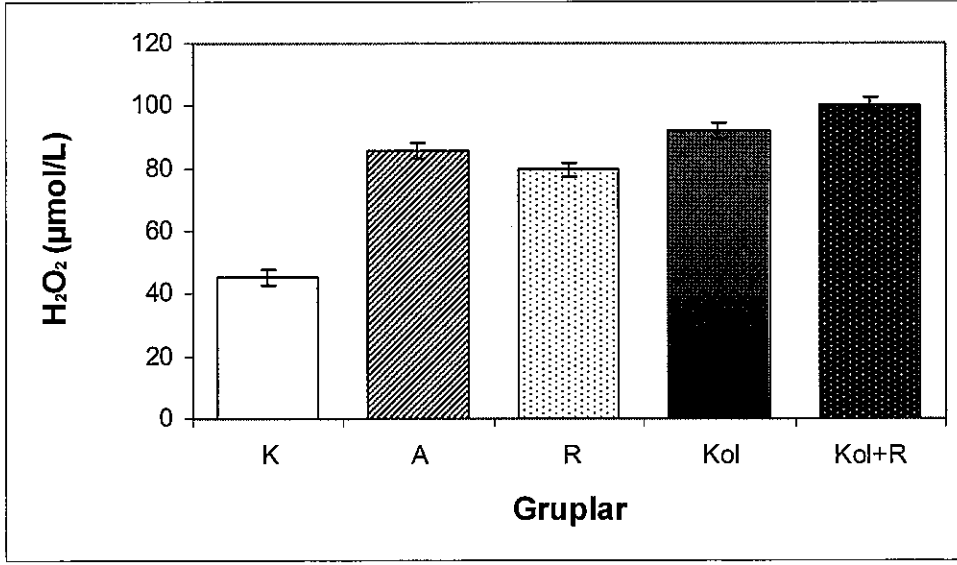
Tablo 4.8.1. Kontrol ve deney gruplarının serum H₂O₂, NT, LPA ve TBARS düzeyleri (ortalama ± SEM).

	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol + R
H₂O₂ ($\mu\text{mol/L}$)	45.38 ± 1.59	85.55 ± 2.86 a: p<0.001	79.48 ± 3.28 b:p<0.001 c: p>0.05	100.12±3.62 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	91.96 ± 2.88 g: p<0.001 h: p>0.05 i: p<0.001 i: p<0.05
NT (nmol/L)	0.59 ± 0.03	0.72 ± 0.09 a: p<0.05	0.56 ± 0.07 b: p>0.05 c: p<0.05	0.74 ± 0.12 d: p<0.05 e: p>0.05 f: p>0.05	0.49 ± 0.05 g: p>0.05 h: p<0.05 i: p>0.05 i: p<0.05
LPA ($\mu\text{mol/L}$)	8.23 ± 0.14	8.53 ± 0.24 a: p>0.05	8.78 ± 0.43 b: p>0.05 c: p>0.05	11.78 ± 0.48 d: p<0.01 e: p<0.05 f: p<0.05	9.75 ± 0.50 g: p<0.001 h: p<0.001 i: p<0.001 i: p<0.001
TBARS ($\mu\text{mol/L}$)	0.86 ± 0.07	1.51 ± 0.09 a: p<0.005	3.05 ± 0.20 b:p<0.001 c: p<0.001	3.02 ± 0.16 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p>0.05	2.14 ± 0.19 g: p<0.001 h: p<0.005 i: p>0.001 i: p<0.001

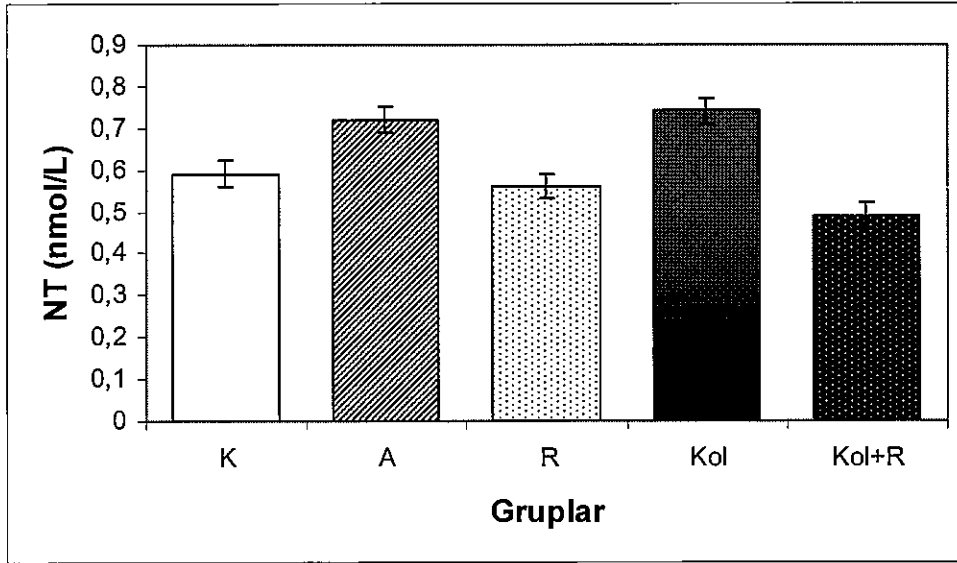
K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, i: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması

Tablo 4.8.2. Deney gruplarının serum H₂O₂, NT, LPA ve TBARS düzeylerinin kontrol değerlerine göre yüzde değişimleri.

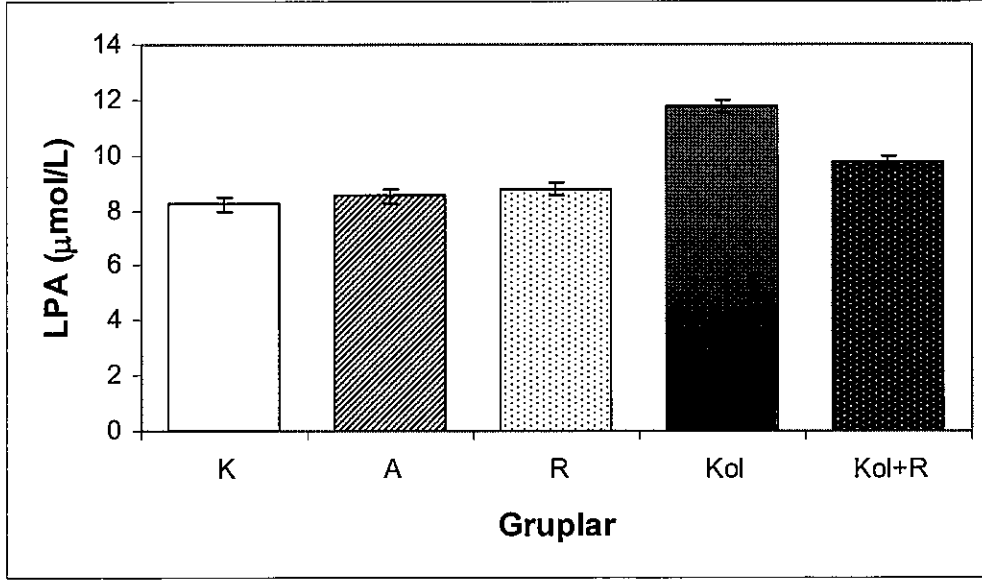
	% Değişim				
	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
H₂O₂ ($\mu\text{mol/L}$)	100	(+) 88.52	(+) 75.14	(+) 102.64	(+) 120.63
NT (nmol/L)	100	(+) 22.03	(-) 5.08	(+) 25.42	(-) 16.95
LPA ($\mu\text{mol/L}$)	100	(+) 3.65	(+) 6.68	(+) 43.13	(+) 18.47
TBARS ($\mu\text{mol/L}$)	100	(+) 75.58	(+) 254.65	(+) 251.16	(+) 148.84



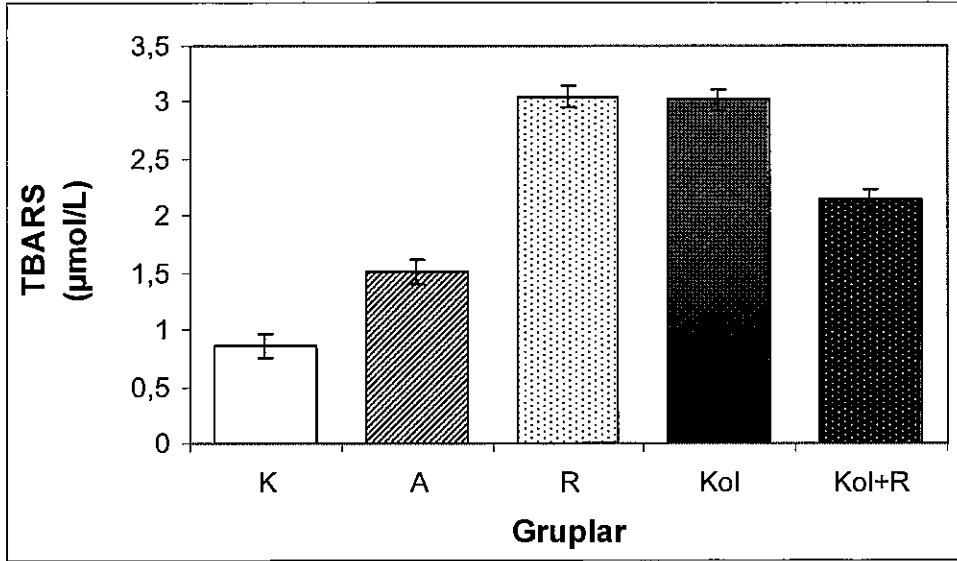
Şekil 4.8.1. Kontrol ve deney gruplarının serum H₂O₂ düzeyleri.



Şekil 4.8.2. Kontrol ve deney gruplarının serum NT düzeyleri.



Şekil 4.8.3. Kontrol ve deney gruplarının serum LPA düzeyleri.



Şekil 4.8.4. Kontrol ve deney gruplarının serum TBARS düzeyleri

4.9 Kontrol ve deney gruplarının karaciğer dokularında ölçülen antioksidan enzim (G-6-PD, SOD, KAT, GSH-Px, GR ve GST) aktiviteleri, GSH, GSSG, ve TBARS düzeyleri ve GSH/GSSG oranları.

4.9.1. G-6-PD aktiviteleri

Kontrol ve deney gruplarına ait G-6-PD aktivitelerinin dağılımı Tablo 4.9.1 ve Şekil 4.9.1'de gösterilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan sıçanların G-6-PD aktivitesi A, Kol ve Kol+R grupları ile kıyaslandığı zaman, A, Kol ve Kol+R gruplarında artış görülmüştür ($p<0.001$). Kol+R sıçan grubunun G-6-PD aktivitesi, Kol sıçan grubuna göre azalmıştır ($p<0.001$). G-6-P-D aktivitesindeki yüzde değişimleri Tablo 4.9.2' de verilmiştir. Kontrole göre, G-6-PD aktivitesinin en çok arttığı grubun Kol grubu (%107.67) olduğu tespit edilmiştir.

4.9.2. SOD aktiviteleri

Kontrol ve deney gruplarına ait SOD aktivitelerinin dağılımı Tablo 4.9.1 ve Şekil 4.9.2'de gösterilmiştir. SOD aktivitesinin en çok arttığı grubun R grubu olduğu bulunmuştur. R grubunun SOD aktivitesi, K, A, R ve Kol+R gruplarına göre artmıştır ($p<0.001$). Kol ve K grupları arasında SOD aktivitesi bakımından anlamlı farklılık bulunamamıştır. Kol+R grubunun SOD aktivitesi, Kol grubuna göre azalmıştır ($p<0.001$). SOD aktivitesindeki yüzde değişimleri Tablo 4.9.2' de verilmiştir. Kontrole göre, SOD aktivitesindeki yüzde değişiminin en fazla Kol+ R grubunda (%45.41) olduğu tespit edilmiştir.

4.9.3. KAT aktiviteleri

Kontrol ve deney gruplarına ait KAT aktivitelerinin gruplara göre dağılımı Tablo 4.9.1 ve Şekil 4.9.3'de gösterilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan sıçanların Kol grubunun KAT aktivitesinin, Kol+R grubuna göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.001$). KAT aktivitesindeki yüzde değişimleri Tablo 4.9.2' de verilmiştir. Kontrole göre, KAT aktivitesinin en çok azaldığı grubun R grubu (% 45.28) olduğu bulunmuştur.

4.9.4. GSH-Px aktiviteleri

Kontrol ve deney gruplarına ait GSH-Px aktivitelerinin dağılımı Tablo 4.9.1 ve Şekil 4.9.4'de gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, GSH-Px aktivitesi A, Kol ve Kol+R grubunda artarken, R grubu ile anlamlı bir fark yoktur. Kol+R grubunun GSH-Px aktivitesi, Kol grubuna göre artmıştır. GSH-Px aktivitesindeki yüzde değişimleri Tablo 4.9.2' de verilmiştir. Kontrole göre, GSH-Px aktivitesindeki azalmanın en fazla Kol grubunda (%39.22) olduğu tespit edilmiştir.

4.9.5. GR aktiviteleri

Kontrol ve deney gruplarına ait GR aktivitelerinin dağılımı Tablo 4.9.1 ve Şekil 4.9.5'de gösterilmiştir ($p<0.001$). R, Kol ve Kol+R grubunun GR aktivitesi K ve A grubuna göre artmıştır ($p<0.001$). Kol+R grubunun GR aktivitesi, Kol grubuna

göre azalmıştır ($p<0.001$). GR aktivitesindeki yüzde değişimleri Tablo 4.9.2' de verilmiştir. Buna göre, GR aktivitesindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%61.94) olduğu tespit edilmiştir.

4.9.6. GST aktiviteleri

Kontrol ve deney gruplarına ait GST aktivitelerinin dağılımı Tablo 4.9.1. ve Şekil 4.9.6'da gösterilmiştir. R ve Kol sıçan grubunun GST aktivitesinin, K, A ve Kol+R grubuna göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.001$). GST aktivitesindeki yüzde değişimleri Tablo 4.9.2' de verilmiştir. Kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçanların GST aktivitesi birbirleriyle kıyaslandığı zaman, GST aktivitesinin en çok arttığı grubun Kol grubu (%34.43) olduğu bulunmuştur.

4.9.7. GSH düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarına ait GSH düzeylerinin dağılımı Tablo 4.9.1 ve Şekil 4.9.7'de gösterilmiştir. A, R ve Kol+R gruplarının GSH düzeyleri kontrol grubuna göre azalırken, Kol grubunun GSH değerleri kontrol grubuna göre artmıştır ($p<0.01$). Kol+R grubunun GSH düzeyi ile Kol grubunun GSH düzeyi karşılaştırıldığı zaman, Kol+R grubunun GSH düzeyi, Kol grubunun GSH düzeyine göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$). GSH düzeylerindeki yüzde değişimleri Tablo 4.9.2' de verilmiştir. Kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçanların GSH düzeyleri birbirleriyle kıyaslandığı zaman, GSH düzeyindeki en fazla artışın Kol grubunda (%62.25) olduğu bulunmuştur.

4.9.8. GSSG düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarına ait GSSG düzeyleri Tablo 4.9.1 ve Şekil 4.9.8'de gösterilmiştir. A, R ve Kol grubunun GSSG düzeyinin, K grubuna göre arttığı bulunmuştur. Kol+R grubunun GSSG düzeyi, Kol grubunun GSSG düzeyine göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçanların GSSG düzeyleri birbirleriyle kıyaslandığı zaman, GSSG düzeyindeki en fazla artışın Kol sıçan grubunda (%188.00) olduğu bulunmuştur.

4.9.9. GSH/GSSG oranları

Kontrol ve deney gruplarına ait GSH/GSSG oranlarının dağılımı Tablo 4.9.1 ve Şekil 4.9.9'da gösterilmiştir. K ve Kol+R grubunun GSH/GSSG oranı, A, R ve Kol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Kol+R grubunun GSH/GSSG oranının, Kol grubunun GSH/GSSG oranına göre arttığı bulunmuştur ($p<0.001$). GSH/GSSG oranlarının yüzde değişimleri Tablo 4.9.2' de verilmiştir. Kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçanların GSH/GSSG oranları birbirleriyle kıyaslandığı zaman, en düşük GSH/GSSG oranın A grubunda (%58.33) olduğu bulunmuştur.

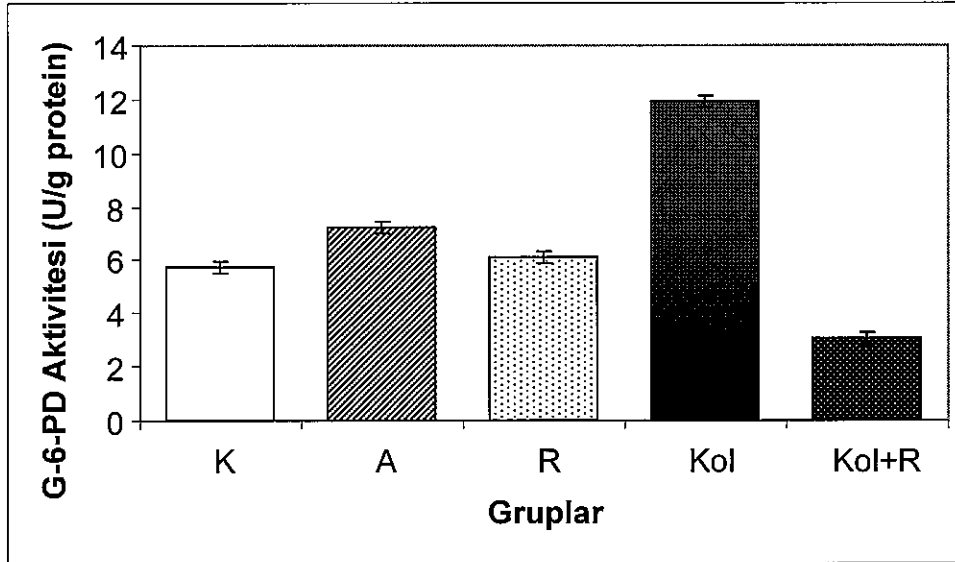
Tablo 4.9.1. Antioksidan enzim (G-6-PD, SOD, KAT, GSH-Px, GR ve GST) aktiviteleri, GSH ve GSSG, düzeylerinin ve GSH/GSSG oranlarının kontrol ve deney gruplarına göre dağılımı.

	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
G-6-PD (IU/g protein)	5.74 ± 0.15	7.24 ± 0.27 a: p<0.001	6.08 ± 0.27 b: p>0.05 c: p<0.005	11.92 ± 0.41 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	3.02 ± 0.16 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
SOD (IU/mg protein)	38.09 ± 0.96	37.11 ± 0.98 a: p>0.05	43.03 ± 1.08 b: p<0.001 c: p<0.001	36.46 ± 1.73 d: p>0.05 e: p>0.05 f: p<0.001	20.42 ± 1.11 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
KAT (k/g protein)	58.21 ± 1.45	44.98 ± 1.71 a: p<0.001	31.85 ± 1.23 b: p<0.001 c: p<0.001	36.18 ± 1.27 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.05	54.62 ± 2.22 g: p>0.05 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
GSH-Px (IU/mg protein)	34.40 ± 0.59	22.42 ± 0.58 a: p<0.001	34.30 ± 0.47 b: p>0.05 c: p<0.001	20.91 ± 0.61 d: p<0.001 e: p>0.05 f: p<0.001	26.08 ± 0.64 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
GR (IU/mg protein)	8.04 ± 0.18	4.55 ± 0.52 a: p<0.001	12.19 ± 0.37 b: p<0.001 c: p<0.001	13.02 ± 0.49 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p>0.05	10.63 ± 0.37 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.005 i: p<0.001
GST (U/g protein)	0.61 ± 0.02	0.63 ± 0.02 a: p>0.05	0.81 ± 0.03 b: p<0.001 c: p<0.001	0.82 ± 0.04 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p>0.05	0.61 ± 0.003 g: p>0.05 h: p>0.05 ı: p<0.001 i: p<0.001
GSH (mg/g protein)	4,98 ± 0.11	3.66 ± 0.07 a: p<0.001	4.36 ± 0.09 b: p<0.001 c: p<0.001	8.08 ± 0.18 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	4.57 ± 0.09 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p>0.05 i: p<0.001
GSSG (mg/g protein)	43,99 ± 1.59	77.13 ± 1.43 a: p<0.001	77.16 ± 1.37 b: p<0.01 c: p>0.05	126.69 ± 4.23 d: p<0.01 e: p<0.05 f: p<0.01	44.72 ± 1.82 g: p>0.05 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
GSH/GSSG	0.12 ± 0.00	0.05 ± 0.00 a: p<0.001	0.06 ± 0.00 b: p<0.001 c: p<0.005	0.06 ± 0.00 d: p<0.001 e: p<0.005 f: p>0.05	0.11 ± 0.00 g: p>0.05 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001

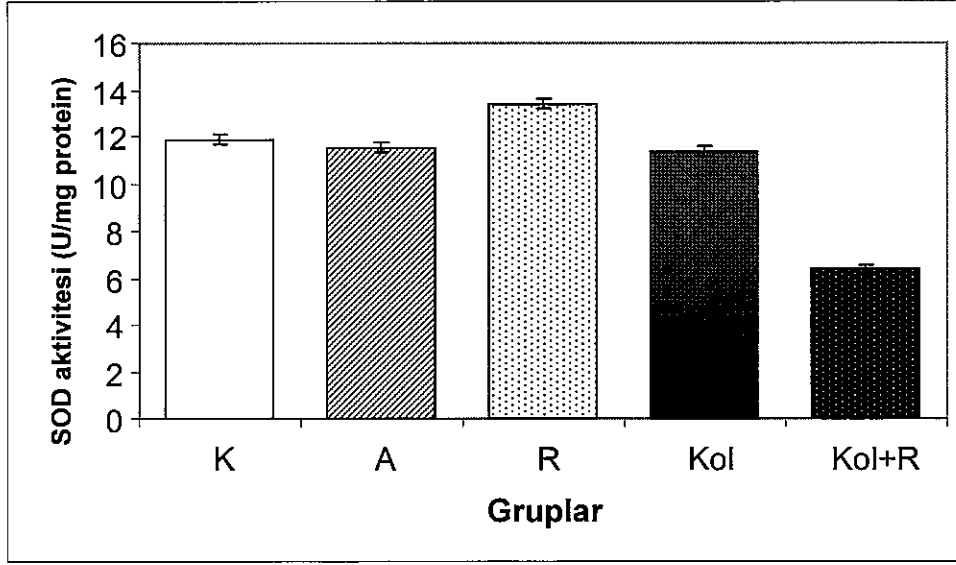
K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, ı: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması.

Tablo 4.9.2. Deney gruplarının karaciğer dokusundaki antioksidan enzim (G-6-PD, SOD, KAT, GSH-Px, GR ve GST) aktiviteleri, GSH ve GSSG düzeyleri ve GSH/GSSG oranlarının kontrol grubuna göre yüzde değişimi.

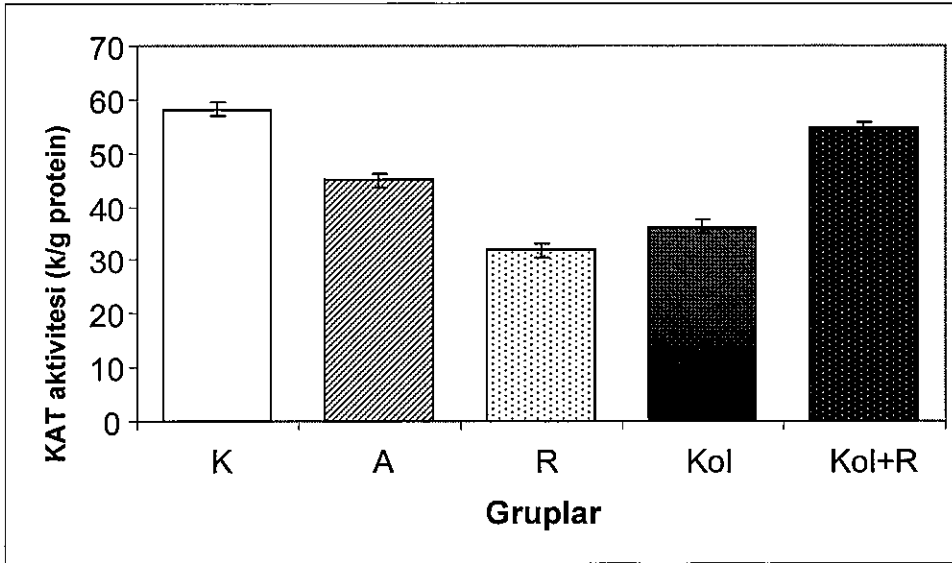
	% Değişim				
	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
G-6-PD (IU/g protein)	100	(+) 26.13	(+) 5.92	(+) 107.67	(-) 47.39
SOD (IU/mg protein)	100	(-) 2.70	(+) 12.91	(-) 4.30	(-) 46.41
KAT (k/g protein)	100	(-) 22.73	(-) 45.28	(-) 37.85	(-) 6.17
GSH-Px (IU/mg protein)	100	(-) 34.83	(-) 0.29	(-) 39.22	(-) 24.19
GR (IU/mg protein)	100	(-) 43.41	(+) 51.62	(+) 61.94	(+) 32.21
GST (U/g protein)	100	(+) 3.28	(+) 32.79	(+) 34.43	(+) 0.001
GSH (mg/g protein)	100	(-) 26.51	(-) 12.45	(+) 62.25	(-) 8.23
GSSG (mg/g protein)	100	(+) 75.34	(+) 75.40	(+) 188.00	(+) 1.66
GSH/GSSG oranı	100	(-) 58.33	(-) 50.00	(-) 50.00	(-) 8.33



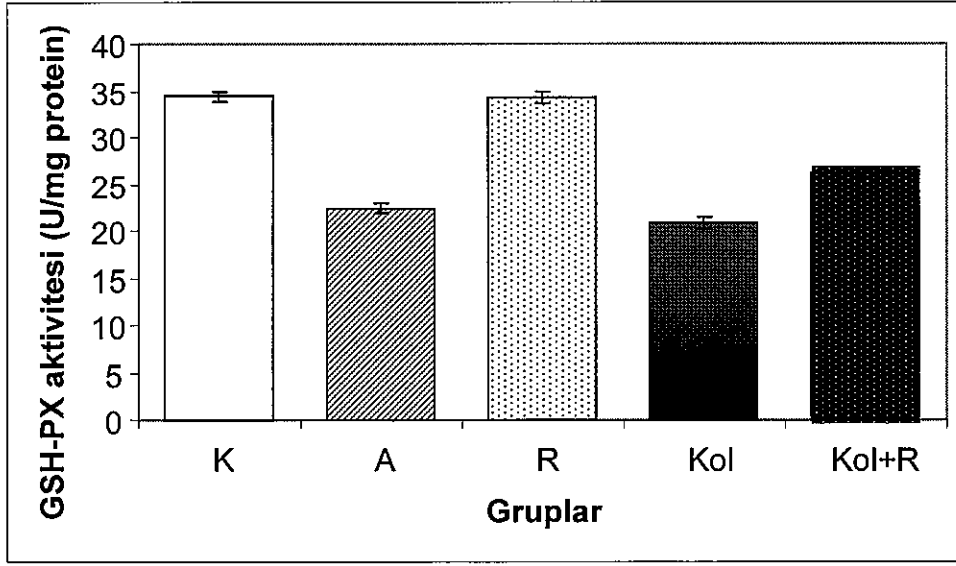
Şekil 4.9.1 Kontrol ve deney gruplarının G-6-PD aktiviteleri.



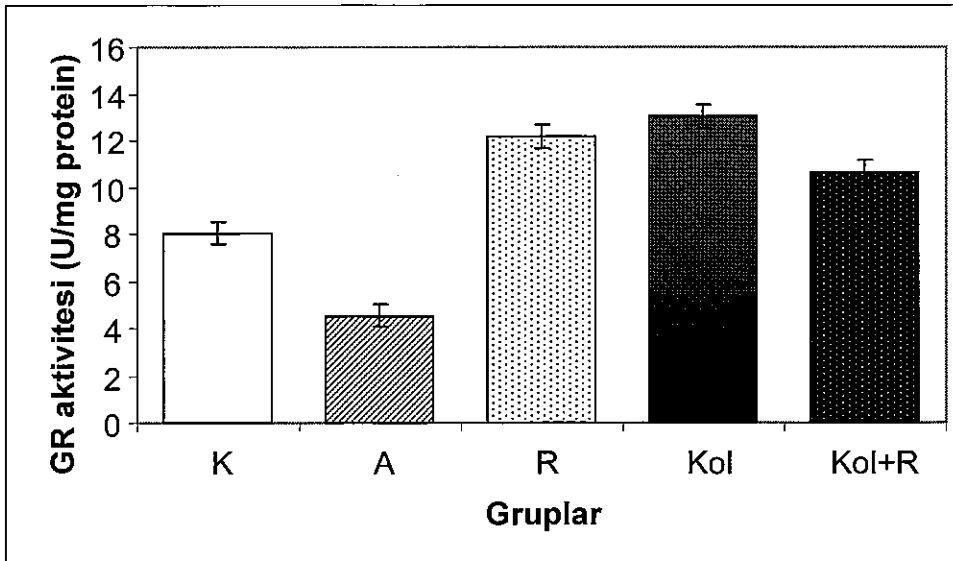
Şekil 4.9.2 Kontrol ve deney gruplarının SOD aktiviteleri.



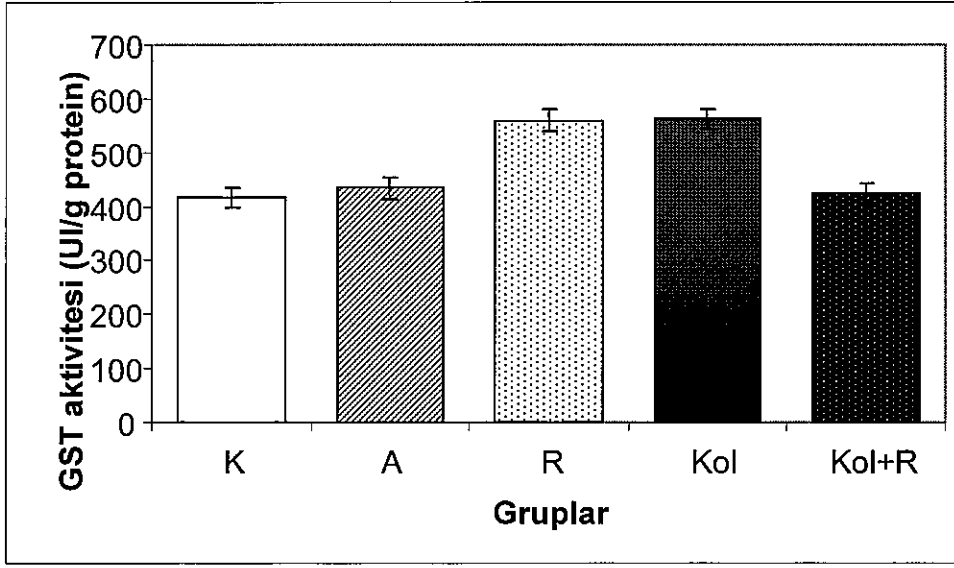
Şekil 4.9.3 Kontrol ve deney gruplarının KAT aktiviteleri.



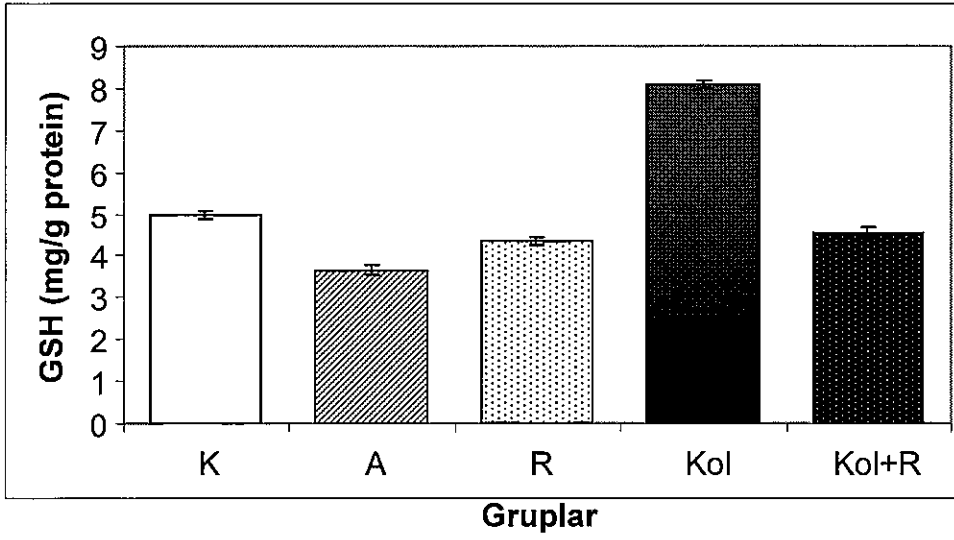
Şekil 4.9.4 Kontrol ve deney gruplarının GSH-Px aktiviteleri.



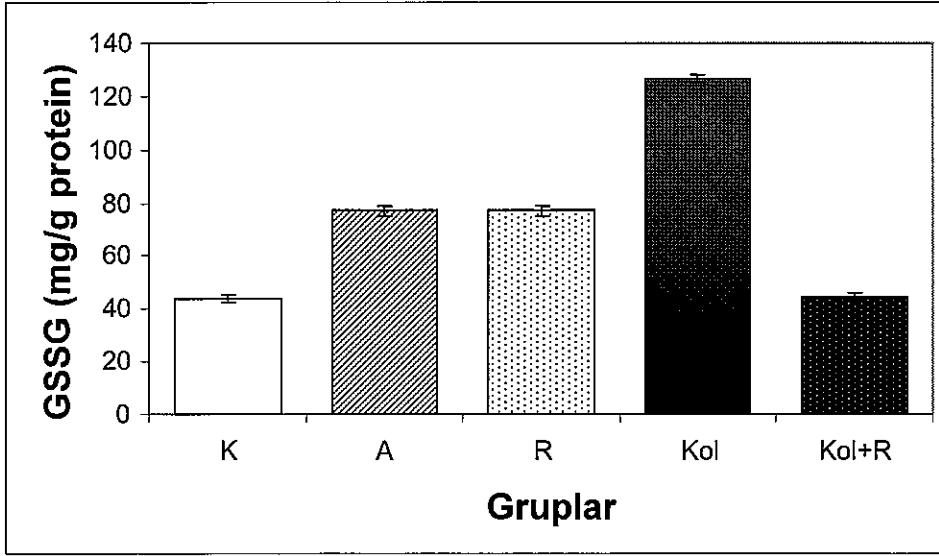
Şekil 4.9.5 Kontrol ve deney gruplarının GR aktivitelerinin dağılımı



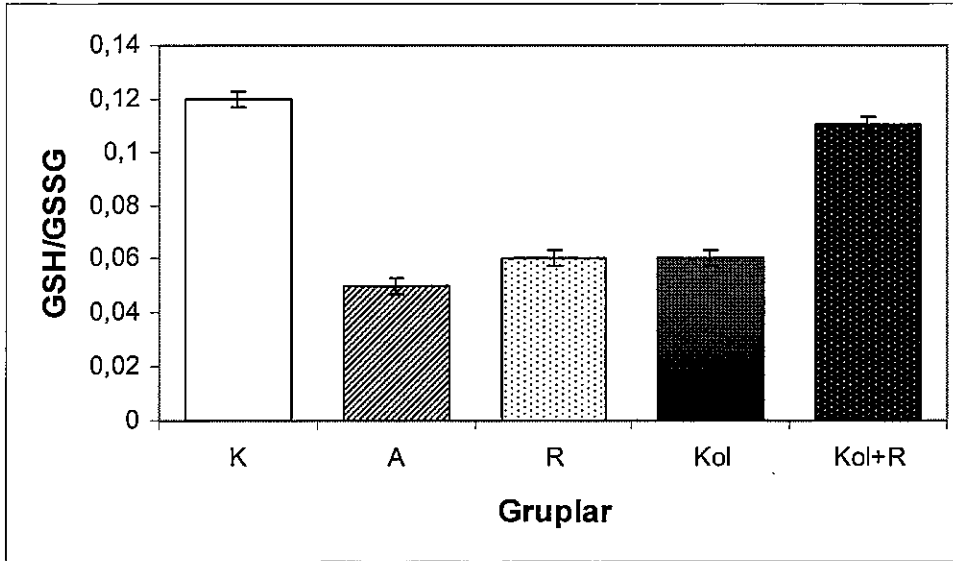
Şekil 4.9.6 Kontrol ve deney gruplarının GST aktiviteleri.



Şekil 4.9.7 Kontrol ve deney gruplarının GSH düzeyleri.



Şekil 4.9.8 Kontrol ve deney gruplarının GSSG düzeyleri.



Şekil 4.9.9 Kontrol ve deney gruplarının GSH/GSSG oranları.

4.10. Kontrol ve deney gruplarının AOP, PK, NO₂, NO₃, NT ve TBARS düzeyleri.

4.10.1. Antioksidan Potansiyel (AOP) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının AOP düzeyleri Tablo 4.10.1 ve Şekil 4.10.1’de verilmiştir. A, Kol ve Kol+R grubu gruplarının AOP düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma meydana gelmiştir ($p<0.001$). AOP düzeyine etkileri bakımından R grubu ve Kol+R grubu kıyaslandığında, Kol+R grubunun AOP düzeyi daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Kol+R grubunun AOP düzeyi, Kol grubunun AOP düzeyinden daha düşüktür ($p<0.001$). AOP düzeylerindeki yüzde değişimleri Tablo 4.10.2’ de verilmiştir. Buna göre, AOP düzeylerindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%57.65) olduğu tespit edilmiştir.

4.10.2. Protein Karbonil (PK) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının PK düzeyleri Tablo 4.10.1 ve Şekil 4.10.2’de verilmiştir. Deney gruplarının PK düzeyleri, kontrollere göre arttığı bulunmuştur ($p<0.001$). Kol ve Kol+R grubu karşılaştırıldığı zaman, Kol+R grubunun PK düzeyinin anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur ($p<0.001$). PK düzeylerindeki yüzde değişimleri Tablo 4.10.2’ de verilmiştir. Buna göre, PK düzeylerindeki yüzde değişiminin en fazla R grubunda (%134.30) olduğu tespit edilmiştir.

4.10.3. Nitrit (NO₂) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının NO₂ düzeyleri Tablo 4.10.1 ve Şekil 4.10.3’de verilmiştir. A, R, Kol ve Kol+R grupları kontrol ile kıyaslandığı zaman, NO₂ düzeyi bakımından anlamlı artış görülmüştür ($p<0.001$) Kol grubu ile Kol+R grubu NO₂ düzeyleri açısından birbirleriyle kıyaslandığı zaman, Kol grubunun NO₂ düzeyinde anlamlı düzeyde artma olduğu görülmüştür ($p<0.001$). NO₂ düzeylerindeki yüzde değişimleri Tablo 4.10.2’ de verilmiştir. Buna göre, NO₂ düzeylerindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%154.09) olduğu tespit edilmiştir.

4.10.4. Nitrat (NO₃) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarının NO₃ düzeyleri Tablo 4.10.1 ve Şekil 4.10.4’de verilmiştir. R, Kol ve Kol+R gruplarında NO₃ düzeyinin, kontrollere ve A grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulunmuştur ($p<0.001$). Kol ve Kol+R grubu karşılaştırıldığı zaman, Kol+R grubunun NO₃ düzeyinin Kol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.001$). NO₃ düzeylerindeki yüzde değişimleri Tablo 4.10.2’ de verilmiştir. Buna göre, NO₃ düzeylerindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%105.20) olduğu tespit edilmiştir.

4.10.5. Nitrotirozin (NT) düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarına ait NT düzeyleri Tablo 4.10.1 ve Şekil 4.10.6’da verilmiştir. Kol grubunun NT düzeyinin kontrollere göre arttığı bulunmuştur ($p<0.001$). R ve Kol+R gruplarının NT düzeyinin kontrollere göre azaldığı bulunmuştur ($p<0.001$). Kol ve Kol+R grupları NT düzeyi bakımından kıyaslandığı zaman, Kol+R grubunda azalma görülmüştür ($p<0.001$). NT düzeylerindeki yüzde

değişimleri Tablo 4.10.2' de verilmiştir. Buna göre, NT düzeylerindeki yüzde değişiminin en fazla Kol grubunda (%68.21) olduğu tespit edilmiştir.

4.10.6. TBARS düzeyleri

Kontrol ve deney gruplarına ait TBARS düzeylerinin dağılımı Tablo 4.10.1 ve Şekil 4.10.7'de gösterilmiştir. Kontrol grubunun TBARS düzeyi, A, R, Kol ve Kol+R grubuna göre düşüktür ($p<0.005$). Kol+R grubunun TBARS düzeyi Kol grubunun TBARS düzeyine göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.01$). TBARS düzeylerindeki yüzde değişimleri Tablo 4.10.2' de verilmiştir. Buna göre, TBARS düzeylerindeki yüzde değişiminin en fazla R grubunda (%68.21) olduğu tespit edilmiştir.

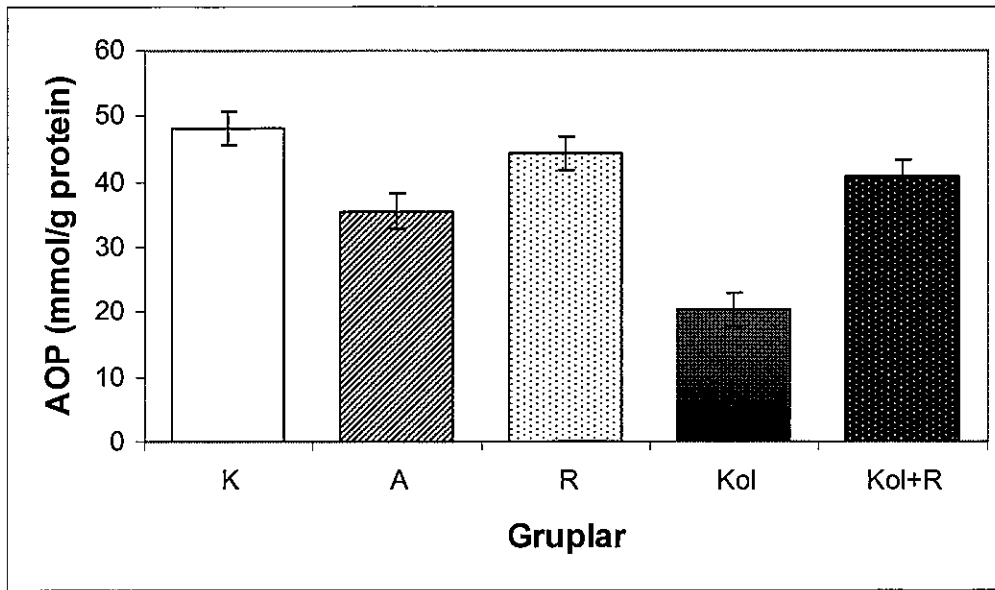
Tablo 4.10.1. Kontrol ve deney gruplarının AOP, PK, NO₂, NO₃, NT ve TBARS düzeyleri.

	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
AOP (mmol/g protein)	48.17 ± 3.60	35.53 ± 4.61 a: p<0.001	44.39 ± 7.33 b: p>0.05 c: p<0.001	20.40 ± 2.67 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.05	40.73 ± 4.64 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
PK (nmol/g protein)	9.68 ± 0.33	13.58 ± 0.52 a: p<0.001	22.68 ± 0.54 b: p<0.001 c: p<0.001	18.32 ± 0.42 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	21.70 ± 0.82 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p>0.05 i: p<0.001
NO₂ (µmol/g protein)	37.77 ± 0.85	43.69 ± 0.71 a: p<0.001	42.65 ± 0.94 b: p<0.001 c: p>0.05	95.97 ± 1.02 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	45.21 ± 0.78 g: p<0.001 h: p>0.05 ı: p>0.05 i: p<0.001
NO₃ (µmol/g protein)	30.18 ± 0.81	33.45 ± 0.45 c: p>0.05	56.09 ± 1.26 b: p<0.001 c: p<0.001	61.93 ± 1.84 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	59.16 ± 1.82 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p>0.05 i: p>0.05
NT (nmol/g protein)	11.70 ± 0.06	11.58 ± 0.08 a: p>0.05	5.28 ± 0.06 b: p<0.001 c: p<0.001	19.68 ± 0.13 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	4.83 ± 0.06 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p>0.05 i: p<0.001
TBARS (µmol/g protein)	2.78 ± 0.10	3.85 ± 0.17 a: p<0.001	4.77 ± 0.09 b: p<0.001 c: p<0.001	3.84 ± 0.13 d: p<0.001 e: p>0.05 f: p<0.001	3.36 ± 0.15 g: p<0.005 h: p<0.05 ı: p<0.001 i: p<0.01

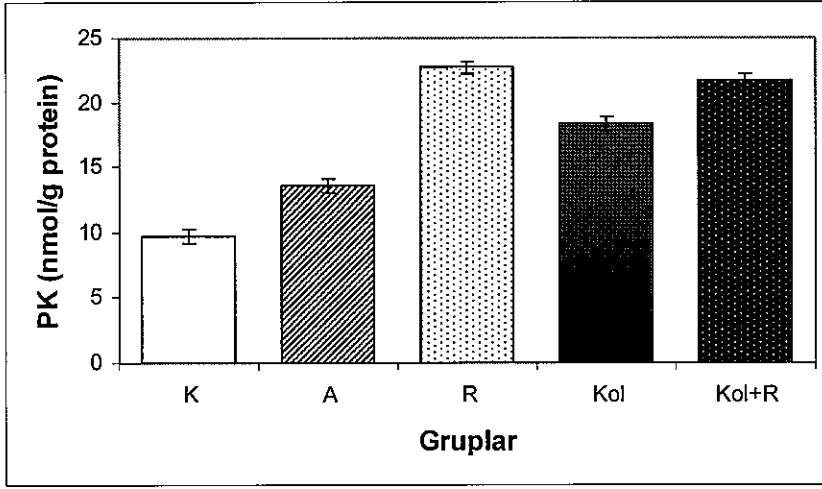
K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, ı: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması.

Tablo 4.10.2. Deney gruplarının AOP, PK, NO₂, NO₃, NT ve TBARS düzeylerinin kontrol grubuna göre yüzde değişimleri.

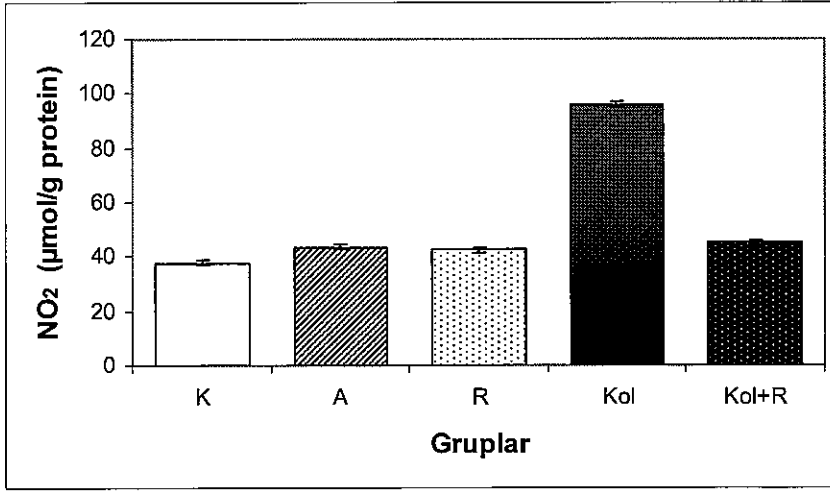
	% Değişim				
	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
AOP (mmol/g protein)	100	(-) 26.24	(-) 7.85	(-) 57.65	(-) 15.45
PK (nmol/g protein)	100	(+) 40.29	(+) 134.30	(+) 89.26	(+) 124.17
NO₂ (µmol/g protein)	100	(+) 15.67	(+) 12.92	(+) 154.09	(+) 19.70
NO₃ (µmol/g protein)	100	(+) 10.83	(+) 85.85	(+) 105.20	(+) 96.02
NT (nmol/g protein)	100	(-) 1.03	(-) 54.72	(+) 68.21	(-) 58.72
TBARS (µmol/g protein)	100	(+) 38.49	(+) 71.58	(+) 38.13	(+) 20.86



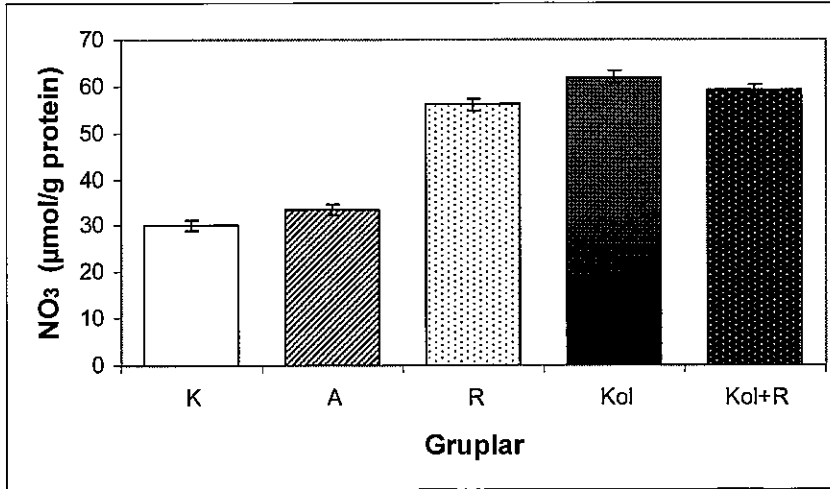
Şekil 4.10.1 Kontrol ve deney gruplarının AOP düzeyleri.



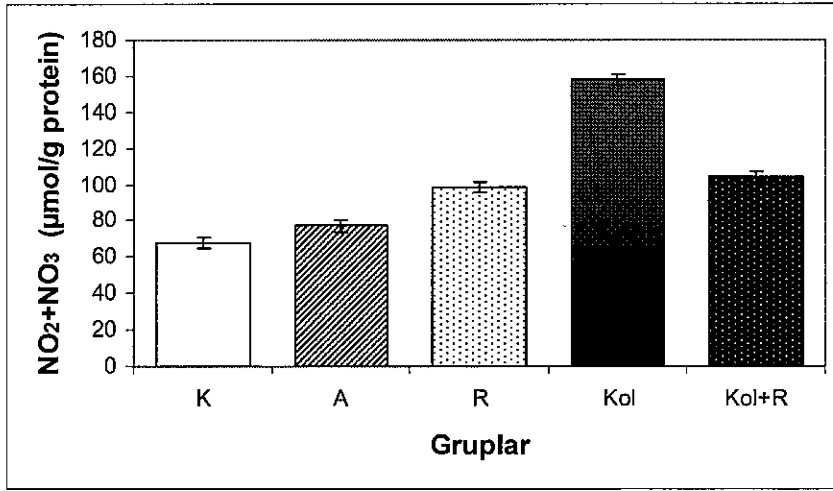
Şekil 4.10.2 Kontrol ve deney gruplarının PK düzeyleri.



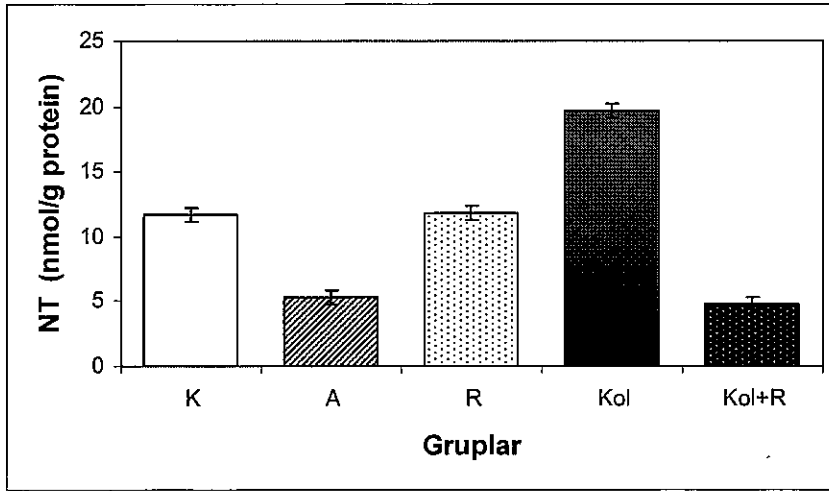
Şekil 4.10.3 Kontrol ve deney gruplarının NO₂ düzeyleri.



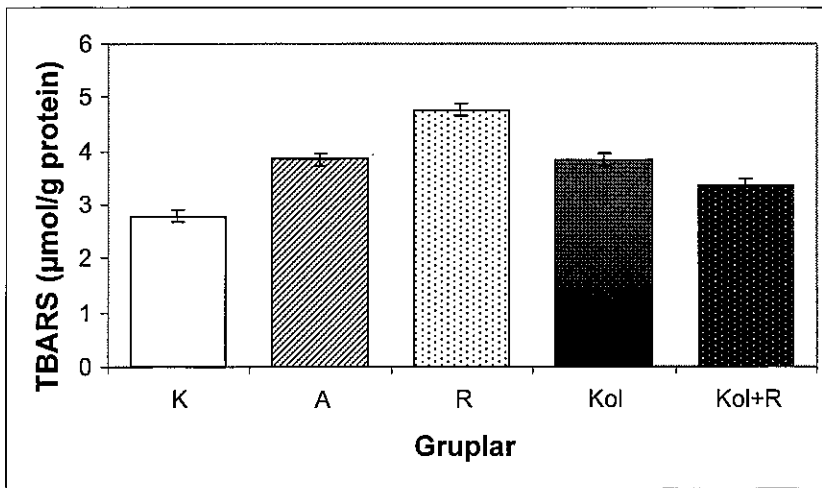
Şekil 4.10.4 Kontrol ve deney gruplarının NO₃ düzeyleri.



Şekil 4.10.5 Kontrol ve deney gruplarının NO₂+NO₃ düzeylerinin dağılımı



Şekil 4.10.6 Kontrol ve deney gruplarının NT düzeyleri.



Şekil 4.10.7 Kontrol ve deney gruplarının TBARS düzeyleri.

4.11. Kontrol ve Deney Gruplarının Internal Elastik Lamina Çevresi (IELC), İntimal Alan (IA), İntimal Genişlik (IG), Medial Alan (MA), Medial Genişlik (MG), Lümen+İntimal Çap (DLI), Maksimal İntimal Kalınlık/ Medyal Kalınlık (IMR), İntimal Alan/Medial Alan (ITI) ve Lümen Daralması (%LD) Değerleri.

4.11.1. Internal elastik lamina çevresi (IELC)

Kontrol ve deney gruplarının IELC düzeyleri Tablo 4.11.1. ve Şekil 4.11.1'de verilmiştir. A, Kol ve Kol+R grubunun IELC düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede artma meydana gelmiştir ($p<0.001$). IELC düzeyine etkileri bakımından R grubu ve Kol+R grubu kıyaslandığında, Kol+R grubunun IELC düzeyi daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Kol+R grubunun IELC düzeyi, Kol grubunun IELC düzeyinden daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

4.11.2. İntimal alan (IA)

Kontrol ve deney gruplarının IA düzeyleri Tablo 4.11.1. ve Şekil 4.11.2'de verilmiştir. Kol ve Kol+R gruplarının IA düzeyinin, kontrollere göre arttığı bulunmuştur ($p<0.001$). Kol ve Kol+R grubu karşılaştırıldığı zaman, Kol+R grubunun IA düzeyinin anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur ($p<0.001$).

4.11.3. İntimal genişlik (IG)

Kontrol ve deney gruplarının IG düzeyleri Tablo 4.11.1. ve Şekil 4.11.3'de verilmiştir. A, Kol ve Kol+R gruplarının kontrole göre daha yüksek IG düzeyi olduğu bulunmuştur ($p<0.001$) Kol grubu ile Kol+R grubu IG düzeyleri birbirleriyle kıyaslandığı zaman, Kol+R grubunun IG düzeyinde anlamlı düzeyde azalma olduğu görülmüştür ($p<0.001$).

4.11.4. Medial alan (MA)

Kontrol ve deney gruplarının MA düzeyleri Tablo 4.11.1. ve Şekil 4.11.4'de verilmiştir. Kol ve Kol+R gruplarında MA düzeyinin, kontrollere, A ve R grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulunmuştur ($p<0.001$ ve $p<0.005$). Kol ve Kol+R grubu karşılaştırıldığı zaman, Kol+R grubunun MA düzeyinin Kol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.001$).

4.11.5. Medial genişlik (MG)

Kontrol ve deney gruplarına ait MG düzeyleri Tablo 4.11.1. ve Şekil 4.11.5'de verilmiştir. A, Kol ve Kol+R gruplarının MG düzeyinin kontrol ve R grubuna göre arttığı bulunmuştur ($p<0.001$). Kol ve Kol+R grupları MG düzeyi bakımından kıyaslandığı zaman, Kol+R grubunda azalma görülmüştür ($p<0.001$).

4.11.6. Lümen+intima çapı (DLI)

Kontrol ve deney gruplarına ait DLI düzeyleri Tablo 4.11.1. ve Şekil 4.11.6'te gösterilmiştir. Kontrol grubunun DLI düzeyi, A, Kol ve Kol+R grubuna

göre düşüktür. Kol+R grubununun DLI düzeyi Kol grubunun DLI düzeyine göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

4.11.7. Maksimal intimal kalınlık/ medyal kalınlık (IMR)

Kontrol ve deney gruplarına ait IMR değeri Tablo 4.11.1. ve Şekil 4.11.7’de gösterilmiştir. Kontrol grubunun IMR değeri, A, R, Kol ve Kol+R grubuna göre düşüktür. Kol+R grubununun IMR değeri Kol grubunun IMR değeri göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

4.11.8. İntimal alan/medial alan (ITI)

Kontrol ve deney gruplarına ait ITI değeri dağılımı Tablo 4.11.8 ve Şekil 4.11.8’de gösterilmiştir. Kontrol grubunun ITI değeri, Kol grubuna göre düşüktür. Kol+R grubununun ITI değeri Kol grubunun ITI değeri göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$)

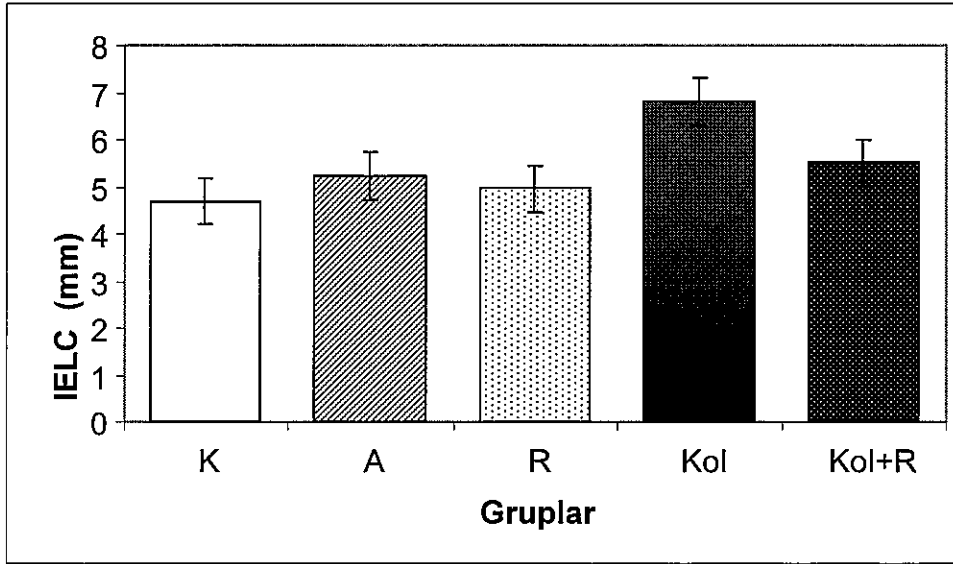
4.11.9. Yüzde lümen daralması (%LD)

Kontrol ve deney gruplarına ait %LD değeri dağılımı Tablo 4.11.9 ve Şekil 4.11.9’da gösterilmiştir. Kontrol grubunu oluşturan sıçanların %LD değeri bakımından birbirleriyle kıyaslandığı zaman, %LD düzeyindeki en fazla artışın Kol grubunda olduğu bulunmuştur. Kontrol grubunun %LD değeri, A, R, Kol ve Kol+R grubuna göre düşüktür. Kol+R grubununun %LD değeri Kol grubunun %LD değerine göre daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$)

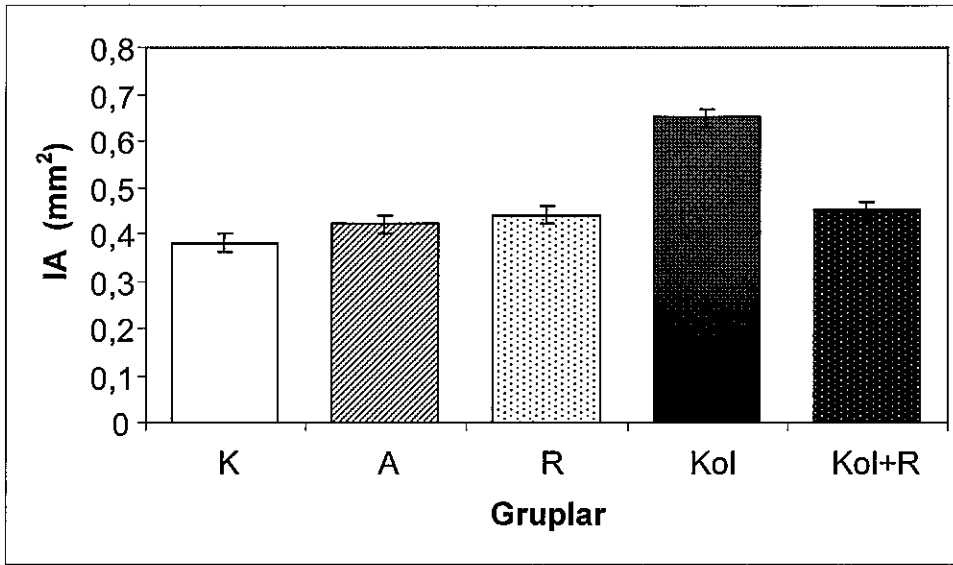
Tablo 4.11.1. Kontrol ve deney gruplarının Internal elastik lamina çevresi (IELC), intimal alan (IA), intimal genişlik (IG), medial alan (MA), medial genişlik (MG), lümen+intimal çap (DLI), maksimal intimal kalınlık/ medyal kalınlık (IMR), intimal alan/medial alan (ITI) ve lümen daralması (%LD) değerleri.

	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
IELC (mm)	4.70 ± 0.09	5.23 ± 0.11 a: p<0.05	4.96 ± 0.18 b: p>0.05 c: p>0.05	6.81 ± 0.27 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	5.52 ± 0.15 g: p<0.001 h: p>0.05 ı: p<0.001 i: p<0.001
IA (mm²)	0.38 ± 0.02	0.42 ± 0.02 c: p>0.05	0.44 ± 0.02 b: p>0.05 c: p>0.05	0.65 ± 0.03 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	0.45 ± 0.02 g: p<0.001 h: p>0.05 ı: p>0.05 i: p<0.001
IG (µm)	8.36 ± 0.22	10.83 ± 0.36 a: p<0.001	8.63 ± 0.23 b: p>0.05 c: p<0.001	18.45 ± 0.52 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	13.17 ± 0.32 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
MA (mm²)	0.38 ± 0.01	0.40 ± 0.01 c: p>0.05	0.39 ± 0.01 b: p>0.05 c: p>0.05	0.54 ± 0.02 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.005	0.47 ± 0.02 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.005
MG (µm)	8.65 ± 0.19	10.28 ± 0.38 a: p<0.001	9.32 ± 0.23 b: p>0.05 c: p<0.05	11.65 ± 0.36 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	10.16 ± 0.25 g: p<0.001 h: p>0.05 ı: p<0.05 i: p<0.001
DLI (mm)	1.50 ± 0.13	1.67 ± 0.12 a: p<0.05	1.46 ± 0.17 b: p>0.05 c: p>0.05	2.19 ± 0.28 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	1.76 ± 0.16 g: p<0.005 h: p>0.05 ı: p<0.05 i: p<0.001
IMR	0.96 ± 0.03	1.05 ± 0.02 c: p<0.05	0.93 ± 0.02 b: p>0.05 c: p<0.001	1.59 ± 0.04 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	1.30 ± 0.03 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001
ITI	1.00 ± 0.03	1.08 ± 0.06 c: p>0.05	1.12 ± 0.07 b: p>0.05 c: p>0.05	1.22 ± 0.05 d: p<0.01 e: p<0.05 f: p>0.05	0.96 ± 0.04 g: p>0.05 h: p>0.05 ı: p<0.05 i: p<0.001
%LD	7.96 ± 0.16	8.99 ± 0.12 a: p<0.005	8.08 ± 0.22 b: p>0.05 c: p<0.05	14.24 ± 0.36 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	12.03 ± 0.32 g: p<0.001 h: p<0.001 ı: p<0.001 i: p<0.001

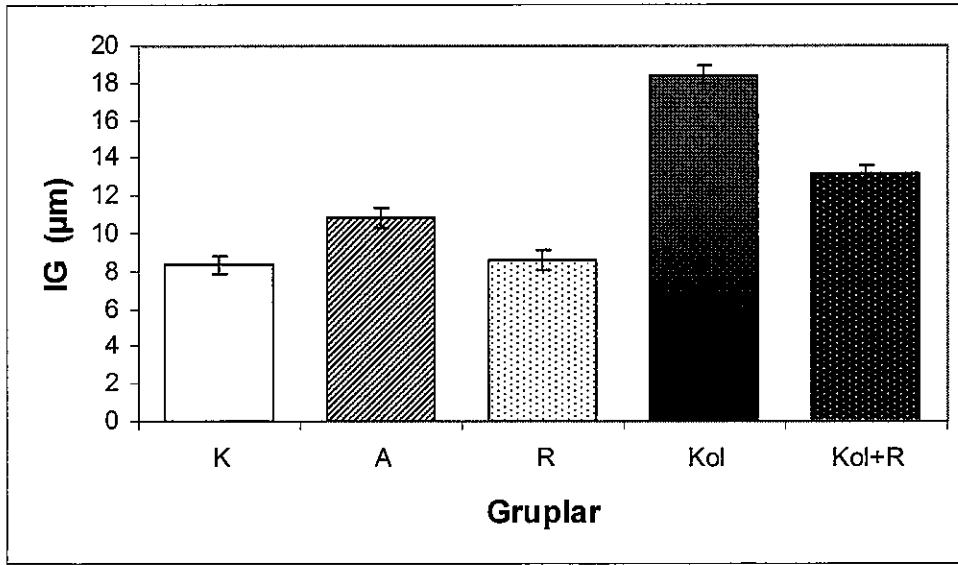
K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + resveratrol grubu. a: K ve A'nın, b: K ve R'nin, c: A ve R'nin, d: K ve Kol'ün, e: A ve Kol'ün, f: R ve Kol'ün, g: K ve Kol+R'nin, h: A ve Kol+R'nin, ı: R ve Kol+R'nin, i: Kol ve Kol+R'nin istatistiksel karşılaştırılması.



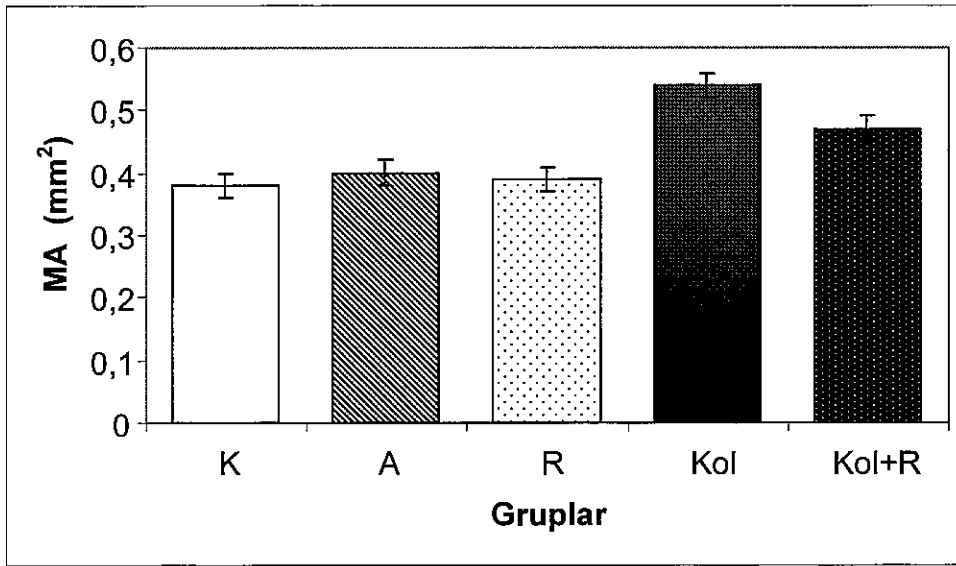
Şekil 4.11.1. Kontrol ve deney gruplarının internal elastik lamina çevresi (IELC)



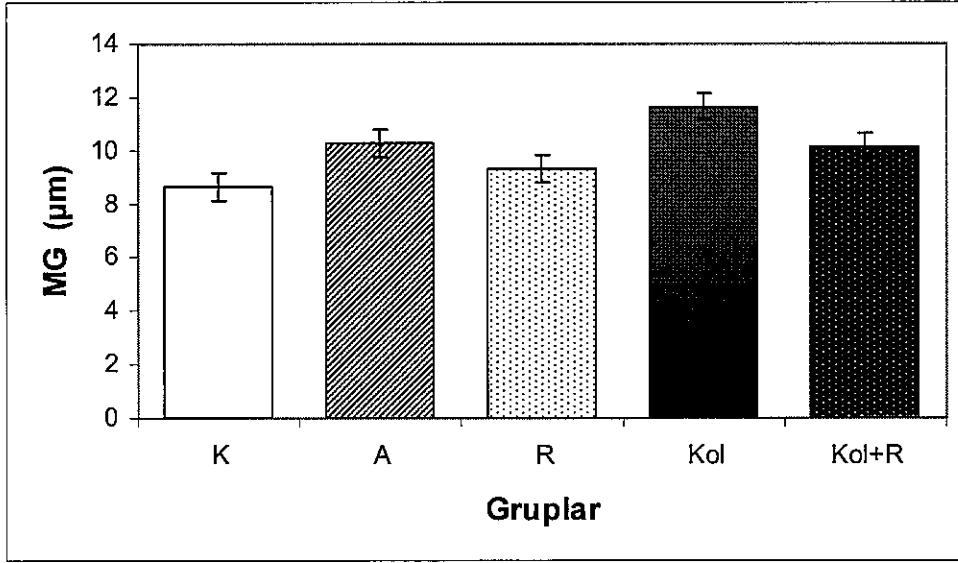
Şekil 4.11.2. Kontrol ve deney gruplarının intimal alanları (IA)



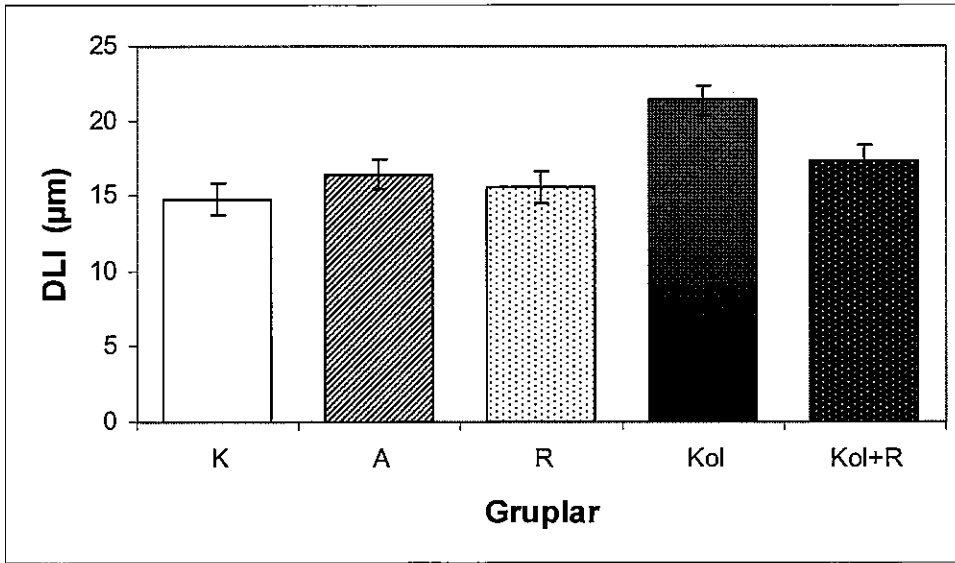
Şekil 4.11.3. Kontrol ve deney gruplarının intimal genişlikleri (IG),



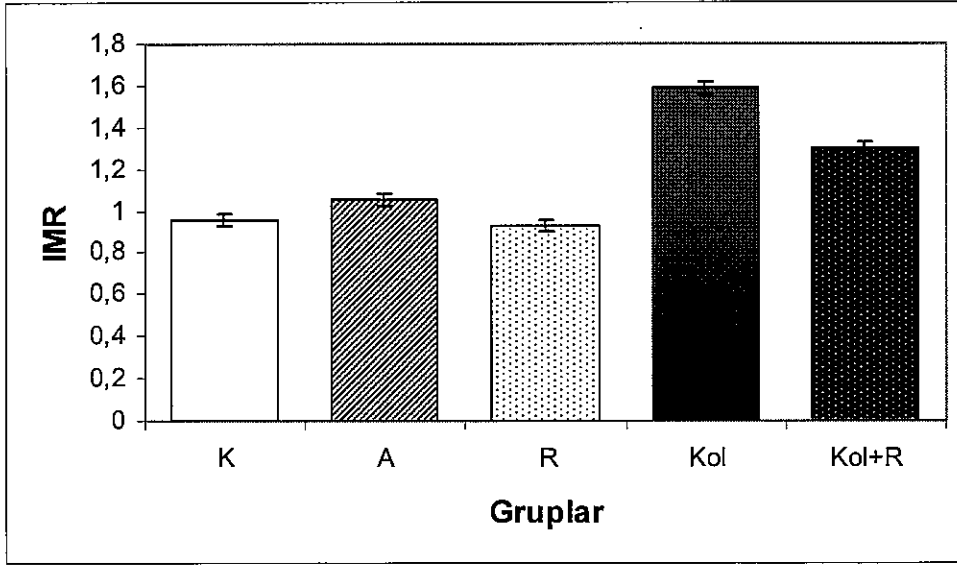
Şekil 4.11.4. Kontrol ve deney gruplarının medial alanları (MA)



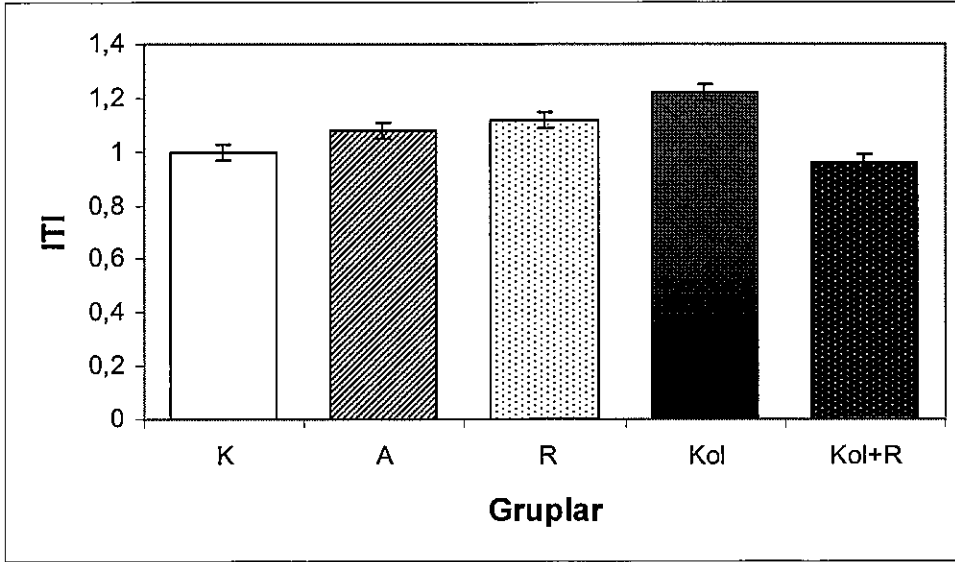
Şekil 4.11.5. Kontrol ve deney gruplarının medial genişlikleri (MG)



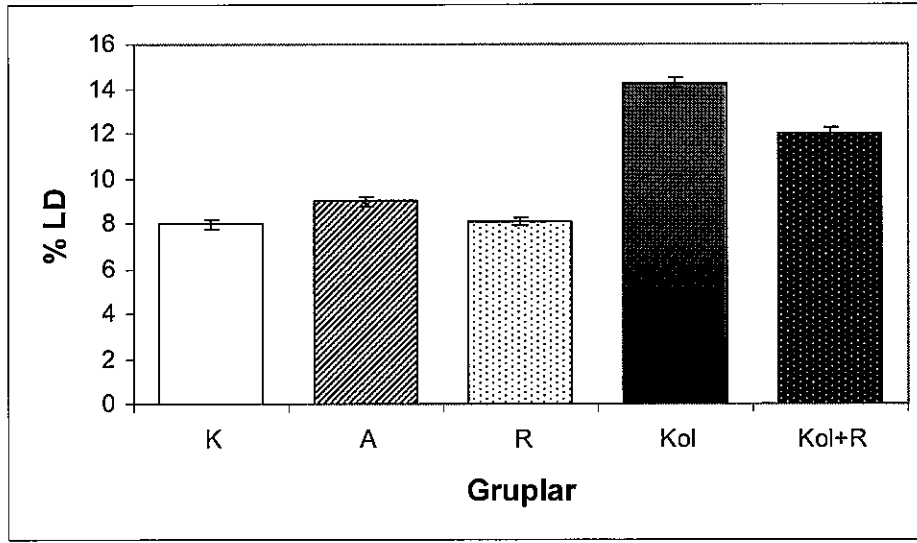
Şekil 4.11.6. Kontrol ve deney gruplarının lümen+intima çapları (DLI)



Şekil 4.11.7. Kontrol ve deney gruplarının maksimal intimal kalınlık/ medyal kalınlıkları (IMR)



Şekil 4.11.8. Kontrol ve deney gruplarının intimal alan/medial alanları



Şekil 4.11.9. Kontrol ve deney gruplarının yüzde lümen daralması (%LD)

4.11.10. Ateroskleroz tiplmesi

Kontrol ve deney gruplarından alınan damar örneklerinin distal (abdominal), proksimal (torakal) ve orta kısımlarının morfolojik olarak incelenmesi sonucunda, ateroskleroz tiplmesi yapılmış ve değerler Tablo 4.11.2’de ve Şekil 4.11.10, 4.11.11, 4.11.12, 4.11.13 ve 4.11.14 ‘te gösterilmiştir. Kontrol grubunda ateroskleroz her 3 kısımda da görülmezken, Kol grubunda tip 2 ateroskleroz her 3 damar kısmında da görülmüştür. Kolesterolle beslenen sıçanlara resveratrol verilmesi her 3 kısımda da aterosklerozu azaltmış olmakla beraber, azaltıcı etki en fazla orta kısımdan alınan örneklerde belirlenmiştir.

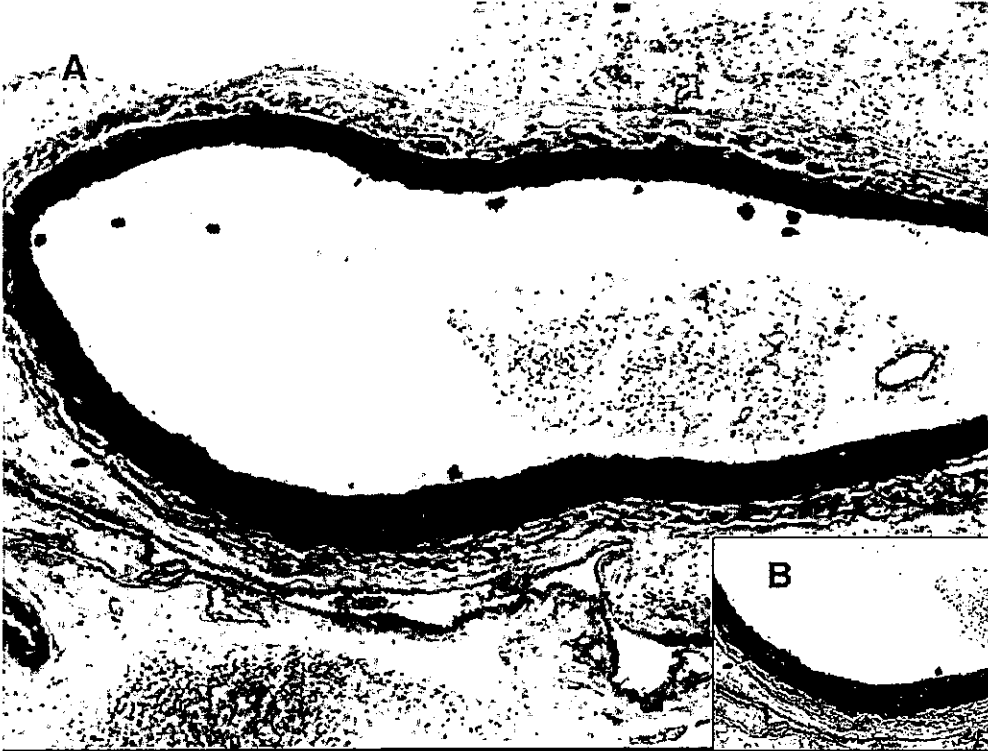
Tablo 4.11.2. Kontrol ve deney gruplarının distal (abdominal), proksimal (torakal) ve orta kısımlarının ateroskleroz tipleri. (Ortalama \pm SEM)

	Gruplar				
	K	A	R	Kol	Kol+R
DİSTAL	0.00 \pm 0.00	0.50 \pm 0.15 a: p<0.05	0.25 \pm 0.13 b: p>0.05 c: p>0.05	1.50 \pm 0.19 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	1.17 \pm 0.24 g: p<0.001 h: p<0.01 ı: p<0.001 i: p>0.05
ORTA	0.33 \pm 0.14	0.75 \pm 0.25 c: p>0.05	0.42 \pm 0.15 b: p>0.05 c: p>0.05	1.75 \pm 0.22 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	0.75 \pm 0.28 g: p>0.05 h: p>0.05 ı: p>0.05 i: p<0.005
PROKSİMAL	0.17 \pm 0.11	0.67 \pm 0.19 a: p<0.05	0.50 \pm 0.15 b: p>0.05 c: p>0.05	1.67 \pm 0.14 d: p<0.001 e: p<0.001 f: p<0.001	0.83 \pm 0.17 g: p<0.005 h: p>0.05 ı: p>0.05 i: p<0.001

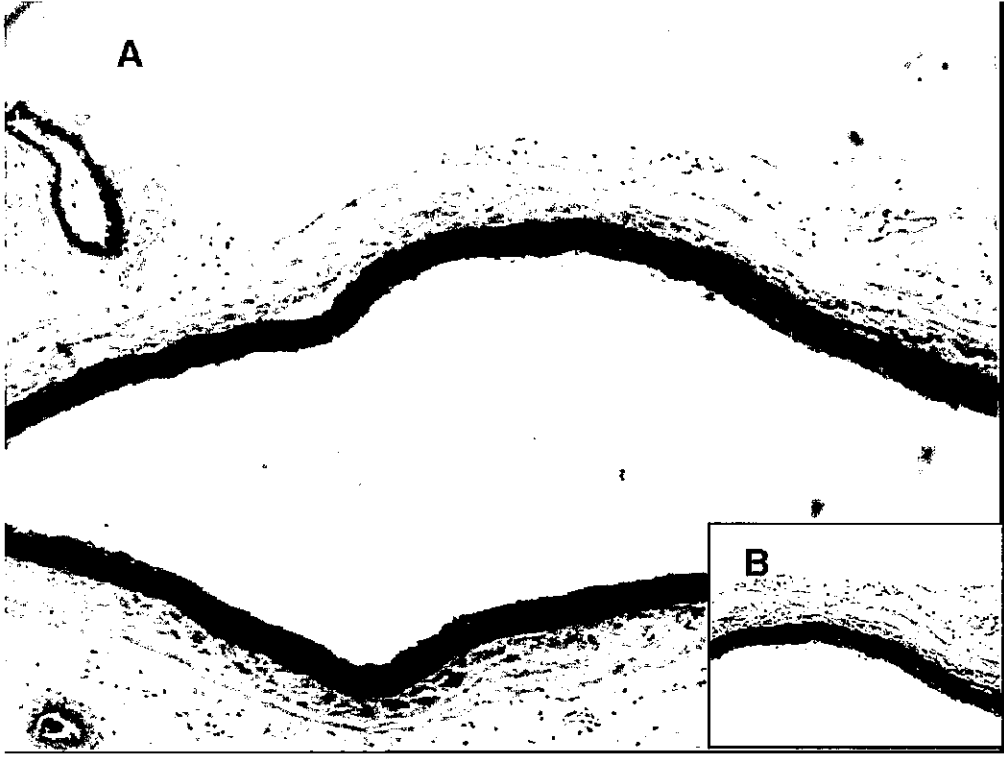
K: Kontrol grubu, A: Etanol grubu, R: Resveratrol grubu, Kol: Kolesterol grubu, Kol+R: Kolesterol + resveratrol grubu. a: K ve A’nın, b: K ve R’nin, c: A ve R’nin, d: K ve Kol’ün, e: A ve Kol’ün, f: R ve Kol’ün, g: K ve Kol+R’nin, h: A ve Kol+R’nin, ı: R ve Kol+R’nin, i: Kol ve Kol+R’nin istatistiksel karşılaştırılması.



Şekil 4.11.10. Kontrol grubu sıçan aortu H-E boyası ile gösterimi (A, 40x büyütme, B, 40x Verhoef doku boyası)



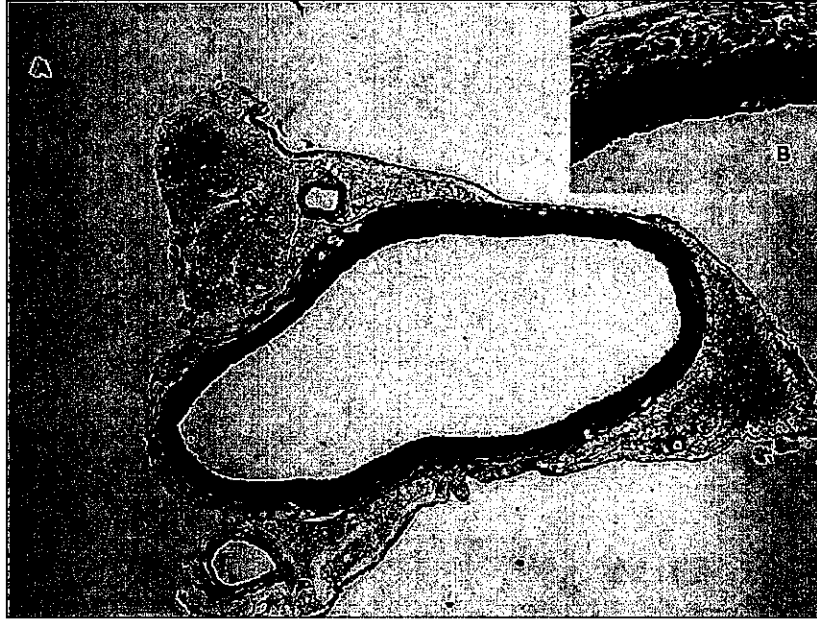
Şekil 4.11.11. Etanol grubu sıçan aortunda tip 1 ateroskleroz oluşumunun H-E boyası ile gösterimi. (A, 50x büyütme, B, 100x büyütme).



Şekil 4.11.12. Resveratrol grubu sıçan aortunun H-E boyası ile gösterimi. (A, 50x büyütme, B, 100x büyütme).



Şekil 4.11.13. Kolesterol grubu sıçan aortunda tip 2 ateroskleroz oluşumunun H-E boyası ile gösterimi. (A, 40x büyütme, B, 200x büyütme).



Şekil 4.11.14. Kol+Res Grubu sıçan aortunda tip 1 ateroskleroz oluşumunun H-E boyası ile gösterimi. (A, 40x büyütme, B,200x büyütme).

4.11. Korelasyon Analizlerinin Sonuçları

Ölçülen parametreler arasında korelasyon olup olmadığını araştırmak için, korelasyon analizleri yapılmıştır. Kontrol grubu, A, R, Kol ve Kol+R gruplarının kendi içlerinde korelasyon analizleri yapılmıştır.

Trombosit parametreleri açısından incelendiğinde, kontrol grubunda bulunan sıçanlarda, CD40 düzeyi ile CD40L düzeyi ($r=0.687$, $p<0.05$) arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. A grubunda CD40 düzeyi ile CD40L düzeyi ($r=0.686$, $p<0.05$) ve P-selektin düzeyi ($r=0.588$, $p<0.05$) arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. R grubunda CD40 düzeyi ile P-selektin düzeyi ($r=0.572$, $p<0.05$) arasında pozitif ve ROS düzeyi ($r=-0.606$, $p<0.05$) arasında negatif korelasyon gözlenmiştir. Kol grubunda CD40L düzeyi ile P-selektin düzeyi ($r=0.772$, $p<0.05$) ve ROS düzeyi ($r=0.281$, $p<0.05$) arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Kol+R grubunda CD40 düzeyi ile CD40L düzeyi ($r=0.743$, $p<0.005$), P-selektin düzeyi ($r=0.695$, $p<0.05$) arasında pozitif ve ROS düzeyi ($r=-0.606$, $p<0.05$) arasında negatif korelasyon gözlenmiştir.

Serum ve plazmada ölçülen parametreler açısından incelendiğinde, kontrol grubunda bulunan sıçanlarda sCD40 düzeyi ile HDL-K ($r=-0.662$, $p<0.01$) arasında negatif korelasyon, IL-6 ile oxLDL ($r=0.580$, $p<0.05$) arasında pozitif korelasyon, PON1 ile HDL-K arasında ($r=0.543$, $p<0.05$) pozitif ve LDL-K arasında ($r=-0.673$,

p<0.01), TBARS ile oxLDL arasında (r=0.583, p<0.05) pozitif korelasyon ve LPA ile NT arasında (r=-0.655, p<0.05) negatif korelasyon gözlenmiştir. A grubunda bulunan sıçanlarda sCD40 düzeyi ile oxLDL (r=0.643, p<0.01) arasında pozitif korelasyon, IL-6 ile PF4 (r=0.600, p<0.05) ve LDL-C (r=0.534, p<0.05) arasında pozitif korelasyon ve NT ile (r=-0.615, p<0.05) arasındanegatif korelasyon, TBARS ile oxLDL arasında (r=0.527, p<0.05) pozitif korelasyon ve NT ile PF4 arasında (r=-0.542, p<0.05) negatif korelasyon gözlenmiştir. R grubunda bulunan sıçanlarda sCD40 düzeyi ile PF4 (r=0.794, p<0.005) arasında pozitif korelasyon, PON1 ile LDL-K (r=-0.719, p<0.01) ve H₂O₂ arasında (r=-0.516, p<0.05) negatif korelasyon ve NT ile TK arasında (r=0.631, p<0.05) pozitif korelasyon gözlenmiştir. Kol grubunda bulunan sıçanlarda sCD40 düzeyi ile LDL-K (r=0.587, p<0.01) arasında pozitif korelasyon, IL-6 ile LDL-K (r=0.587, p<0.05) arasında pozitif korelasyon, PON1 aktivitesi ile PF4 düzeyi (r=0.685, p<0.05) pozitif korelasyon, TBARS ile oxLDL (r=0.531, p<0.05) ve LPA (r=0.701, p<0.01) arasında pozitif korelasyon ve NT ile TK (r=0.690, p<0.05) ve oxLDL (r=0.581, p<0.05) arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir. Kol+R grubunda bulunan sıçanlarda IL-6 ile PF4 (r=-0.605, p<0.05) arasında negatif korelasyon, TBARS ile TK (r=0.636, p<0.05) arasında pozitif korelasyon ve NT ile H₂O₂ (r=0.597, p<0.05) arasında pozitif korelasyon gözlenmiştir.

Karaciğer dokusundaki parametreler açısından incelendiğinde, kontrol grubunda bulunan sıçanların G-6-PD aktivitesi ile GR aktivitesi arasında (r=0.569, p<0.05) pozitif korelasyon bulunurken, NO₃ düzeyleri arasında (r=-0.636, p<0.05) negatif korelasyon, SOD aktivitesi ile GSH düzeyi (r=0.575, p<0.05) ve GSH/GSSG oranı (r=0.544, p<0.01) arasında pozitif korelasyon bulunurken, KAT aktivitesi aktivitesi ile NO₂ düzeyi arasında (r=0.781, p<0.005) pozitif korelasyon, NT düzeyi ile GST aktivitesi arasında (r=-0.636, p<0.05) negatif korelasyon olduğu tespit edilmiştir. Kol grubunda GSH-Px aktivitesi ile GST aktivitesi (r=0.776, p<0.01) ve AOP düzeyi (r=0.723, p<0.01) arasında pozitif ve GSH/GSSG oranı (r=-0.605, p<0.05) arasında negatif korelasyon görülmüştür. AOP düzeyi ile GSH-Px aktivitesi (r=0.723, p<0.05), KAT (r=0.567, p<0.05) aktivitesi arasında pozitif korelasyon NO₂ ve (r=-0.657, p<0.05) TBARS (r=-0.593, p<0.05) düzeyi arasında negatif korelasyon bulunmuştur.Kol+R grubunda AOP düzeyi ile GST aktivitesi arasında (r=0.585, p<0.05), TBARS düzeyi ile GSH-Px aktivitesi (r=0.798, p<0.005) ve PK düzeyi (r=0.617, p<0.05) arasında pozitif, GR (r=-0.541,p<0.05) ve GST (r=-0.691,p<0.05) aktiviteleri arasında negaif korelasyon olduğu tespit edilmiştir.

TARTIŞMA

Gelişmiş ülkelerde ölüm nedenleri arasında birinci sıralarda bulunan ateroskleroz ile ilgili epidemiyolojik araştırmalarda en önemli risk faktörü olarak bilinen hiperkolesteroleminin şarapta bulunan flavanoitlerle kontrol altına alınabileceği kanıtlanmıştır (278). Bu doğrultuda resveratrolün deneysel hiperkolesterolemi üzerine etkinliği rat modeli kullanılarak incelendi. İnsanlardaki lipoprotein profiline benzerliği bilinen bu hayvan türünde kolesterol oranı yüksek diyetlerin, LDL-K artışı ile karakterize hızlı bir hiperkolesterolemiye neden olduğu bildirilmiştir (279). Bu çalışmada, % 5 oranında kolesterol içeren yemlerle beslenen deney gruplarının lipoprotein düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında, yemlerin verilmesinden kısa bir süre sonra (yaklaşık 4 hafta) plazma kolesterol düzeyinde artış nedeniyle hiperkolesteroleminin şekillendiği saptandı. Yemlerle kolesterol verilen gruplarda 8. haftadan itibaren serum kolesterol düzeyinin istatistiksel yönden artışı, total kolesterolün en önemli fraksiyonunu oluşturan ve perifer dokulara % 60-75 oranında taşınmasını sağlayan LDL-K artışından kaynaklanmaktadır (280).

Bizim bulgularımıza göre, 2 ay 20 günlük deney süresi içinde kontrol grubunu oluşturan sıçanların genel görünüm ve davranışlarında herhangi bir farklılık ve göze çarpan bir değişiklik gözlenmemiştir. Kontrollere göre, kolesterolle beslenen sıçanların hareketlerinde bir değişiklik olmazken, daha hızlı kilo aldıkları görülmüştür.

Bu araştırmanın sonuçlarına göre, intraperitoneal (IP) etanol veya resveratrol verilmesi sonucunda yem tüketimlerinde herhangi bir değişikliğe rastlanmadığı halde, kolesterolle beslenen sıçanların günlük yem tüketimlerinde kontrollerine göre artma meydana gelmiştir. Kolesterol ve Kol+R grupları arasında yem tüketimleri açısından fark görülmemiştir. Kasdallah-Grisha ve arkadaşları (281) 6 hafta süreyle IP etanol verilen ratların vücut ağırlıklarında azalma görmekte birlikte, bizim bulgularımızı destekler biçimde resveratrol verilen ratların vücut ağırlıklarında kontrollerine göre değişiklik görmemişlerdir. Diğer yandan, kolesterol ve resveratrolle beslenen ratlarla ilgili bizim çalışmamıza benzer rat çalışmasına literatürde rastlanamamıştır. Kolesterolle beslenmenin sonucunda yem tüketiminin artmasının nedeni, hayvanların vücut ağırlığının artmasına bağlı olarak daha çok yemeye ihtiyaç duymaları olabilir.

Kontrol ve deney gruplarının tümünde günlük su tüketimleri ölçülmüştür. Kolesterolle beslenen grupların su tüketimleri kontrollerine göre anlamlı düzeyde artmıştır. Kol ve Kol+R grupları kıyaslandığında, su tüketimi bakımından aralarında bir farklılık olmadığı görülmüştür. Kolesterolle beslenme ile birlikte su tüketiminin artması, yem tüketiminin artmasına bağlı gelişen bir artış şeklinde yorumlanabilir. Su

tüketimi ile ilgili bulgularımızı kıyaslayabileceğimiz herhangi bir araştırmaya literatür taraması sırasında rastlanamamıştır.

Deney süresince, tüm gruplardaki sıçanların vücut ağırlık değişimleri kaydedilmiştir. Tüm hayvanların deney sonundaki ağırlıkları deney başlangıcına oranla artmıştır. Bu artış 2 ay 20 gün süreyle hayvanların büyümesine bağlıdır. Kontrol ve deney grubu hayvanlarının son ağırlıkları arasındaki farklara göre yapılan istatistiksel analiz sonucunda, kontrol, A ve R gruplarında bulunan hayvanlar arasında anlamlı derecede farklılık bulunmamıştır. Kolesterolle beslenen sıçanların vücut ağırlıkları deney sonunda kontrollere göre anlamlı derecede artarken, Kol+R grubundaki sıçanların vücut ağırlıkları Kol grubuna göre anlamlı derecede azalmıştır. Kolesterolle 2 ay beslendikten sonra 20 gün süreyle intraperitoneal resveratrol verilen sıçan grubunun vücut ağırlığı A ve R grupları ile karşılaştırıldığında, herhangi bir farklılık saptanmamıştır. Sadece kontrollere göre vücut ağırlıklarının arttığı görülmüştür. Yokogoshi ve arkadaşları (282) yapmış olduğu hiperkolesterolemi modelinde, Wistar sıçanlarına %1 kolesterol vermişler ve 14 günlük kolesterolle besleme sonunda vücut ağırlığı ve yem tüketiminde değişiklik görmemişlerdir. Bu sonuçlar, bizim sonuçlarımızla uyumlu değildir. Ağırlık artışının nedeni, sıçanların kolesterolü yemin tadını daha yenebilir bulmasından veya enerji ihtiyaçlarının artmış olmasından kaynaklanabilir.

Daha önceki çalışmalarda atherosklerozlu hastalarda aktive endotel hücreler, lökositler ve düz kas hücreleri ve trombojenik yolakların aktive olduğu belirtilmiştir (283). Geri dönüşümlü olarak aktive trombositler inflamatuvar yolakları tetikler (284). CD40L-CD40 sinyal yolağı prokoagülasyonu indükler ve plak rüptürünü ve trombozu hızlandırır (285). Hiperkolesterolemili insanlarda yapılan çalışmalarda, platelet aktivasyonunun arttığı ve trombosit membranına bağlı P-selektin ve CD40L (158) ekspresyonlarının arttığı belirtilmiştir. Hiperkolesterolemili hastalarda monosit CD40 ekspresyonunun arttığı belirtilmiş olmakla beraber, CD40 ekspresyonununun inceleyen bir çalışmaya literatürde rastlanamamıştır. Aynı şekilde, literatürde etanol veya resveratrol uygulanmasına bağlı in-vivo veya in-vitro trombosit CD40 ve CD40L ekspresyonu düzeyi ile ilgili bir çalışmaya rastlanamamıştır. Biz bu çalışmada, kontrol ratlarına kıyasla etanol ve kolesterol verilen sıçanların trombositlerinde CD40 ekspresyonunun yüksek olduğunu gözlemledik. Trombosit CD40-CD40L ekspresyonunu gösteren başka bir çalışmaya rastlanamadığı için, bulgularımızı başka çalışmalarla kıyaslayamadık. Alkol ve kolesterol verilen gruplarda trombosit aktivasyonunun arttığını ve bunun CD40-CD40L sinyal yolakları üzerinden olabileceği söylenebilir.

P-selektin (CD62p) istirahat halindeki trombositlerin alfa-granüllerinde depo edilir ve çeşitli stimulatorlerin varlığında hızlı bir biçimde plazma membranına transloke olur. Trombosit CD62p molekülü, trombosit adhezyon, agregasyon ve trombosit nötrofil etkileşiminden sorumludur ve bu nedenle miyokart enfarktüsünde önemli rol oynar (286). Kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman, intraperitoneal etanol verilen sıçanlarda CD62p ekspresyonu hem yüzde hem MFI olarak artış göstermiştir. Serebruany ve arkadaşları (287) orta derecede alkol kullanan yetişkin bireylerde CD62p ekspresyonunun azaldığını belirtirken, Y.Chen ve arkadaşları (288)

C57BL/6N farelerine 2 hafta etanol vermiş ve trombosit CD62p ekspresyonunun arttığını bulmuşlardır. Çalışmamızda, resveratrol verilen grupta CD62p ekspresyonunun hem kontrol hem de alkol grubuna göre azaldığını bulduk. Literatürde resveratrol uygulanan ve trombosit CD62p ekspresyonunu ölçen başka bir çalışmaya rastlayamadık. Bizim bulgumuza göre, resveratrolün trombosit aktivasyonunu CD62p yolağı üzerinden inhibe etmiş olabileceği söylenebilir. Hiperkolesterolemide hem trombosit hem endotel hücrelerinde bulunan P-selektin ekspresyonu arttığı bildirilmiştir (289). Biz bu çalışmada, kolesterollü yemle beslenen sıçanlarda CD62p ekspresyonunun hem yüzde hem de MFI olarak arttığını gözlemledik. Literatür taramasında sıçanlarla yapılan benzer bir çalışmaya rastlamamış olmakla beraber, insan (290) ve fare (289) ile yapılmış olan çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda, artan hiperkolesterolemiye bağlı olarak trombosit CD62p ekspresyonunun arttığı belirtilmiştir. Trombosit CD62p ekspresyonunun artış mekanizmaları bilinmemekle birlikte CD62p düzeyinin arttığı görülmüştür. Plazmada trombosit aktive edici agonistlerin miktarının artışı, kollajene bağlı kontak aktivasyon ve reaktif oksijen türleri (ROS) miktarının artması, trombosit aktivasyonundaki artışı açıklayan mekanizmalar arasında sayılabilir (289). Kolesterolle beslenen sıçanlara resveratrol verildiğinde trombosit CD62p ekspresyonunun kontrol ve resveratrol grubunda bulunan sıçanlara göre arttığı görülürken, sadece kolesterolle beslenen grubuna göre CD62p aracılıklı trombosit aktivasyonunun azaldığı görüldü. Literatürde resveratrol verilen hiperkolesterolemik insan veya deney hayvanlarında trombosit CD62p ekspresyonu ölçülen çalışmaya rastlanamamıştır. Hiperkolesterolemik ve alkol verilen hayvanlardaki artmış oksidan stresin tetiklediği trombosit aktivasyonunu, resveratrolün azalttığını düşünmekteyiz. Bu hipotezi desteklemek için flow sitometrisinde trombosit ROS düzeyi incelenmiştir. Sonuçta, etanol ve kolesterol verilen sıçan gruplarında trombosit ROS düzeylerinin arttığı görülmüştür. Literatürde çalışmamızla kıyaslayabileceğimiz etanol maruziyeti, hiperkolesterolemi veya resveratrol tedavisine bağlı trombosit ROS düzeyinin ölçüldüğü başka bir çalışmaya rastlanamamıştır. Tüm gruplarda yapılan korelasyon analizi sonucunda, trombosit ROS düzeyi ile CD40, CD40L ve CD62p ekspresyonları arasında pozitif korelasyon görülmüştür. Bu nedenle, bulgularımız doğrultusunda alkol ve kolesterolün trombositlerdeki ROS miktarını arttırdığını ve CD40-CD40L ve CD62p yolaklarını etkileyerek trombosit aktivasyonunu tetiklediğini düşünmekteyiz.

Dolaşımda solubl formda bulunan CD40 (sCD40), membrana bağlı bulunan CD40 (mCD40) formundan köken alır. sCD40 fizyolojik şartlarda oluşabilen fonksiyonel bir mCD40/CD40L interaksiyon antagonistidir (291). Her ne kadar sCD40 üretim mekanizması ve immun cevaptaki konsantrasyonları bilinmiyorsa da, bir çok hastalıkta önemli bir markır olacağı belirtilmektedir (292). Bu çalışmada etanol, resveratrol, kolesterol ve kolesterol+resveratrol verilen sıçanların plazma sCD40 düzeyinin kontrollere göre daha yüksek olduğunu bulduk. Literatürde etanol, resveratrol ve kolesterol+resveratrol uygulanmasının sCD40 üzerine etkisini ölçen ve sonuçlarımızla kıyaslayabileceğimiz in-vivo veya in-vitro çalışmaya ulaşamadık. Hiperkolesterolemili hastalarda plazma sCD40 düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (293). Tüm gruplarda yapılan korelasyon analizi sonucu, bize plazma sCD40 ile trombosit CD40 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir. Bu

nedenle, plazmada sCD40 artışının nedeni trombositlerdeki mCD40 kaynaklı olabilir.

Proinflamatuvar bir sitokin olan interlökin-6 (IL-6) inflamatuvar cevaba aracılık eder ve kardiyovasküler hastalıklarla birlikte plazma kolesterol ve lipoprotein düzeylerindeki değişikliklerden sorumludur (294). Bunlara ilaveten, IL-6, akut faz cevapta düzenleyici olan primer sitokindir ve diğer endotelial ve koagülan faktörleri etkiler, lipit ve lipoprotein metabolizmasında değişiklikler meydana getirerek pro-aterojenik değişiklikleri indükler (295). Bu çalışmada, kolesterolü yemle beslenen ve kolesterol+resveratrol uygulanan ratlarda K, A ve R gruplarına göre plazma IL-6 düzeyinin arttığını gözledik. Literatür taramasında çalışmamıza benzer sıçan gruplarında plazma IL-6 düzeyi ölçümü ile ilgili bir çalışmaya rastlayamadık. Hiperkolesterolemik insan (296) ve tavşan (297) plazmasında IL-6 düzeyinin kontrollere göre arttığını bildiren çalışmalar vardır. IL-6 düzeyindeki bu artış hiperkolesterolemiye bağlı olarak görülen non-fizyolojik olaylar karşısında IL-6'nın düzenleyici olarak görev yapıyor olması olabilir. Resveratrol uygulanması hiperkolesterolemiyi azalttığı için, IL-6 düzeyleri Kol+R grubunda daha düşük bulunmuş olabilir.

Platelet faktör 4 (PF4) trombosit alfa granüllerinde bulunan bir proteindir. C-X-C kemokin ailesine ait bir kemokindir ve fizyolojik fonksiyonu henüz bilinmemektedir. İlk yıllarda PF4'ün olası trombosit fonksiyonlarını prokoagülasyon yönünde çalışmalar olsa da, son yıllardaki çalışmalar angiogenesis ve hematopoiesis inhibisyonun, nötrophil adhezyonunun ve aktivasyonunun artması, oxLDL'nin LDL reseptörüne bağlanması ve antikoagülan bir protein olan aktive protein C'nin stimülasyonu yönündedir. Bu çalışmada A, R, Kol ve Kol+R gruplarının PF4 düzeyinin kontrollere göre arttığını bulduk. Literatürde benzer bir sıçan çalışması yoktur. Etanol veya resveratrol uygulanmasına bağlı PF4 değişikliğini inceleyen in vivo veya in-vitro bir çalışmaya da rastlanmadığı için, herhangi bir kıyaslama yapamadık. Qureshi AA ve arkadaşları (298) kalıtsal hiperlipidemisi olan domuzlarda PF4 düzeyinin düştüğünü bulmuşlardır ve PF4 ün trombosit aktivasyonuna karşı koruyucu olduğunu belirtmişlerdir. Bizim bulgularımız, plazmadaki PF4 düzeyinin kan kolesterolünün artışına bağlı olarak artabileceği yönündedir.

Hiperkolesterolemiye genellikle oxLDL eşlik eder. Antioksidan bir lipoprotein olan HDL, oxLDL oluşumunu azaltır. Bu etkisi HDL üzerinde bulunan ve antioksidan bir enzim olan paraoksonaz-1 (PON1) aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Oksidasyon ile ortaya çıkan süperoksit radikallerin, damar endoteliumunda birikerek makrofajlardan köpük hücre oluşumuna ve aterosklerotik plak şekillenmesine neden olduğu bildirilmektedir (299). Bu çalışmada, % 5 oranında kolesterol verilen gruplarda deneysel hiperkolesterolemi geliştirildi. Kol +R grubunda ise plazmadaki lipit değerlerinin önemli düzeyde düştüğü görülmüştür. Penumathsa SV ve arkadaşları (299) hipokolesterolemik ratlarda resveratrolün tek başına veya statinle beraber kolesterolü düşürdüğünü belirtmişlerdir. Resveratrolün kolesterol düşürücü etki mekanizması henüz bilinmemektedir. Kolesterolle 8 hafta beslenen sıçanların karaciğer kolesterolünün 10 kata kadar arttığı bildirilmiştir (299).

Çoklu doymamış yağ asitlerinin düzeyindeki artışa bağlı olarak karaciğer dokusunda lipid peroksidasyonu artmaktadır. Lipid peroksidasyonun oluşumu, reaktif oksijen türlerinin (ROS) aerobik metabolizma sırasında üretimi ile gerçekleşir. ROS antioksidan sistem tarafından zamanında uzaklaştırılmazsa, hücreler makromoleküllerin harabiyeti ve anormal fonksiyonlara sebep olan oksidatif stresle karşı karşıya kalırlar. PON1, LDL oksidasyonunu engeller ve hiperkolesterolemik fare modellerinde PON1 aktivitesi ile LDL oksidasyonu arasında negatif bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, oxLDL yüksek olduğu durumlarda PON1 aktivitesi düşer. Bu nedenle oxLDL ve HDL birbirinin antagonistidir. Bu çalışmada, hiperkolesterolemiye bağlı olarak serum TK, LDL ve oxLDL düzeyleri kolesterolle beslenen sıçanlarda yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar, literatürdeki benzer hiperkolesterolemik sıçan modellerinin bulgularını desteklemektedir (300). Resveratrol uygulanmasına bağlı olarak PON1 aktivitesi kontrol sıçanlarına göre azalırken, kolesterolle beslenen sıçanlara resveratrol uygulanması PON1 aktivitesini daha da düşürmüştür. Bunlara ilaveten, resveratrol uygulanan sıçanlarda oxLDL düşerken kolesterol verilen sıçanlara resveratrol verildiğinde oxLDL düzeyi Kol grubuna göre azalmış ve HDL-K düzeyi artmıştır. Hiperkolesterolemik insan veya hayvanlarda resveratrolün lipidler veya oxLDL üzerine etkisini bildiren bir çalışmaya rastlanamamıştır. Resveratrol etkisiyle PON-1 gen ekspresyonunun ve aktivitesinin arttığı belirtilmiş olmakla birlikte, bizim çalışmamız bu bulguyu desteklememektedir. Bunun nedeni, resveratrol çözücüsü olarak kullanılan etanol olabilir. Etanol uygulanan sıçanlarda PON1 aktivitesinin ve HDL-K düzeyinin azaldığı ve LDL-K ve oxLDL'nin arttığını gözlemledik. Son yıllarda yapılan araştırmalar, kolesterol yönünden zengin diyetlerin LDL oksidasyonunu ve trombosit aktivasyonunu arttırdığı saptanmıştır (280). Rao Mn ve arkadaşları (301) yüksek miktarda alkol kullanımının PON1 aktivitesini düşürdüğü ve oxLDL düzeyini arttırdığı bildirilmektedir. Bizim bulgularımız sıçanlardan elde edilmiş olmasına rağmen, insan bulgusuna dayanan bu bulguyu desteklemektedir.

Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu hücrel stres ateroskleroz sebeplerinden biridir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), hücrelerdeki başlıca ROS'tur (302). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, H_2O_2 'nin rejeneratif hücrelerin replikatif kapasitesi, apoptoz ve gen ekspresyonu için gerekli bir sinyal olduğu belirtilmiştir (303). Kontrol grubuna kıyasla A, R, Kol ve Kol+R gruplarının serum H_2O_2 düzeyleri daha yüksektir. Literatür taraması sırasında resveratrol uygulanan insan veya deney hayvanında serum H_2O_2 düzeyini ölçen bir çalışmaya rastlanamamıştır. Resveratrolün H_2O_2 düzeyini artırıcı etkisi etnaole bağlı olabilir. Resveratrol alkol içinde çözülerek verilmiştir ve alkol grubunda H_2O_2 düzeyinin arttığını bulduk. Bunun yanı sıra, R grubunun karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde artış, katalaz (KAT) aktivitesinde azalma gördük. SOD etkisiyle artan H_2O_2 , KAT aktivitesi azaldığı için birikmiş olabilir. Sonuç olarak, resveratrol alkolün arttırdığı H_2O_2 düzeyini arttırmış olmakla birlikte kontrol seviyesine düşürememiştir. Literatürde H_2O_2 düzeyinin ölçüldüğü hiperkolesterolemik rat çalışmasına rastlanamamıştır. Hiperkolesterolemiye bağlı olarak ortamda arttığı belirtilen ROS'lardan biri olan H_2O_2 miktarı oksidan hasarın artmasına bağlı olarak artmış olabilir. Diğer yandan, Kol grubu sıçan karaciğerlerinde GSH-Px ve KAT aktivitesinde azalma görülmüştür. GSH-Px ve KAT, H_2O_2 yi suya dönüştüren enzimlerdir ve aktivitesindeki almaya bağlı olarak serum H_2O_2 düzeyinin arttığı

düşünülmektedir. Kolesterol+R grubu sıçanların H₂O₂ düzeyleri R grubundan daha yüksek ve Kol grubundan daha düşük olduğu gözlenmiştir. Literatürde çalışmamızı kıyaslayacağımız bir çalışmaya rastlanamamıştır. Her ne kadar resveratrol kolesterolün H₂O₂ düzeylerini arttırıcı etkisini azaltmışsa da R grubu düzeyine kadar düşürememiştir.

Lizofosfatidik asit (LPA), ateroskleroz patogeneğinde aktivite gösteren bir fosfolipiddir (172) ve oxLDL'nin yapısında bulunmaktadır. Trombosit, monosit, makrofaj ve endotel hücreleri aktive eder ve düz kas hücrelerinin proliferasyonuna ve farklılaşmasına neden olur (15, 304). Bu çalışmada, Kol ve Kol+R grubu sıçan serumlarında LPA düzeylerinin kontrollere göre daha yüksek olduğu görülürken Kol+R grubunun LPA düzeyi Kol grubundan daha düşük bulunmuştur. Tokomura ve arkadaşları (172), %1 kolesterolle besledikleri tavşanlarda yüksek LPA konsantrasyonları saptamışlardır. Her ne kadar bizim çalışmamız sıçanlarda yapılmış olsa da, Tokomura ve arkadaşlarının çalışmasını desteklemektedir. Lizofosfatidik asit, oxLDL'nin yapısında bulunmaktadır ve Kol ve Kol+R gruplarında LPA ve oxLDL düzeyleri arasında pozitif korelasyon mevcuttur. Serumda artan LPA miktarı oxLDL artışına bağlı olabilir. Hiperkolesterolemik sıçanlara resveratrol uygulanması oxLDL miktarını düşürürken, LPA düzeyinde de azalmaya neden olduğu görülmüştür. Kolesterol+R grubu sıçan serum LPA'larındaki bu azalmanın, hem LDL hem de oxLDL miktarındaki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir.

Reaktif oksijen türlerindeki artış, antioksidan savunma sistemini ve detoksifikasyon mekanizmalarını harekete geçirir. Böylece antioksidan enzim aktivitelerinde azalma veya artma şeklinde değişiklikler meydana gelebilir. Serbest radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldıracak bazı enzimler bulunmaktadır. Bunların en önemlileri, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G-6-PD), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (158), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon-S-transferazdır (305).

G-6-PD, hücrel detoksifikasyon için kilit bir enzimdir (306). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre, G-6-PD aktivitesi A ve Kol gruplarında artarken, Kol+R grubunda azalmıştır. A ve Kol gruplarındaki artış ROS üretiminin artışına bağlı G-6-PD aktivitesini indüklemesinden kaynaklanabilir. Çünkü, ROS, G-6-PD aktivitesini indükleyerek hücrel homeostazı sağlamakta ve hücrel GSH düzeylerini arttırmaktadırlar. Bunun yanı sıra, hiperkolesterolemiye bağlı oluşan GSSG düzeyinde meydana gelen artışı engellemek için, G-6-PD enzim aktivitesinde artma meydana gelmiş olabilir (307).

Süperoksit dismutaz (SOD), süperoksit anyon radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (308). Kontrollere göre, resveratrol grubunun SOD aktivitesi artarken, Kol+R grubundaki sıçanların SOD aktivitesi azalmıştır. Literatürde resveratrolün karaciğer SOD aktivitesindeki değişiklikler bildirilmemiştir. Bu nedenle bir kıyaslama yapamamaktayız. Resveratrol, enzimin aktif merkezini etkileyerek aktiviteyi arttırıyor olabilir. Oksidan stres SOD aktivitesini azaltmaktadır. Her ne kadar hiperkolesterolemiye oksidan stresin eşlik ettiği düşünülse de, kolesterolle beslenmenin karaciğer SOD aktivitesini arttırdığını bildiren araştırmalar da vardır (309). Bu çalışmada, Kol+R grubunda bulunan

sıçanların serum hidrojen peroksit düzeylerini kontrol grubuna göre yüksek bulduk. Kol ve Kol+R grubunda bulunan sıçanların SOD aktivitesinde meydana gelen azalma, ortamda aşırı miktarda oluşan hidrojen peroksitin Cu, Zn-SOD aktivitesini inhibe etmesinden kaynaklanabilir (310).

Katalaz (KAT), hidrojen peroksidin suya indirgenmesini sağlayan bir enzimdir (311). Bizim çalışmamızda A, R ve Kol grubunda bulunan sıçanların karaciğer KAT aktivitesi kontrol gruplarına göre önemli derecede azalmıştır. Bu grupların KAT aktivitesinin azalması, bu enzimin substratı olan H_2O_2 konsantrasyonunun artmasından dolayı oluşan substrat inhibisyonundan kaynaklanabilir. Çünkü, A, R ve Kol gruplarında serum H_2O_2 düzeyleri artarken, H_2O_2 oluşumunu sağlayan SOD aktivitesi Kol+R grubunda azalmıştır. Kol+R grubundaki KAT aktivitesinin Kol grubuna kıyasla artış göstermesinin nedeni, yüksek konsantrasyonlarda oluşan H_2O_2 'in ortamdan uzaklaştırılmaya çalışılıyor olması olabilir (312). Kol gruplarındaki KAT aktivitelerindeki azalmanın nedeni ortamda artan H_2O_2 nedeniyle enzim substrat inhibisyonuna uğraması olabilir (311). Literatürde hiperkolesteroleminin KAT aktivitesini düşürdüğü belirtilmiş olmakla birlikte, etanol veya resveratrol uygulanmasının karaciğer KAT aktivitesine etkisini inceleyen ve bulgularımızı kıyaslayabileceğimiz bir çalışmaya rastlayamadık. Hiperkolesterolemi ile artan ROS ürünleri KAT aktivitesi azaltmış olabilir.

GSH-Px, hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitleri suya ve alkollere indirgemekte ve hidrojen peroksidin düşük konsantrasyonlarında aktivite kazanmaktadır (313). Alkol grubu sıçanların GSH-Px aktivitesinde azalma meydana gelmiştir. Bu grupta GSH-Px aktivitesinin düşük olmasının nedeni, bu enzimin substratı olan GSH konsantrasyonunun düşük olmasından veya konsantrasyonu artan GSSG'nin (314) GSH-Px aktivitesini inhibe etmesinden kaynaklanabilir. Yüksek hidrojen peroksit konsantrasyonlarına sahip A, Kol ve Kol+R gruplarında GSH-Px aktivitesinde azalma meydana geldiği sonucu ile bizim bulgularımız birbirini desteklemektedir (315). A, R ve Kol gruplarında, yüksek miktarda üretilmiş olan hidrojen peroksit KAT aktiviteleri düşük olduğu için tamamen uzaklaştırılamamıştır. Alkol verilmesi nedeniyle GSH-Px aktivitesinin de düştüğü görülürken, resveratrol verilmesi GSH-Px aktivitesini kontrol düzeyine getirebilmiştir. Kolesterol verilmesi hem KAT hem de GSH-Px aktivitelerini azaltarak, ortamda hidrojen peroksit miktarının artmasına neden olmuştur. Kolesterolle beslenen sıçanlara resveratrol verilmesi GSH-Px aktivitesini artırırken, oksidan stresin etkisini azalmaya çalışmaktadır. Kol grubunda GSH-Px aktivitesindeki azalmanın nedeni oksidan stresin artması ve GSH-Px enziminin bir diğer substratı olan organik hidroperoksitlerin artması nedeniyle inhibe olmasına bağlı olabilir (316).

Hücrel detoksifikasyon sisteminin major bir komponenti olan GST, bir çok reaktif bileşiğin biotransformasyonunda rol oynar (317). Resveratrol ve kolesterol grubu sıçanların karaciğer GST aktivitesinde artış gözlenmiştir. Yen ve arkadaşları (318) insan lenfositlerinde, GST aktivitesinin resveratrolün etkisiyle arttığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamız sıçan karaciğer dokusunda yapılmış olmasına rağmen, Yen ve arkadaşlarının çalışmasını desteklemektedir. Kolesterolle beslenme sonucu GST aktivitesi kontrol grubuna göre artarken, Kol+R grubunun

GST aktivitesi Kol grubuna göre daha düşüktür. Kolesterol grubunun GSH-Px aktivitesinde meydana gelen azalmanın, GST'nin aktivitesini artırarak GSH-Px gibi davranmasından kaynaklanabileceğini söylemek mümkündür. Çünkü son yıllarda yapılan çalışmalarda, GST selenyuma bağımlı olmayan GSH-Px gibi tanımlanmış ve GSH-Px'in aktivitesinin yetersiz olduğu durumlarda GSH-Px gibi aktivite gösterdiği belirtilmiştir (317). Kol+R grubunun GST aktivitesi ve kontrol grubu GST aktivitesi arasında anlamlı bir fark yoktur. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre, kolesterol etkisiyle artan GST aktivitesinin, resveratrol etkisiyle tekrar bazal düzeye getirildiği söylenebilir.

GSH, protein tiyollerin indirgenmiş şeklinin sağlanmasını destekleyerek doğrudan bir antioksidan etki gösterir (319). GSH, organizmada en çok bulunan antioksidanlardan birisidir. Organik hidroperoksitler hücre içi GSH'ın okside forma dönüşmesi ile zararsız hale gelirler (241). Bu çalışmanın sonuçlarına göre, 20 gün süreyle ip etanol ve resveratrol verilmesi sonucunda, kontrol gruplarına göre GSH düzeylerinde önemli derecede azalma meydana gelmiştir. GSH düzeyindeki azalma GSH ile ilişkili olan GSH-Px ve GR enzim aktiviteleriyle ilgili olabilir. Çünkü, GSH bu enzimlerin substratıdır. Alkol verilmesi GSH-Px ve GR aktivitelerini düşürürken, alkol içinde verilen resveratrol, alkolün etkisiyle azalan GSH-Px düzeyini kontrol seviyesine yükseltirken GR aktivitesini kontrol düzeyinin de üzerine çıkararak, alkol nedeniyle azalan GSH düzeyini arttırmış ama kontrol seviyesine getirememiştir. Kolesterolle beslenen sıçan grubunda GSH miktarı kontrollere göre artarken, kolesteolle beslenen sıçanlara resveratrol verilmesi GSH düzeyini kontrol grubunun da altına düşürmüştür. Kolesterol grubunda GR aktivitesinin en yüksek olduğunu bulduk. Yüksek miktarda oluşan GSSG, artmış GR aktivitesi ile GSH düzeyinde artışa neden olmuş olabilir. Bulgularımız kolesterolle beslenen sıçan karaciğerinde ortamdaki ROS miktarındaki artışa paralel olarak, detoksifikasyon için gerekli olan GSH biyosentezinin arttığını ve degradasyonunun azaldığını göstermektedir. Diğer yandan, Kol+R grubunda GSH düzeyleri, kontrol GSH düzeyine oldukça yakındır. Kol+R grubundaki GSH düzeylerinin azalmasının nedeni, hiperkolesterolemi sırasında karaciğerde meydana gelen ROS ürünlerinin detoksifikasyonu esnasında GST ve GSH-Px enzimlerinin substrat olarak GSH'ı kullanmasıdır (320). Resveratrol etkisiyle, kolesterolle beslenen ratlarda ROS düzeyleri düştüğü için GSH'e duyulan ihtiyaç da azalmaktadır.

GSSG, GSH-Px enziminin hidrojen vericisi olan GSH'ı kullanarak hidroperoksitleri indirgenmesiyle meydana gelmektedir (321). Yirmi gün süreyle IP etanol veya resveratrol verilmesi sonucunda GSSG düzeyi artmıştır. Kolesterolle beslenme sonucunda artan GSH a paralel olarak GSSG düzeyleri de artarken, kolesterollü yemle beslenmenin ardından 20 gün ip resveratrol verilmesi sonucunda GSSG düzeyinin Kol grubuna göre azaldığı görülmüştür. Genel olarak GSSG düzeyleri değerlendirildiğinde, GSSG miktarında artış görülen A ve R gruplarında, GSH düzeylerinin azaldığı dikkati çekmektedir. Bu bulgu, GSH sentezinin ilk basamağında görev alan γ -glutamil-sistein sentetazın GSSG tarafından inhibe edilerek, GSH üretimini engellediğini (322) desteklemektedir. Özellikle kolesterolle beslenmenin GSSG düzeyini daha fazla etkilediği görülmektedir. Kolesterolle beslenme sonucu artan GSSG, GSSG'nin indirgenmesini sağlayan glutatyon

redüktazın aktivitesini arttırmış olabilir. Artan GR aktivitesi, NADPH'ın NADP'ye yükseltgenmesi ile ortamda artan konsantrasyonu NADP'nin tekrar NADPH'a dönüşümünü katalizleyen G-6-PD aktivitesi de artmıştır. Kolesterolle beslenme sonucu ortamda oluşan ROS düzeyini kompanse etmek için GSH ve dolayısıyla GSSG düzeyleri artmış olabilir.

GSH/GSSG oranı hücrel redoks potansiyelinin göstergesi olarak kullanılmaktadır (323). A, R ve Kol gruplarında kontrol grubuna göre GSH/GSSG oranında meydana gelen azalma, sıçanların antioksidan savunmalarının azalmış olduğunun göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Oksidan hasar sırasında GSSG düzeylerinde meydana gelen artma, GSH düzeyinde ve GR aktivitesinin artış ile kompanse olamamıştır ve GSH/ GSSG oranı düşmüştür (323). Artan GSSG konsantrasyonları fiziksel egzersizde, ileri yaşlarda, soğuk ve sıcaklığa maruz kalmada, diyabette, kardiyovasküler hastalıklarda, kanser ve kronik hastalıklarda görülmektedir (323).

A, R, Kol ve Kol+R gruplarının serum ve karaciğer TBARS düzeylerinde kontrollere göre artış meydana gelmiştir. Yani etanol ve resveratrol verilmesi ve kolesterolle beslenme, sıçan karaciğerlerinde lipid peroksidasyonunu arttırmıştır. Kasdallah-grissa ve arkadaşları (324) yaptıkları bir çalışmada %35'lik ip etanol uygulanan sıçanlarda reaktif oksijen türlerinin oluşumunun arttığını ve buna bağlı olarak karaciğer TBARS konsantrasyonunun arttığını, ardında 5 mg günlük resveratrol verilmesi sonucu, TBARS düzeyinin yeniden kontrol gruplarındaki TBARS düzeylerine düştüğünü göstermişlerdir. Bu araştırmacıların bulguları bizim bulgularımız ile kısmen uyumludur. Biz bu araştırmacılar farklı olarak, resveratrolü sıçanların yemlerine karıştırmadık. Sıçanlara resveratrolü ip olarak 20 mg/kg dozda 20 gün süreyle verdik. Diğer yandan, karaciğer TBARS düzeyinin artması resveratrolün lipid peroksidasyonunu kontrol grubuna kıyasla engellemediğini, aksine arttırdığını göstermektedir. Hiperkolesterolemiye bağlı karaciğer lipid peroksidasyonun arttığı rat deneylerinde gösterilmiştir (325). Hiperkolesterolemi, serbest oksijen radikallerinin artmasına ve elektron transport sisteminin bozulmasına neden olmaktadır. Serbest oksijen radikalleri, biyolojik membranlara hasar vermekte ve sonuçta hücrel hasara neden olmaktadırlar (7). Sonuç olarak, trombositlerin, polimorfonükleer hücrelerin, lökositlerin ve endotel hücrelerin membran yapıları etkileneceğinden, fizyolojik özellikleri de değişecektir.

Serbest radikal türleri, hücrel bileşenlere saldırarak lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın yapısını bozabilir ve organ hasarlarına neden olarak çeşitli hastalıklara zemin hazırlayabilirler (326). Canlı organizmalar ROS ile mücadele için bir çok kompleks antioksidan defans sistemi geliştirmişlerdir. Bu antioksidan sistem içerisinde SOD, KAT, GPx gibi enzimler, albumin, seruloplazmin ve ferritin gibi makromoleküller, askorbik asit, α -takoferol, β -karoten, GSH ve bilirubin gibi küçük moleküller vardır. Endojen kaynaklı ve besinlerle alınan antioksidanlar, sistemin total antioksidan potansiyelini belirler. Farklı antioksidanlar arasındaki etkileşim, ROS veya nitrik oksit (NO) türlerine karşı korumada sağladıkları koopere etki, yalnız başlarına olan etkiden daha fazladır (327). Bu nedenle AOP ölçümü, bize vücut sıvılarındaki veya dokudaki kümülatif antioksidan kapasite hakkında bilgi verir ve

tek ölçüme oranla daha anlamlı biyolojik yanıt alınabileceği gösterilmiştir (328, 329). Bu çalışmada deney gruplarının karaciğer dokularının AOP düzeyleri karşılaştırıldığında, A, Kol ve Kol+R gruplarının AOP düzeyleri kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. Literatürde AOP ölçümü yapan yayın sayısı azdır. Farklı bitki ekstraktlarının ve diabet, kanser gibi çeşitli hastalıklardaki AOP düzeylerine ait sonuçlar mevcut olmakla birlikte, kolesterolün etanolün ve resveratrolün AOP düzeyine etkisini inceleyen ve çalışmamızla kıyaslayacağımız bir bulguya rastlayamadık. Bizim bulgularımıza göre, etanol verilmesine bağlı olarak sıçan karaciğerinde AOP seviyeleri düşmüştür. Etanolde çözülerek verilen resveratrol AOP düzeyini arttırmıştır. Bunun yanı sıra, kolesterolü diyet karaciğer dokusunun AOP düzeyini kontrole göre 2.5 kat (% 58.3) düşürürken, resveratrol etkisiyle AOP düzeyi Kol+R grubunda yükselmiştir. Total antioksidan kapasitesinin bir göstergesi olan AOP göz önüne alındığında, kolesterolü diyetin karaciğerde oksidan hasara yatkınlık sağladığını, resveratrolün ise antioksidan özelliğinden dolayı AOP'yi arttırabileceğini söylemek mümkündür.

Protein yapısında bulunan prolil, lizil, arjinil ve treonil yan zincirlerinin oksidasyonu/ peptid bağlarının oksidatif yıkımı ya da sisteinil, histidil, lizil nükleofilik yan zincirlerinin, lipid ya da karbonhidratlardan türeyen prekürsörler (ile etkileşimi, protein karbonil (PK) gruplarını oluşturabilir. Oksidatif stresin erken aşamasında oluşan ve diğer stres parametrelerine göre, dolaşımında daha uzun süre ve sabit kalabilen PK, güvenilir bir marker olarak önerilmektedir. Bu çalışmada, sıçanlara verilen etanol, resveratrol ve kolesterolün etkisiyle karaciğer dokusunda PK düzeylerinin artmış olduğunu bulduk. Yalçinkaya S ve arkadaşları (330) içme suyuna kattıkları %20 lik etanol, rat karaciğer dokularındaki PK düzeyini arttığını belirtmişlerdir. Biz sıçanların etanolü aldığından emin olmak için ip enjeksiyonu tercih etmiş olsak da bulgularımız Yalçinkaya ve arkadaşlarının sonuçlarını desteklemektedir. Resveratrol uygulanan sıçanlara ait bir literatür bilgisine ulaşamamış olduğu için R grubuna ait bulgularımızı kıyaslayamadık. Kumar ve arkadaşları (331) hiperkolesterolemik sıçanlarda karaciğer PK düzeyinin artmış olduğunu belirtmişlerdir. Bizim bulgularımızı destekleyen bu çalışma da göstermektedir ki yüksek kolesterolü diyetle beslenen sıçanların karaciğerlerinde ROS türlerinin artışına bağlı olarak oksidan stres artmış ve antioksidan koruma yetersiz kalmıştır ve dolayısıyla da PK düzeylerinde artış görülmüştür. Literatür taraması sırasında resveratrolün, hiperkolesterolemik insan veya hayvan karaciğer dokusuna etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlayamadık.

NO, bir serbest radikaldir. Ayrıca, organizmada peroksinitrit anyonu ve hidroksil radikali gibi çok etkin radikallerin üretilmesine neden olur. Ancak, doğrudan doğruya NO ölçmek çok zor olduğundan, NO metabolitleri olan nitrit ve nitrat düzeyleri belirlenmektedir. Bu çalışmada A, R, Kol ve Kol+R gruplarının karaciğer dokusunda NO₂ ve NO₃ düzeylerinde artış olduğunu bulduk. Bu artışın kaynağı, iNOS stimülasyonuna bağlı olarak NO sentezindeki artış olabilir. Literatürde resveratrolün karaciğer dokusu NO₂ ve NO₃ düzeylerine etkisini içeren ve bulgularımızı kıyaslayabileceğimiz bir çalışmaya rastlayamadık. Kim JW ve arkadaşları (332) kolesterolle besledikleri sıçanların karaciğerlerinde ve karaciğer HepG2 hücrelerinin kolesterolle inkübasyonu sonucunda, iNOS'un indüklendiğini ve

NO üretiminin arttığını belirtmişlerdir. Kim ve arkadaşlarının bulguları bizim bulgularımızla uyumludur. Artan NO düzeyi, damarlardaki gevşemenin bozulmasına ve doku oksijenasyonunun artmasına neden olabilir (332). Kolesterolle yemle beslenen sıçanlara resveratrol verilmesi NO₂ ve NO₃ düzeylerini düşürmüş olsa da kontrol grubu düzeyine getirememiştir. Resveratrol, kolesterol ile beslenen grupta NO₂ düzeylerini düşürürken, dokulardaki NO₂ ve NO₃ kaynaklı oksidatif hasarın geri çevrilmesine de çalıştığını düşünmekteyiz.

Nitrotirozin (NT) oluşumu protein oksidasyonuna yol açan bir başka moleküler mekanizmadır. Peroksinitrit (ONOO⁻), nitrik oksidin (NO), O₂⁻ ile in vivo reaksiyonu sonucunda oluşan sitotoksik bir türevidir. ONOO⁻'in proteinler üzerine atağının ana ürünü tirozinin orto pozisyonundan nitrolanmasıdır. Bu nitrolama sonucu NT oluşur. Biz bu çalışmada, kontrol grubuna kıyasla Kol grubunda hem serum hem de karaciğer dokusunda NT düzeyinin artmış olduğunu saptadık. Buna ek olarak, serum ve doku NT düzeyleri Kol+R gruplarında, Kol gruplarına göre daha düşük bulunmuştur. Literatürde resveratrolün ve kolesterolün serum veya karaciğer NT düzeylerine etkisini inceleyen çalışmaya rastlanamamıştır. Serum ve karaciğer dokusunda ölçülen NT düzeyi, proteinlerle etkileşime girmiş olan peroksi nitritin bir göstergesidir. Kolesterolle beslenen hayvanların böbrek dokularında NT düzeyinin arttığı belirtilmiştir (333). Ortamdaki ROS düzeyinin ve nitrik oksit (NO) türevlerinin artmasına bağlı NT düzeyi hiperkolesterolemik ratlarda artmış olabilir.

Atheroskleroz derecesini göstermek amacıyla farklı metotlar belirtilmiştir. Bu çalışmada atheroskleroza bağlı intimal kalınlığın gösterilmesi amacıyla 3 temel ölçüm olan IMR, ITI ve %LD değerleri ölçülmüştür. Kontrollere kıyasla Kol grubunda artış IMR, ITI ve %LD değerlerinde bulunmuştur. Kol+R grubunun IMR, ITI ve %LD değerleri Kol grubundan düşüktür. Resveratrolün hiperkolesterolemik ratlardaki bu etkisini kıyaslayabileceğimiz bir rat deneyine literatürde rastlanamamıştır. Bunun yanısıra, yapmış olduğumuz kolesterol grubunda yaptığımız korelasyon analizi sonucunda, %LD ile P-selektin ekspresyonu ve PF4, NO₂ ve NO₃ arasında pozitif korelasyon saptadık. Resveratrolün, ateroskleroz gelişimi üzerine olan etkisi, trombosit aktivasyonunu azaltmasına bağlı olabilir.

SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Alkol ve resveratrol verilmesinin sıçanların yem tüketimlerini etkilemediği, kolesterolle beslenmenin sıçanların daha çok yem tüketmelerine yol açtığı görülmüştür
2. Kolesterolle beslenmenin su tüketimini arttırdığı bulunmuştur.
3. Sadece deney sonundaki ağırlıklar kıyaslandığında, kontrol, A ve R gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıkları arasında fark olmazken, kolesterolle beslenen grupların vücut ağırlıklarının arttığı bulunmuştur. Tüm deney gruplarındaki sıçanların deney süresinin bitiminde ağırlıkları artmıştır.
4. Kontrol ratlarına kıyasla alkol ve kolesterol verilen sıçanların trombositlerinde CD40 ekspresyonunun yüksek olduğu bulunmuştur. Alkol ve kolesterol verilen gruplarda trombosit aktivasyonunun arttığını ve bunun CD40-CD40L sinyal yolları üzerinden olduğu söylenebilir.
5. Resveratrol verilen grupta P-selektin (CD62p) ekspresyonunun, hem kontrol hem de alkol grubuna göre azaldığı görülmüştür. Kolesterollü yemle beslenen sıçanlarda CD62p ekspresyonunun, hem yüzde hem de MFI olarak arttığını bulduk. Kolesterolle beslenen sıçanlara resveratrol verildiğinde, trombosit CD62p ekspresyonunda kontrollere ve sadece resveratrol verilen sıçanlara göre artma görülürken, sadece kolesterolle beslenen sıçan trombositlerinin CD62p aracılıklı trombosit aktivasyonunda azalma görülmüştür.
6. A, Kol ve Kol+R gruplarının trombosit ROS düzeylerinde, kontrollere göre anlamlı derecede artma meydana gelmiştir. Kol ve Kol+R grubu karşılaştırıldığında, Kol+R grubunun ROS düzeyinin Kol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur.
7. Alkol, resveratrol, kolesterol ve kolesterol+resveratrol verilen sıçanların plazma sCD40 düzeyinin, kontrollere göre daha yüksek olduğunu belirledik. Tüm grupların korelasyon analizi sonucu bize plazma sCD40 ile trombosit CD40 ekspresyonu arasında pozitif korelasyon olduğunu göstermiştir.
8. Proinflamatuvar bir sitokin olan interlökin-6 (IL-6), kolesterollü yemle beslenen ve kolesterol+resveratrol verilen ratlarda K, A ve R gruplarına göre yüksek bulunmuştur. Resveratrol hem R hem de Kol+R grubunda IL-6 değerlerini düşürmüştür.
9. A, R, Kol ve Kol+R gruplarının PF4 düzeyinin kontrollere göre arttığını bulduk. Kol grubuna resveratrol verilmesi PF4 düzeyini yükseltmiştir.

10. Alkol serum PON1 aktivitesini düşürürken, resveratrol PON1 aktivitesini yükseltmiştir. Kolesterol PON1 aktivitesini kontrole göre düşürürken, kolesterol+resveratrol grubu sıçanların serum PON1 aktiviteleri yalnız kolesterol verilenlere göre daha düşüktür.
11. Alkol, resveratrol, kolesterol ve kolesterol+resveratrol gruplarının serum TK, LDL-K ve oxLDL düzeyleri kontrole kıyasla yüksek bulunmuştur. Resveratrol verilen sıçanlarda, alkol grubuna kıyasla TK düşerken, oxLDL düzeyleri artmıştır. Kolesterol + resveratrol verilmesi, yalnız kolesterol verilen sıçanlara göre TK, LDL-K ve oxLDL düzeylerini azaltmış ve HDL-K düzeyini arttırmıştır.
12. Sıçanlara alkol verilmesi HDL-K düzeyini düşürmüştür. Kolesterol grubuna kıyasla, kolesterol + resveratrol grubunda serum HDL-K düzeyi artmıştır.
13. Kontrollere kıyasla, alkol, resveratrol, kolesterol ve kolesterol + resveratrol verilmesi serum H₂O₂ düzeyini arttırmıştır. Kolesterol grubuna kıyasla, kolesterol + resveratrol verilen grubun serum H₂O₂ düzeyini azaltmıştır.
14. Kontrollere kıyasla, alkol ve kolesterol grubunun serum NT düzeyi artmıştır. Alkol grubuna kıyasla, resveratrol verilmesi serum NT düzeyini düşürmüştür. Kolesterol grubuna kıyasla, kolesterol + resveratrol grubunun serum NT düzeyi düşmüştür.
15. Kontrollere kıyasla, kolesterol ve kolesterol + resveratrol grubunun serum LPA düzeyi artmıştır. Kolesterol grubuna kıyasla, kolesterol + resveratrol verilen grubun serum LPA düzeyi düşmüştür.
16. Tüm deney gruplarının serum TBARS düzeyi artmıştır. Alkol grubuna kıyasla, resveratrol verilmesi serum TBARS düzeyini arttırmıştır. Kolesterol grubuna kıyasla, kolesterol + resveratrol grubunun serum TBARS düzeyi azalmıştır.
17. Karaciğer dokusunda, G-6-PD aktivitesi A ve Kol gruplarında kontrollere kıyasla artarken, Kol+R grubunda azalmıştır. G-6-PD aktivitesi, Kol+R grubunda Kol grubuna göre daha düşük bulunmuştur. G-6-PD aktivitesi en fazla Kol grubunda artmıştır.
18. Resveratrol verilmesi, karaciğer SOD aktivitesini kontrollere göre arttırırken, Kol+R grubundaki sıçanların SOD aktivitesi kontrollere ve kolesterol grubuna kıyasla azalmıştır.
19. A, R ve Kol gruplarında bulunan sıçanların karaciğer KAT aktivitesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Kol+R grubundaki sıçanların KAT aktivitesi, A, R ve kolesterol grubuna kıyasla artmıştır. KAT aktivitesindeki en fazla azalma resveratrol grubunda görülmüştür.

20. Alkol, kolesterol ve kolesterol + resveratrol gruplarının, karaciğer GSH-Px aktivitesinde kontrollere kıyasla azalma meydana gelmiştir. Sadece resveratrol verilmesi GSH-Px aktivitesini arttırırken, kolesterol ile beslenen sıçanlara resveratrol verilmesi GSH-Px aktivitesini arttırmıştır.
21. Kontrol grubuna kıyasla R, Kol ve Kol + R gruplarının GST aktivitesinde artış görülürken, alkol grubunda bulunan sıçanların GST aktivitesi düşmüştür. Kol+R grubunun GST aktivitesi, kontrol grubu GST aktivitesine göre artarken, R ve Kol grubu sıçanlarının GST aktivitesine göre azalmıştır. Kolesterol + resveratrol verilmesi GST aktivitesini, kolesterole kıyasla azaltmış ve tekrar bazal düzeye getirmiştir.
22. Kontrollere kıyasla, alkol, resveratrol ve kolesterol + resveratrol verilmesi GSH düzeyinde azalma meydana getirirken, sadece kolesterol verilmesi GSH düzeyini arttırmıştır. Kolesterol ile beslenen sıçanlara resveratrol verilmesi, kolesterol etkisiyle artan GSH düzeyini kontrol grubunun da altına düşürmüştür.
23. Alkol, resveratrol ve kolesterol verilmesi, GSSG düzeyini kontrollere kıyasla arttırmıştır. Kolesterol grubuna resveratrol verilmesi sonucunda GSSG düzeyinin Kol grubuna göre azaldığı görülmüştür.
24. Kontrol grubuna kıyasla, A, R ve Kol gruplarının GSH/GSSG oranında azalma meydana gelmiştir. Kol grubuna kıyasla Kol+R grubunda, GSH/GSSG oranının arttığı görülmüştür.
25. Kontrol grubuna kıyasla, A, Kol ve Kol+R gruplarının AOP düzeyleri düşük bulunmuştur. Bunun yanısıra, kolesterollü diyet, karaciğer dokusunun AOP düzeyini yaklaşık kontrole göre 2.5 kat (% 58.3) düşürürken kolesterol + resveratrol verilmesi, sadece kolesterol verilen gruba göre AOP düzeyini yükseltmiştir.
26. Kontrol grubuna kıyasla, alkol, resveratrol, kolesterol ve kolesterol + resveratrol gruplarının karaciğer PK düzeyi artmıştır. Resveratrol verilmesi, alkol grubuna göre PK düzeyini arttırmıştır. Kolesterol + resveratrol verilmesi, kolesterol verilen sıçanlara kıyasla PK düzeylerinde artışa neden olmuştur.
27. Kontrol grubuna kıyasla, Kol grubunda karaciğer NT düzeyi artarken, R ve Kol + R gruplarında azalmıştır. Karaciğer NT düzeyleri, Kol+R grubunda, Kol grubuna göre daha düşük bulunmuştur.
28. A, R, Kol ve Kol+R gruplarının karaciğer dokusunda NO₂ ve NO₃ düzeylerinde artış görülmüştür. Kolesterol ile beslenen sıçanlara resveratrol verilmesi, karaciğer NO₂ düzeylerini azaltsa da kontrol grubu sıçanlarının NO₂ düzeyine getirememiştir.

29. A, R, Kol ve Kol+R gruplarının karaciğer TBARS düzeylerinde kontrollere göre artış meydana gelmiştir. Resveratrol grubunun TBARS düzeyi A grubundan daha yüksektir. Kol+R grubunun TBARS düzeyi Kol grubundan daha düşük bulunmuştur. Lipid peroksidasyonu ürünü olan TBARS en fazla R grubunda bulunmuştur.

30. Ateroskleroz oluşumunun 3 temel ölçümü olan IMR, ITI ve %LD değerleri, kontrollere kıyasla Kol grubunda artış göstermiştir. Kol+R grubunun IMR, ITI ve %LD değerleri Kol grubundan daha düşüktür.

Sonuç olarak, bu araştırmada kullanılan resveratrol tedavisi trombosit aktivasyonunu, lipid düzeylerini ve antioksidan enzim aktivitelerini, GSH ve GSSG düzeylerini ve lipid peroksidasyonunun en önemli indikatörlerinden olan TBARS düzeylerini normal yemle ve kolesterolle karıştırılmış yemle beslenen sıçanlarda farklı yönlerde etkilemiştir. Resveratrol verilmesi, trombosit aktivasyonunun göstergesi olan CD40-CD40L ekspresyonunu hem kontrol hem de kolesterolle beslenen sıçanlarda azaltmıştır. Kolesterolle beslenen sıçanların serum total kolesterol, LDL-K, oxLDL düzeylerini düşürürken, lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu olan HDL-K düzeyini arttırmıştır. Kolesterolle beslenme genel anlamda karaciğerdeki antioksidan enzim aktivitelerini düşürürken bu gruba resveratrol verilmesi antioksidan savunmayı arttırmıştır. Bu çalışma, hiperkolesteroleminin trombosit aktivasyonuna neden olarak, trombositlerde CD40-CD40L ve P-selektin ekspresyonunu arttırdığını, bunun yanında, resveratrolün hiperkolesterolemik ratlarda trombosit CD40-CD40L ve P-selektin ekspresyonunu azalttığını göstermiştir. Hiperkolesterolemide trombosit aktivasyonunun neden arttığının ve resveratrolün trombosit aktivasyonunu hangi mekanizmayla azalttığının gelecek çalışmalarda daha detaylı incelenmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Resveratrolün bu etkilerinin kolesterol azaltıcı etkisinden mi, antioksidan özellikte olmasından mı kaynaklandığını anlamak için aynı model, kolesterol düşürücü veya antioksidan maddeler ile kıyaslanabilir.

KAYNAKLAR

1. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G: Oxidant stress and platelet activation in hypercholesterolemia. *Antioxid Redox Signal* 6:747-56, 2004.
2. Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J: Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs* 1:273-88, 2002.
3. Andre P, Prasad KS, Denis CV, He M, Papalia JM, Hynes RO, Phillips DR, Wagner DD: CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med* 8:247-52, 2002.
4. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA: CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391:591-4, 1998.
5. Inwald DP, McDowall A, Peters MJ, Callard RE, Klein NJ: CD40 is constitutively expressed on platelets and provides a novel mechanism for platelet activation. *Circ Res* 92:1041-8, 2003.
6. Schonbeck U, Libby P: The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 58:4-43, 2001.
7. Ando M, Katagiri K, Yamamoto S, Wakamatsu K, Kawahara I, Asanuma S, Usuda M, Sasaki K: Age-related effects of heat stress on protective enzymes for peroxides and microsomal monooxygenase in rat liver. *Environ Health Perspect* 105:726-33, 1997.
8. Deutsch VR, Olson TA, Nagler A, Slavin S, Levine RF, Eldor A: The response of cord blood megakaryocyte progenitors to IL-3, IL-6 and aplastic canine serum varies with gestational age. *Br J Haematol* 89:8-16, 1995.
9. Ferroni P, Basili S, Davi G: Platelet activation, inflammatory mediators and hypercholesterolemia. *Curr Vasc Pharmacol* 1:157-69, 2003.
10. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK: IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101:311-20, 1998.
11. Huang SS, Huang JS, Deuel TF: Proteoglycan carrier of human platelet factor 4. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 257:11546-50, 1982.
12. Carvalho AC, Colman RW, Lees RS: Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med* 290:434-8, 1974.

13. van Willigen G, Gorter G, Akkerman JW: LDLs increase the exposure of fibrinogen binding sites on platelets and secretion of dense granules. *Arterioscler Thromb* 14:41-6, 1994.
14. Dardik R, Varon D, Tamarin I, Zivelin A, Salomon O, Shenkman B, Savion N: Homocysteine and oxidized low density lipoprotein enhanced platelet adhesion to endothelial cells under flow conditions: distinct mechanisms of thrombogenic modulation. *Thromb Haemost* 83:338-44, 2000.
15. Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, Bittman R, Tigyi G, Aepfelbacher M: Lysophosphatidic acid mediates the rapid activation of platelets and endothelial cells by mildly oxidized low density lipoprotein and accumulates in human atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6931-6, 1999.
16. Lebedinsky AS, Cherkashina DV, Sukach AN, Volkova NA, Fuller BJ, Petrenko AY: Positive effects of cryopreserved adult or fetal liver cell transplants on hypercholesterolemia and hepatic antioxidant defenses in cholesterol-fed rabbits. *Cryobiology* 55:72-9, 2007.
17. Al Kanhal MA, Ahmad F, Al Othman AA, Arif Z, Al Orf S, Al Murshed KS: Effect of pure and oxidized cholesterol-rich diets on some biochemical parameters in rats. *Int J Food Sci Nutr* 53:381-8, 2002.
18. Kollar P, Kotolova H, Necas J, Karpisek M, Bartosikova L, Karesova P: [Experimental study of resveratrol and flavonoids in red wine with regard to their possible hypolipemic effects]. *Vnitr Lek* 46:856-60, 2000.
19. Sternby NH, Nordet P, Fernandez Britto J: World Health Organization (WHO) and the World Heart Federation (WHF) Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study (WHO/WHF PBDAY Study) 1986-1996. An overview and general considerations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 9:168-74, 1999.
20. Sarzynska-Dlugosz I, Nowaczenko M: [Common carotid artery intima-media thickness: the role in evaluation of atherosclerosis progression]. *Neurol Neurochir Pol* 35:1093-102, 2001.
21. Amarenco P, Labreuche J, Touboul PJ: High-density lipoprotein-cholesterol and risk of stroke and carotid atherosclerosis: a systematic review. *Atherosclerosis* 196:489-96, 2008.
22. de Groot E, van Leuven SI, Duivenvoorden R, Meuwese MC, Akdim F, Bots ML, Kastelein JJ: Measurement of carotid intima-media thickness to assess progression and regression of atherosclerosis. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 5:280-8, 2008.

23. Fernandez-Miranda C: [New perspectives in the measurement of cardiovascular risk: explorations to detect subclinical atherosclerosis and inflammation markers]. *Med Clin (Barc)* 128:344-51, 2007.
24. Mackey RH, Venkitachalam L, Sutton-Tyrrell K: Calcifications, arterial stiffness and atherosclerosis. *Adv Cardiol* 44:234-44, 2007.
25. Bauer M, Mohlenkamp S, Erbel R: [Intima-media thickness as a surrogate for subclinical atherosclerosis]. *Herz* 32:372-8, 2007.
26. Depairon M, Hayoz D, Darioli R: [Early detection of atherosclerosis]. *Rev Med Suisse* 2:330-2, 335-6, 2006.
27. von Baeyer H, Hopfenmuller W, Riedel E, Affeld K: Atherosclerosis: current concepts of pathophysiology and pharmacological intervention based on trial outcomes. *Clin Nephrol* 60 Suppl 1:S31-48, 2003.
28. Reiner Z, Tedeschi-Reiner E: [New information on the pathophysiology of atherosclerosis]. *Lijec Vjesn* 123:26-31, 2001.
29. Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM: Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur Cytokine Netw* 9:697-8, 1998.
30. Mitchell ME, Sidawy AN: The pathophysiology of atherosclerosis. *Semin Vasc Surg* 11:134-41, 1998.
31. Chobanian AV: Pathophysiology of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 70:3G-7G, 1992.
32. Stone PH: Evaluating cardiovascular pathophysiology and anatomy in atherosclerosis. *Am Heart Hosp J* 3:187-92, 2005.
33. Saini HK, Xu YJ, Arneja AS, Tappia PS, Dhalla NS: Pharmacological basis of different targets for the treatment of atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 9:818-39, 2005.
34. Croce K, Libby P: Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol* 14:55-61, 2007.
35. Di Virgilio F, Solini A: P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br J Pharmacol* 135:831-42, 2002.
36. Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL: CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 75:468-77, 2007.
37. Weber C: Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 96:612-6, 2005.

38. Ross R: Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-26, 1999.
39. Farstad M: The role of blood platelets in coronary atherosclerosis and thrombosis. *Scand J Clin Lab Invest* 58:1-10, 1998.
40. Maupin B: [Recent contributions to histochemistry and biochemistry of blood platelets in man.]. *Rev Hematol* 8:302-15, 1953.
41. Inceman S, Tangun Y: Essential athrombia: study of a new case. *Thromb Diath Haemorrh* 33:278-85, 1975.
42. Ulutin ON, Yaramanci TE, Ulutin SB: The release mechanism of platelets in normals and in pathological conditions from coagulation and ultrastructural standpoint. *Acta Univ Carol Med Monogr* 53:95-103, 1972.
43. Yardimci T, Ulutin ON: Alteration of platelet glucose transport system in atherosclerosis. *Wien Klin Wochenschr* 98:221-4, 1986.
44. Davis RB, Holtz GC: Effects of lead acetate on platelet aggregation, ultrastructure and serotonin release. *Thromb Diath Haemorrh* 26:455-66, 1971.
45. Tranzer JP, Pletscher A, Da Prada M: [The increase of 5-hydroxytryptamine in submicroscopic organelles of blood platelets]. *Helv Physiol Pharmacol Acta* 68:C108-10, 1966.
46. White JG, Gerrard JM: Recent advances in platelet structural physiology. *Suppl Thromb Haemost* 63:49-60, 1978.
47. Ulutin ON, Balkuv-Ulutin S, Bezer-Goker B, Cizmeci G, Ferhanoglu B, Ozsoy Y, Ugur MS, Ulutin T, Yaman A, Yardimci T: Effect of defibrotide on platelet function. *Semin Thromb Hemost* 22 Suppl 1:21-4, 1996.
48. White JG: The dense bodies of human platelets: inherent electron opacity of the serotonin storage particles. *Blood* 33:598-606, 1969.
49. Jaffredo T, Gautier R, Eichmann A, Dieterlen-Lievre F: Intraaortic hemopoietic cells are derived from endothelial cells during ontogeny. *Development* 125:4575-83, 1998.
50. Deutsch VR, Tomer A: Megakaryocyte development and platelet production. *Br J Haematol* 134:453-66, 2006.
51. Schulze H, Shivdasani RA: Molecular mechanisms of megakaryocyte differentiation. *Semin Thromb Hemost* 30:389-98, 2004.
52. Roy L, Coullin P, Vitrat N, Hellio R, Debili N, Weinstein J, Bernheim A, Vainchenker W: Asymmetrical segregation of chromosomes with a normal

- metaphase/anaphase checkpoint in polyploid megakaryocytes. *Blood* 97:2238-47, 2001.
53. Geng Y, Yu Q, Sicinska E, Das M, Schneider JE, Bhattacharya S, Rideout WM, Bronson RT, Gardner H, Sicinski P: Cyclin E ablation in the mouse. *Cell* 114:431-43, 2003.
 54. Paone DB, Cutts JH, Krause WJ: Megakaryocytopoiesis in the liver of the developing opossum (*Didelphis virginiana*). *J Anat* 120:239-52, 1975.
 55. Jain A, Costa G, Marsh W, Fontes P, Devera M, Mazariegos G, Reyes J, Patel K, Mohanka R, Gadomski M, Fung J, Marcos A: Thrombotic and nonthrombotic hepatic artery complications in adults and children following primary liver transplantation with long-term follow-up in 1000 consecutive patients. *Transpl Int* 19:27-37, 2006.
 56. Kaushansky K: Thrombopoietin and the hematopoietic stem cell. *Ann N Y Acad Sci* 1044:139-41, 2005.
 57. Breton-Gorius J, Vainchenker W: Immunological and cytochemical characterization of megakaryocytic lineage leukemia. *Prog Clin Biol Res* 215:301-17, 1986.
 58. Tomer A: Human marrow megakaryocyte differentiation: multiparameter correlative analysis identifies von Willebrand factor as a sensitive and distinctive marker for early (2N and 4N) megakaryocytes. *Blood* 104:2722-7, 2004.
 59. Broudy VC, Kaushansky K: Thrombopoietin, the c-mpl ligand, is a major regulator of platelet production. *J Leukoc Biol* 57:719-25, 1995.
 60. Kaushansky K: Thrombopoietin: the primary regulator of megakaryocyte and platelet production. *Thromb Haemost* 74:521-5, 1995.
 61. Le Breton GC, Sandler WC, Feinberg H: The effect of D2O and chlortetracycline on ADP-induced platelet shape change and aggregation. *Thromb Res* 8:477-85, 1976.
 62. Gorius JB, Daniel MT, Flandrin G, Denoel GK: Fine structure and peroxidase activity of circulating micromegakaryoblasts and platelets in a case of acute myelofibrosis. *Br J Haematol* 25:331-9, 1973.
 63. Caine YG, Vlodaysky I, Hersh M, Polliack A, Gurfel D, Or R, Levine RF, Eldor A: Adhesion, spreading and fragmentation of human megakaryocytes exposed to subendothelial extracellular matrix: a scanning electron microscopy study. *Scan Electron Microsc*:1087-94, 1986.
 64. Eldor A, Levine RF, Caine YG, HyAm E, Vlodaysky I: Megakaryocyte interaction with the subendothelial extracellular matrix. *Prog Clin Biol Res* 215:399-404, 1986.

65. Patel SR, Hartwig JH, Italiano JE, Jr.: The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J Clin Invest* 115:3348-54, 2005.
66. Zucker-Franklin D: The submembranous fibrils of human blood platelets. *J Cell Biol* 47:293-9, 1970.
67. Nagler A, Deutsch VR, Varadi G, Pick M, Eldor A, Slavin S: Recombinant human interleukin-6 accelerates in-vitro megakaryocytopoiesis and platelet recovery post autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 19:343-9, 1995.
68. Tomer A, Harker LA, Burstein SA: Purification of human megakaryocytes by fluorescence-activated cell sorting. *Blood* 70:1735-42, 1987.
69. Broudy VC, Lin NL, Kaushansky K: Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 85:1719-26, 1995.
70. Bruno S, Gunetti M, Gammaitoni L, Dane A, Cavalloni G, Sanavio F, Fagioli F, Aglietta M, Piacibello W: In vitro and in vivo megakaryocyte differentiation of fresh and ex-vivo expanded cord blood cells: rapid and transient megakaryocyte reconstitution. *Haematologica* 88:379-87, 2003.
71. Kaushansky K: Thrombopoietin: basic biology, clinical promise. *Int J Hematol* 62:7-15, 1995.
72. Puri RN, Colman RW: ADP-induced platelet activation. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32:437-502, 1997.
73. Brass LF, Hoxie JA, Kieber-Emmons T, Manning DR, Poncz M, Woolkalis M: Agonist receptors and G proteins as mediators of platelet activation. *Adv Exp Med Biol* 344:17-36, 1993.
74. Chao BH, Kalkunte S, Maraganore JM, Stone SR: Essential groups in synthetic agonist peptides for activation of the platelet thrombin receptor. *Biochemistry* 31:6175-8, 1992.
75. Karniguian A, Grelac F, Levy-Toledano S, Legrand YJ, Rendu F: Collagen-induced platelet activation mainly involves the protein kinase C pathway. *Biochem J* 268:325-31, 1990.
76. Nakano H, Ohno H, Saito T: Activation of phospholipase C-gamma 1 through transfected platelet-derived growth factor receptor enhances interleukin 2 production upon antigen stimulation in a T-cell line. *Mol Cell Biol* 14:1213-9, 1994.
77. Farndale RW, Slatter DA, Siljander PR, Jarvis GE: Platelet receptor recognition and cross-talk in collagen-induced activation of platelets. *J Thromb Haemost* 5 Suppl 1:220-9, 2007.

78. Hu H, Zhang W, Li N: Glycoprotein IIb/IIIa inhibition attenuates platelet-activating factor-induced platelet activation by reducing protein kinase C activity. *J Thromb Haemost* 1:1805-12, 2003.
79. Brass LF, Shaller CC, Belmonte EJ: Inositol 1,4,5-triphosphate-induced granule secretion in platelets. Evidence that the activation of phospholipase C mediated by platelet thromboxane receptors involves a guanine nucleotide binding protein-dependent mechanism distinct from that of thrombin. *J Clin Invest* 79:1269-75, 1987.
80. Faraday N, Goldschmidt-Clermont PJ, Bray PF: Gender differences in platelet GPIIb-IIIa activation. *Thromb Haemost* 77:748-54, 1997.
81. Brooks SF, Gordge PC, Toker A, Evans AT, Evans FJ, Aitken A: Platelet protein phosphorylation and protein kinase C activation by phorbol esters with different biological activity and a novel synergistic response with Ca²⁺ ionophore. *Eur J Biochem* 188:431-7, 1990.
82. Si-Tahar M, Renesto P, Falet H, Rendu F, Chignard M: The phospholipase C/protein kinase C pathway is involved in cathepsin G-induced human platelet activation: comparison with thrombin. *Biochem J* 313 (Pt 2):401-8, 1996.
83. Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP: Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem* 273:2024-9, 1998.
84. Hwang DL, Yen CF, Nadler JL: Effect of extracellular magnesium on platelet activation and intracellular calcium mobilization. *Am J Hypertens* 5:700-6, 1992.
85. Yamaguchi A, Yamamoto N, Kitagawa H, Tanoue K, Yamazaki H: Ca²⁺ influx mediated through the GPIIb/IIIa complex during platelet activation. *FEBS Lett* 225:228-32, 1987.
86. Dorsam RT, Kim S, Murugappan S, Rachoor S, Shankar H, Jin J, Kunapuli SP: Differential requirements for calcium and Src family kinases in platelet GPIIb/IIIa activation and thromboxane generation downstream of different G-protein pathways. *Blood* 105:2749-56, 2005.
87. Wang WY, Wu YC, Wu CC: Prevention of platelet glycoprotein IIb/IIIa activation by 3,4-methylenedioxy-beta-nitrostyrene, a novel tyrosine kinase inhibitor. *Mol Pharmacol* 70:1380-9, 2006.
88. Caron A, Theoret JF, Mousa SA, Merhi Y: Anti-platelet effects of GPIIb/IIIa and P-selectin antagonism, platelet activation, and binding to neutrophils. *J Cardiovasc Pharmacol* 40:296-306, 2002.
89. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD: Increased platelet reactivity and circulating

monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 31:352-8, 1998.

90. Huo Y, Ley KF: Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med* 14:18-22, 2004.
91. Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schror K, Weber AA: Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 12:74-82, 2001.
92. Hammwohner M, Ittenson A, Dierkes J, Bukowska A, Klein HU, Lendeckel U, Goette A: Platelet expression of CD40/CD40 ligand and its relation to inflammatory markers and adhesion molecules in patients with atrial fibrillation. *Exp Biol Med (Maywood)* 232:581-9, 2007.
93. Mach F, Schonbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P: Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 394:200-3, 1998.
94. Lee JR, Koretzky GA: Production of reactive oxygen intermediates following CD40 ligation correlates with c-Jun N-terminal kinase activation and IL-6 secretion in murine B lymphocytes. *Eur J Immunol* 28:4188-97, 1998.
95. Merten M, Thiagarajan P: P-selectin in arterial thrombosis. *Z Kardiol* 93:855-63, 2004.
96. Friederichs K, Schmitz J, Weissenbach M, Heinrich PC, Schaper F: Interleukin-6-induced proliferation of pre-B cells mediated by receptor complexes lacking the SHP2/SOCS3 recruitment sites revisited. *Eur J Biochem* 268:6401-7, 2001.
97. Burstein SA: Effects of interleukin 6 on megakaryocytes and on canine platelet function. *Stem Cells* 12:386-93, 1994.
98. Sachais BS, Higazi AA, Cines DB, Poncz M, Kowalska MA: Interactions of platelet factor 4 with the vessel wall. *Semin Thromb Hemost* 30:351-8, 2004.
99. Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, Kowalska MA, Bdeir K, Leitersdorf E, Hiss E, Ziporen L, Aviram M, Cines D, Poncz M, Higazi AA: Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *J Biol Chem* 278:6187-93, 2003.
100. Deckelbaum RJ, Shipley GG, Small DM: Structure and interactions of lipids in human plasma low density lipoproteins. *J Biol Chem* 252:744-54, 1977.
101. Gallegos AM, Storey SM, Kier AB, Schroeder F, Ball JM: Structure and cholesterol dynamics of caveolae/raft and nonraft plasma membrane domains. *Biochemistry* 45:12100-16, 2006.

102. Dowling RH: The enterohepatic circulation. *Gastroenterology* 62:122-40, 1972.
103. Dietschy JM, Wilson JD: Regulation of cholesterol metabolism. *N Engl J Med* 282:1179-83, 1970.
104. Redgrave TG: Formation of cholesteryl ester-rich particulate lipid during metabolism of chylomicrons. *J Clin Invest* 49:465-71, 1970.
105. Osono Y, Nakajima K, Hata Y: Hypertriglyceridemia and fatty liver: clinical diagnosis of fatty liver and lipoprotein profiles in hypertriglyceridemic patients with fatty liver. *J Atheroscler Thromb* 2 Suppl 1:S47-52, 1995.
106. Bernstein BA, Richardson T, Amundson CH: Inhibition of cholesterol biosynthesis and acetyl-coenzyme A synthetase by bovine milk and orotic acid. *J Dairy Sci* 60:1846-53, 1977.
107. Ott DB, Lachance PA: Biochemical controls of liver cholesterol biosynthesis. *Am J Clin Nutr* 34:2295-306, 1981.
108. Russell DW: Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* 6:103-10, 1992.
109. Grinstead GF, Trzaskos JM, Billheimer JT, Gaylor JL: Cytosolic modulators of activities of microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis. Effects of Acyl-CoA inhibition and cytosolic Z-protein. *Biochim Biophys Acta* 751:41-51, 1983.
110. Clayton PT: Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch Dis Child* 78:185-9, 1998.
111. Aviram M, Hussein O, Rosenblat M, Schlezinger S, Hayek T, Keidar S: Interactions of platelets, macrophages, and lipoproteins in hypercholesterolemia: antiatherogenic effects of HMG-CoA reductase inhibitor therapy. *J Cardiovasc Pharmacol* 31:39-45, 1998.
112. Gupta AK, Rudney H: Plasma membrane sphingomyelin and the regulation of HMG-CoA reductase activity and cholesterol biosynthesis in cell cultures. *J Lipid Res* 32:125-36, 1991.
113. Lund E, Bjorkhem I: Down-regulation of hepatic HMG-CoA reductase in mice by dietary cholesterol: importance of the delta 5 double bond and evidence that oxidation at C-3, C-5, C-6, or C-7 is not involved. *Biochemistry* 33:291-7, 1994.
114. George R, Davis PJ, Luong L, Poznansky MJ: Cholesterol-mediated regulation of HMG-CoA reductase in microsomes from human skin fibroblasts and rat liver. *Biochem Cell Biol* 68:674-9, 1990.
115. Goodman DS: Cholesterol ester metabolism. *Physiol Rev* 45:747-839, 1965

116. Popjak G, Beeckmans ML: Extrahepatic lipid synthesis. *Biochem J* 47:233-8, 1950.
117. Aoki J: Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin Cell Dev Biol* 15:477-89, 2004.
118. Campbell CB, Cowley DJ, Dowling RH: Dietary factors affecting biliary lipid secretion in the rhesus monkey. A mechanism for the hypocholesterolaemic action of polyunsaturated fat? *Eur J Clin Invest* 2:332-41, 1972.
119. Danielsson H: Present Status of Research on Catabolism and Excretion of Cholesterol. *Adv Lipid Res* 1:335-85, 1963.
120. Singaraja RR, Van Eck M, Bissada N, Zimetti F, Collins HL, Hildebrand RB, Hayden A, Brunham LR, Kang MH, Fruchart JC, Van Berkel TJ, Parks JS, Staels B, Rothblat GH, Fievet C, Hayden MR: Both hepatic and extrahepatic ABCA1 have discrete and essential functions in the maintenance of plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in vivo. *Circulation* 114:1301-9, 2006.
121. Kovanen PT: Regulation of plasma cholesterol by hepatic low-density lipoprotein receptors. *Am Heart J* 113:464-9, 1987.
122. Labios M, Martinez M, Gabriel F, Guiral V, Martinez E, Aznar J: Effect of atorvastatin upon platelet activation in hypercholesterolemia, evaluated by flow cytometry. *Thromb Res* 115:263-70, 2005.
123. Sanguigni V, Pignatelli P, Lenti L, Ferro D, Bellia A, Carnevale R, Tesaro M, Sorge R, Lauro R, Violi F: Short-term treatment with atorvastatin reduces platelet CD40 ligand and thrombin generation in hypercholesterolemic patients. *Circulation* 111:412-9, 2005.
124. Nofer JR, Tepel M, Kehrel B, Wierwille S, Walter M, Seedorf U, Zidek W, Assmann G: Low-density lipoproteins inhibit the Na⁺/H⁺ antiport in human platelets. A novel mechanism enhancing platelet activity in hypercholesterolemia. *Circulation* 95:1370-7, 1997.
125. Ovesna Z, Horvathova-Kozics K: Structure-activity relationship of trans-resveratrol and its analogues. *Neoplasma* 52:450-5, 2005.
126. Bradamante S, Barenghi L, Villa A: Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev* 22:169-88, 2004.
127. Goua M, Wahle KW: Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 16:389-91, 2005.
128. Babiak J, Rudel LL: Lipoproteins and atherosclerosis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1:515-50, 1987.

129. Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC, Jr., Weisgraber KH: Lipoproteins of special significance in atherosclerosis. Insights provided by studies of type III hyperlipoproteinemia. *Ann N Y Acad Sci* 454:209-21, 1985.
130. Idzior-Walus B, Walus M, Foltyn A: [High density lipoproteins and atherosclerosis]. *Przegl Lek* 61:1433-5, 2004.
131. Srinivasan SR, Radhakrishnamurthy B, Vijayagopal P, Berenson GS: Proteoglycans, lipoproteins, and atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 285:373-81, 1991.
132. Lewis B: Classification of lipoproteins and lipoprotein disorders. *J Clin Pathol Suppl (Assoc Clin Pathol)* 5:26-31, 1973.
133. Eisenberg S: Lipoproteins and lipoprotein metabolism. A dynamic evaluation of the plasma fat transport system. *Klin Wochenschr* 61:119-32, 1983.
134. Knopp RH, Warth MR, Charles D, Childs M, Li JR, Mabuchi H, Van Allen MI: Lipoprotein metabolism in pregnancy, fat transport to the fetus, and the effects of diabetes. *Biol Neonate* 50:297-317, 1986.
135. Roheim PS: Atherosclerosis and lipoprotein metabolism: role of reverse cholesterol transport. *Am J Cardiol* 57:3C-10C, 1986.
136. Chait A: The role of lipoprotein receptors in lipid transport and in the pathogenesis of the hyperlipoproteinemias. *Spec Top Endocrinol Metab* 5:1-53, 1983.
137. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RP: Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest* 33:1051-69, 2003.
138. Hersberger M, von Eckardstein A: Modulation of high-density lipoprotein cholesterol metabolism and reverse cholesterol transport. *Handb Exp Pharmacol*:537-61, 2005.
139. Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Hattori H, Zenimaru Y, Suzuki J, Miyamori I, Yamamoto TT: The very low-density lipoprotein (VLDL) receptor: characterization and functions as a peripheral lipoprotein receptor. *J Atheroscler Thromb* 11:200-8, 2004.
140. Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Miyamori I, Yamamoto TT: The very low density lipoprotein (VLDL) receptor--a peripheral lipoprotein receptor for remnant lipoproteins into fatty acid active tissues. *Mol Cell Biochem* 248:121-7, 2003.
141. Hevonoja T, Pentikainen MO, Hyvonen MT, Kovanen PT, Ala-Korpela M: Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding

- molecular changes in modified LDL. *Biochim Biophys Acta* 1488:189-210, 2000.
142. Sunaga T, Takashima T, Matsui Y: [Lipoprotein metabolism and the molecular structure of the LDL receptor]. *Nippon Rinsho* 45:213-29, 1987.
 143. Krieger M, Herz J: Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 63:601-37, 1994.
 144. Salonen JT, Kovanen PT, Yla-Herttuala S, Korpela H: [Antioxidants, oxidation of LDL and atherosclerosis]. *Duodecim* 107:1232-9, 1991.
 145. Reaven PD: Mechanisms of atherosclerosis: role of LDL oxidation. *Adv Exp Med Biol* 366:113-28, 1994.
 146. Yuan XM, Brunk UT: Iron and LDL-oxidation in atherogenesis. *Apmis* 106:825-42, 1998.
 147. Steinberg D: A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis* 131 Suppl:S5-7, 1997.
 148. Chen K, Thomas SR, Keaney JF, Jr.: Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Radic Biol Med* 35:117-32, 2003.
 149. Pownall HJ, Morrisett JD, Sparrow JT, Smith LC, Shepherd J, Jackson RL, Gotto AM, Jr.: A review of the unique features of HDL apoproteins. *Lipids* 14:428-34, 1979.
 150. Schultz JR, Rubin EM: The properties of HDL in genetically engineered mice. *Curr Opin Lipidol* 5:126-37, 1994.
 151. Dewailly P, Sezille G, Jaillard J: [Structure, metabolism, functions and plasma changes in high density lipoproteins (HDL)]. *Journ Annu Diabetol Hotel Dieu*:65-81, 1980.
 152. Sviridov D, Nestel PJ: Genetic factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function. *Curr Opin Lipidol* 18:157-63, 2007.
 153. Ponsin G: [Role of high density lipoproteins (HDL) in reverse cholesterol transport]. *Diabete Metab* 17:319-24, 1991.
 154. Feig JE, Shamir R, Fisher EA: Atheroprotective effects of HDL: beyond reverse cholesterol transport. *Curr Drug Targets* 9:196-203, 2008.
 155. Moolenaar WH, van der Bend RL, van Corven EJ, Jalink K, Eichholtz T, van Blitterswijk WJ: Lysophosphatidic acid: a novel phospholipid with hormone- and growth factor-like activities. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 57:163-7, 1992.

156. Moolenaar WH: Lysophosphatidic acid signalling. *Curr Opin Cell Biol* 7:203-10, 1995.
157. van Corven EJ, van Rijswijk A, Jalink K, van der Bend RL, van Blitterswijk WJ, Moolenaar WH: Mitogenic action of lysophosphatidic acid and phosphatidic acid on fibroblasts. Dependence on acyl-chain length and inhibition by suramin. *Biochem J* 281 (Pt 1):163-9, 1992.
158. Davi G, Gresele P, Violi F, Basili S, Catalano M, Giammarresi C, Volpato R, Nenci GG, Ciabattini G, Patrono C: Diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and hypertension but not vascular disease per se are associated with persistent platelet activation in vivo. Evidence derived from the study of peripheral arterial disease. *Circulation* 96:69-75, 1997.
159. Moolenaar WH, Jalink K, van Corven EJ: Lysophosphatidic acid: a bioactive phospholipid with growth factor-like properties. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 119:47-65, 1992.
160. Moolenaar WH: Lysophosphatidic acid, a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem* 270:12949-52, 1995.
161. Xie Y, Gibbs TC, Meier KE: Lysophosphatidic acid as an autocrine and paracrine mediator. *Biochim Biophys Acta* 1582:270-81, 2002.
162. Xie Y, Gibbs TC, Mukhin YV, Meier KE: Role for 18:1 lysophosphatidic acid as an autocrine mediator in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 277:32516-26, 2002.
163. Lynch KR, Macdonald TL: Structure-activity relationships of lysophosphatidic acid analogs. *Biochim Biophys Acta* 1582:289-94, 2002.
164. Fourcade O, Le Balle F, Fauvel J, Simon MF, Chap H: Regulation of secretory type-II phospholipase A2 and of lysophosphatidic acid synthesis. *Adv Enzyme Regul* 38:99-107, 1998.
165. Gaits F, Fourcade O, Le Balle F, Gueguen G, Gaige B, Gassama-Diagne A, Fauvel J, Salles JP, Mauco G, Simon MF, Chap H: Lysophosphatidic acid as a phospholipid mediator: pathways of synthesis. *FEBS Lett* 410:54-8, 1997.
166. Contos JJ, Ishii I, Chun J: Lysophosphatidic acid receptors. *Mol Pharmacol* 58:1188-96, 2000.
167. Goetzl EJ: Pleiotypic mechanisms of cellular responses to biologically active lysophospholipids. *Prostaglandins* 64:11-20, 2001.
168. le Balle F, Simon MF, Meijer S, Fourcade O, Chap H: Membrane sidedness of biosynthetic pathways involved in the production of lysophosphatidic acid. *Adv Enzyme Regul* 39:275-84, 1999.

169. Jalink K, Hengeveld T, Mulder S, Postma FR, Simon MF, Chap H, van der Marel GA, van Boom JH, van Blitterswijk WJ, Moolenaar WH: Lysophosphatidic acid-induced Ca²⁺ mobilization in human A431 cells: structure-activity analysis. *Biochem J* 307 (Pt 2):609-16, 1995.
170. Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH: The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets. *Biochem J* 291 (Pt 3):677-80, 1993.
171. Sano T, Baker D, Virag T, Wada A, Yatomi Y, Kobayashi T, Igarashi Y, Tigyi G: Multiple mechanisms linked to platelet activation result in lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate generation in blood. *J Biol Chem* 277:21197-206, 2002.
172. Tokumura A, Kanaya Y, Kitahara M, Miyake M, Yoshioka Y, Fukuzawa K: Increased formation of lysophosphatidic acids by lysophospholipase D in serum of hypercholesterolemic rabbits. *J Lipid Res* 43:307-15, 2002.
173. Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J, Arai H: Autotaxin has lysophospholipase D activity leading to tumor cell growth and motility by lysophosphatidic acid production. *J Cell Biol* 158:227-33, 2002.
174. Pages C, Simon MF, Valet P, Saulnier-Blache JS: Lysophosphatidic acid synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 64:1-10, 2001.
175. Pages C, Simon M, Valet P, Saulnier-Blache JS: Lysophosphatidic acid synthesis and release(1). *Prostaglandins* 64:1-10, 2001.
176. Pages C, Daviaud D, An S, Krief S, Lafontan M, Valet P, Saulnier-Blache JS: Endothelial differentiation gene-2 receptor is involved in lysophosphatidic acid-dependent control of 3T3F442A preadipocyte proliferation and spreading. *J Biol Chem* 276:11599-605, 2001.
177. van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH: Lysophosphatidate-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell* 59:45-54, 1989.
178. Yang AH, Ishii I, Chun J: In vivo roles of lysophospholipid receptors revealed by gene targeting studies in mice. *Biochim Biophys Acta* 1582:197-203, 2002.
179. Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J: Requirement for the lpA1 lysophosphatidic acid receptor gene in normal suckling behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13384-9, 2000.
180. Im DS, Heise CE, Harding MA, George SR, O'Dowd BF, Theodorescu D, Lynch KR: Molecular cloning and characterization of a lysophosphatidic acid receptor, Edg-7, expressed in prostate. *Mol Pharmacol* 57:753-9, 2000.

181. Tigyi G, Dyer DL, Miledi R: Lysophosphatidic acid possesses dual action in cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1908-12, 1994.
182. Tokumura A, Fukuzawa K, Tsukatani H: Effects of synthetic and natural lysophosphatidic acids on the arterial blood pressure of different animal species. *Lipids* 13:572-4, 1978.
183. Wang DA, Lorincz Z, Bautista DL, Liliom K, Tigyi G, Parrill AL: A single amino acid determines lysophospholipid specificity of the S1P1 (EDG1) and LPA1 (EDG2) phospholipid growth factor receptors. *J Biol Chem* 276:49213-20, 2001.
184. Mauco G, Chap H, Simon MF, Douste-Blazy L: Phosphatidic and lysophosphatidic acid production in phospholipase C-and thrombin-treated platelets. Possible involvement of a platelet lipase. *Biochimie* 60:653-61, 1978.
185. Siess W: Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 1582:204-15, 2002.
186. Garrison WM, Jayko ME, Bennett W: Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. *Radiat Res* 16:483-502, 1962.
187. Gebicki JM: Classic redox. Garrison WM, Jayko ME, Bennett W. Radiation-induced oxidation of protein in aqueous solution. *Radiat Res* 1962; 16: 483-502. *Redox Rep* 5:15-6, 2000.
188. Hensley K, Floyd RA: Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: a look back, a look ahead. *Arch Biochem Biophys* 397:377-83, 2002.
189. Stadtman ER, Levine RL: Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899:191-208, 2000.
190. Stadtman ER: Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 928:22-38, 2001.
191. Brennan ML, Hazen SL: Amino acid and protein oxidation in cardiovascular disease. *Amino Acids* 25:365-74, 2003.
192. Sayre LM, Lin D, Yuan Q, Zhu X, Tang X: Protein adducts generated from products of lipid oxidation: focus on HNE and one. *Drug Metab Rev* 38:651-75, 2006.
193. Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER: Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res* 33 Suppl:S99-108, 2000.
194. Stadtman ER, Berlett BS: Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metab Rev* 30:225-43, 1998.

195. Sultana R, Perluigi M, Butterfield DA: Protein oxidation and lipid peroxidation in brain of subjects with Alzheimer's disease: insights into mechanism of neurodegeneration from redox proteomics. *Antioxid Redox Signal* 8:2021-37, 2006.
196. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 (Pt 1):1-18, 1997.
197. Stadtman ER: Oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins by radiolysis and by metal-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* 62:797-821, 1993.
198. Behn C, Araneda OF, Llanos AJ, Celedon G, Gonzalez G: Hypoxia-related lipid peroxidation: evidences, implications and approaches. *Respir Physiol Neurobiol* 158:143-50, 2007.
199. Pre J: [Lipid peroxidation]. *Pathol Biol (Paris)* 39:716-36, 1991.
200. Girotti AW: Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med* 1:87-95, 1985.
201. Esterbauer H, Wag G, Puhl H: Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br Med Bull* 49:566-76, 1993.
202. Gutteridge JM, Halliwell B: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 15:129-35, 1990.
203. Wendel A: Measurement of in vivo lipid peroxidation and toxicological significance. *Free Radic Biol Med* 3:355-8, 1987.
204. Moore K, Roberts LJ, 2nd: Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 28:659-71, 1998.
205. Weinberger B, Anwar M, Henien S, Sosnovsky A, Hiatt M, Jochowitz N, Witz G, Hegyi T: Association of lipid peroxidation with antenatal betamethasone and oxygen radical disorders in preterm infants. *Biol Neonate* 85:121-7, 2004.
206. Dix TA, Aikens J: Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol* 6:2-18, 1993.
207. Sodeinde O: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Baillieres Clin Haematol* 5:367-82, 1992.
208. Vulliamy T, Mason P, Luzzatto L: The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trends Genet* 8:138-43, 1992.
209. Hirono A, Miwa S: Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: structure and function of normal and variant enzymes. *Haematologia (Budap)* 25:85-97, 1993.

210. Beutler E: Study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: history and molecular biology. *Am J Hematol* 42:53-8, 1993.
211. Quak SH, Saha N, Tay JS: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 25:45-8, 1996.
212. Saltzman HA, Fridovich I: Editorial: Oxygen toxicity. Introduction to a protective enzyme: superoxide dismutase. *Circulation* 48:921-3, 1973.
213. Liochev SI, Fridovich I: How does superoxide dismutase protect against tumor necrosis factor: a hypothesis informed by effect of superoxide on "free" iron. *Free Radic Biol Med* 23:668-71, 1997.
214. Fisher CL, Hallewell RA, Roberts VA, Tainer JA, Getzoff ED: Probing the structural basis for enzyme-substrate recognition in Cu,Zn superoxide dismutase. *Free Radic Res Commun* 12-13 Pt 1:287-96, 1991.
215. Poberezkina NB, Osinskaia LF: [The biological role of superoxide dismutase]. *Ukr Biokhim Zh* 61:14-27, 1989.
216. Noor R, Mittal S, Iqbal J: Superoxide dismutase--applications and relevance to human diseases. *Med Sci Monit* 8:RA210-5, 2002.
217. Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL: Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free Radic Res* 34:325-36, 2001.
218. Harris ED: Copper as a cofactor and regulator of copper,zinc superoxide dismutase. *J Nutr* 122:636-40, 1992.
219. Brandes RP: Out of balance: a role of impaired superoxide dismutase activity for vascular constrictive remodeling after angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2121-2, 2003.
220. Smulevich G, Jakopitsch C, Droghetti E, Obinger C: Probing the structure and bifunctionality of catalase-peroxidase (KatG). *J Inorg Biochem* 100:568-85, 2006.
221. Deisseroth A, Dounce AL: Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol Rev* 50:319-75, 1970.
222. Bai J, Cederbaum AI: Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signals Recept* 10:189-99, 2001.
223. Gambassi G, Maggi V: [Catalase in biology and clinical medicine; review and experimental study.]. *Arcisp S Anna Ferrara* 10:1417-68, 1957.
224. Tappel AL: Selenium-glutathione peroxidase and vitamin E. *Am J Clin Nutr* 27:960-5, 1974.

225. Miyamoto Y, Koh YH, Park YS, Fujiwara N, Sakiyama H, Misonou Y, Ookawara T, Suzuki K, Honke K, Taniguchi N: Oxidative stress caused by inactivation of glutathione peroxidase and adaptive responses. *Biol Chem* 384:567-74, 2003.
226. Untucht-Grau R, Schirmer RH, Schirmer I, Krauth-Siegel RL: Glutathione reductase from human erythrocytes: amino-acid sequence of the structurally known FAD-binding domain. *Eur J Biochem* 120:407-19, 1981.
227. Bunce GE: Hypercholesterolemia of copper deficiency is linked to glutathione metabolism and regulation of hepatic HMG-CoA reductase. *Nutr Rev* 51:305-7, 1993.
228. Fisher AM, Barber JC, Crolla JA, James RS, Lestas AN, Jennings I, Dennis NR: Mosaic tetrasomy 8p: molecular cytogenetic confirmation and measurement of glutathione reductase and tissue plasminogen activator levels. *Am J Med Genet* 47:100-5, 1993.
229. al-Turk WA, Stohs SJ, el-Rashidy FH, Othman S, Shaheen O: Glutathione, glutathione S-transferase and glutathione reductase in human erythrocytes and lymphocytes as a function of sex. *Drug Des Deliv* 1:237-43, 1987.
230. Wormhoudt LW, Commandeur JN, Vermeulen NP: Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 29:59-124, 1999.
231. Aldridge WN: Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J* 53:117-24, 1953.
232. Ooms AJ, Boter HL: Sterospecificity of hydrolytic enzymes in their reaction with optically active organophosphorus compounds. I. The reaction of cholinesterases and paraoxonase with S-alkyl P-nitrophenyl methylphosphonothiolates. *Biochem Pharmacol* 14:1839-45, 1965.
233. Geldmacher-von M, Lindorf HH, Petenyi M, Flugel M, Fischer T, Hiller T: [Genetically determined polymorphism of human serum paraoxonase (EC 3.1.1.2)]. *Humangenetik* 17:331-5, 1973.
234. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI: Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol* 31:329-36, 1998.
235. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Connelly PW, Hegele RA: Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 7:69-76, 1996.
236. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI: Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:473-80, 2001.

237. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI: The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* 13:357-62, 2002.
238. Niki E: Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 44:227-53, 1987.
239. Ammon HP, Mark M: Thiols and pancreatic beta-cell function: a review. *Cell Biochem Funct* 3:157-71, 1985.
240. Kjoller-Hansen L, Boesgaard S, Laursen JB, Aldershvile J, Poulsen HE: [Importance of thiols (SH group) in the cardiovascular system]. *Ugeskr Laeger* 155:3642-5, 1993.
241. Dickinson DA, Forman HJ: Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64:1019-26, 2002.
242. Ketterer B, Coles B, Meyer DJ: The role of glutathione in detoxication. *Environ Health Perspect* 49:59-69, 1983.
243. Sies H: [Biochemistry of thiol groups: the role of glutathione]. *Naturwissenschaften* 76:57-64, 1989.
244. Shan XQ, Aw TY, Jones DP: Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol Ther* 47:61-71, 1990.
245. Lomaestro BM, Malone M: Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Ann Pharmacother* 29:1263-73, 1995.
246. Griffith OW, Mulcahy RT: The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 73:209-67, xii, 1999.
247. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem* 30:91-113, 1997.
248. Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ: Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int J Mol Med* 8:3-17, 2001.
249. Sovak M: Grape Extract, Resveratrol, and Its Analogs: A Review. *J Med Food* 4:93-105, 2001.
250. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM: The world of resveratrol. *Adv Exp Med Biol* 492:159-82, 2001.
251. Chen Y, Tseng SH: Review. Pro- and anti-angiogenesis effects of resveratrol. *In Vivo* 21:365-70, 2007.
252. Orallo F: Comparative studies of the antioxidant effects of cis- and trans-resveratrol. *Curr Med Chem* 13:87-98, 2006.

253. Delmas D, Jannin B, Latruffe N: Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. *Mol Nutr Food Res* 49:377-95, 2005.
254. Fremont L: Biological effects of resveratrol. *Life Sci* 66:663-73, 2000.
255. Saiko P, Szakmary A, Jaeger W, Szekeres T: Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad? *Mutat Res* 658:68-94, 2008.
256. Kimura Y: Pharmacological studies on resveratrol. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25:297-310, 2003.
257. Olas B, Wachowicz B: Resveratrol, a phenolic antioxidant with effects on blood platelet functions. *Platelets* 16:251-60, 2005.
258. Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ: Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res* 47:549-55, 2000.
259. Bradamante S, Piccinini F, Barenghi L, Bertelli AA, De Jonge R, Beemster P, De Jong JW: Does resveratrol induce pharmacological preconditioning? *Int J Tissue React* 22:1-4, 2000.
260. Cucciolla V, Borriello A, Oliva A, Galletti P, Zappia V, Della Ragione F: Resveratrol: from basic science to the clinic. *Cell Cycle* 6:2495-510, 2007.
261. Shankar S, Singh G, Srivastava RK: Chemoprevention by resveratrol: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Front Biosci* 12:4839-54, 2007.
262. Wasowicz W, Neve J, Peretz A: Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 39:2522-6, 1993.
263. Gocmen AY, Gumuslu S, Semiz E: Association between paraoxonase-1 activity and lipid peroxidation indicator levels in people living in the Antalya region with angiographically documented coronary artery disease. *Clin Cardiol* 27:426-30, 2004.
264. Furlong CE, Richter RJ, Seidel SL, Motulsky AG: Role of genetic polymorphism of human plasma paraoxonase/arylesterase in hydrolysis of the insecticide metabolites chlorpyrifos oxon and paraoxon. *Am J Hum Genet* 43:230-8, 1988.
265. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN: Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 86:193-9, 1991.

266. Kishimoto T, Matsuoka T, Imamura S, Mizuno K: A novel colorimetric assay for the determination of lysophosphatidic acid in plasma using an enzymatic cycling method. *Clin Chim Acta* 333:59-67, 2003.
267. Zinkham WH, Lenhard RE, Jr., Childs B: A deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in erythrocytes from patients with favism. *Bull Johns Hopkins Hosp* 102:169-75, 1958.
268. Aebi H, Suter H, Feinstein RN: Activity and stability of catalase in blood and tissues of normal and acatalasemic mice. *Biochem Genet* 2:245-51, 1968.
269. Fecondo JV, Augusteyn RC: Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the human cataractous lens. *Exp Eye Res* 36:15-23, 1983.
270. Cohen BD, Lowy DR, Schiller JT: The conserved C-terminal domain of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein can associate with an alpha-adaptin-like molecule: a possible link between growth factor receptors and viral transformation. *Mol Cell Biol* 13:6462-8, 1993.
271. Sedlak J, L H: Changes of glutathione and protein bound SH-groups concentration in rat adrenals under acute and repeated stress. *Endocrinol Exp* 16:103-9, 1982.
272. Klee GG, Fairbanks VF, Pierre RV, O'Sullivan MB: Routine erythrocyte measurements in diagnosis of iron-deficiency anemia and thalassemia minor. *Am J Clin Pathol* 66:870-7, 1976.
273. Ferreira M, Moradas-Ferreira P, Reis-Henriques MA: The effect of long-term depuration on levels of oxidative stress biomarkers in mullets (*Mugil cephalus*) chronically exposed to contaminants. *Mar Environ Res* 64:181-90, 2007.
274. Gocmen AY, Sahin E, Kocak H, Tuncer M, Gumuslu S: Levels of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide and lipid peroxidation markers in patients with end-stage renal disease having peritoneal dialysis treatment. *Clin Biochem*, 2008.
275. Daughaday WH, Lowry OH, Rosebrough NJ, Fields WS: Determination of cerebrospinal fluid protein with the Folin phenol reagent. *J Lab Clin Med* 39:663-5, 1952.
276. 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1512-31, 1995.
277. Ruengsakulrach P, Sinclair R, Komeda M, Raman J, Gordon I, Buxton B: Comparative histopathology of radial artery versus internal thoracic artery

and risk factors for development of intimal hyperplasia and atherosclerosis. *Circulation* 100:II139-44, 1999.

278. Oak MH, El Bedoui J, Schini-Kerth VB: Antiangiogenic properties of natural polyphenols from red wine and green tea. *J Nutr Biochem* 16:1-8, 2005.
279. Kollar P, Hotolova H: [Biological effects of resveratrol and other constituents of wine]. *Ceska Slov Farm* 52:272-81, 2003.
280. Sinzinger H, Pirich C, Bednar J, O'Grady J: Ex-vivo and in-vivo platelet function in patients with severe hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis. *Thromb Res* 82:291-301, 1996.
281. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, Gharbi N, Kamoun A, El-Fazaa S: Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol Alcohol* 41:236-9, 2006.
282. Yokogoshi H, Mochizuki H, Nanami K, Hida Y, Miyachi F, Oda H: Dietary taurine enhances cholesterol degradation and reduces serum and liver cholesterol concentrations in rats fed a high-cholesterol diet. *J Nutr* 129:1705-12, 1999.
283. Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L: Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 100:614-20, 1999.
284. Libby P, Simon DI: Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation* 103:1718-20, 2001.
285. Libby P, Mach F, Schonbeck U, Bourcier T, Aikawa M: Regulation of the thrombotic potential of atheroma. *Thromb Haemost* 82:736-41, 1999.
286. Maito FL, Rados PV, Filho MS, Barbachan JJ, Quadros O: Proliferating cell nuclear antigen expression on tongue of mice after intake of, or topical exposure to, alcohol. *Alcohol* 31:25-30, 2003.
287. Serebruany VL, Lowry DR, Fuzailov SY, Levine DJ, O'Connor CM, Gurbel PA: Moderate alcohol consumption is associated with decreased platelet activity in patients presenting with acute myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis* 9:229-34, 2000.
288. Chen Y, Davis-Gorman G, Watson RR, McDonagh PF: Platelet CD62p expression and microparticle in murine acquired immune deficiency syndrome and chronic ethanol consumption. *Alcohol Alcohol* 38:25-30, 2003.
289. Tailor A, Granger DN: Hypercholesterolemia promotes P-selectin-dependent platelet-endothelial cell adhesion in postcapillary venules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:675-80, 2003.

290. Garlich CD, John S, Schmeisser A, Eskafi S, Stumpf C, Karl M, Goppelt-Struebe M, Schmieder R, Daniel WG: Upregulation of CD40 and CD40 ligand (CD154) in patients with moderate hypercholesterolemia. *Circulation* 104:2395-400, 2001.
291. Contin C, Pitard V, Itai T, Nagata S, Moreau JF, Dechanet-Merville J: Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* 278:32801-9, 2003.
292. Zhuang Y, Huang J, Zhou Z, Ge Y, Fan Y, Qi C, Zhen L, Monchatre E, Edelman L, Zhang X: A novel blocking monoclonal antibody recognizing a distinct epitope of human CD40 molecule. *Tissue Antigens* 65:81-7, 2005.
293. Luomala M, Paiva H, Laaksonen R, Thelen K, Lutjohann D, Peltonen N, Lehtimaki T: Plasma-soluble CD40 is related to cholesterol metabolism in patients with moderate hypercholesterolemia. *Scand Cardiovasc J* 40:280-4, 2006.
294. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P: The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest* 102:1369-76, 1998.
295. Halverstadt A, Phares DA, Roth S, Ferrell RE, Goldberg AP, Hagberg JM: Interleukin-6 genotype is associated with high-density lipoprotein cholesterol responses to exercise training. *Biochim Biophys Acta* 1734:143-51, 2005.
296. Ascer E, Bertolami MC, Venturinelli ML, Buccheri V, Souza J, Nicolau JC, Ramires JA, Serrano CV, Jr.: Atorvastatin reduces proinflammatory markers in hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 177:161-6, 2004.
297. Zhao SP, Zhang DQ: Atorvastatin reduces interleukin-6 plasma concentration and adipocyte secretion of hypercholesterolemic rabbits. *Clin Chim Acta* 336:103-8, 2003.
298. Qureshi AA, Qureshi N, Hasler-Rapacz JO, Weber FE, Chaudhary V, Crenshaw TD, Gapor A, Ong AS, Chong YH, Peterson D, et al.: Dietary tocotrienols reduce concentrations of plasma cholesterol, apolipoprotein B, thromboxane B2, and platelet factor 4 in pigs with inherited hyperlipidemias. *Am J Clin Nutr* 53:1042S-1046S, 1991.
299. Penumathsa SV, Thirunavukkarasu M, Koneru S, Juhasz B, Zhan L, Pant R, Menon VP, Otani H, Maulik N: Statin and resveratrol in combination induces cardioprotection against myocardial infarction in hypercholesterolemic rat. *J Mol Cell Cardiol* 42:508-16, 2007.

300. Feofilova EP, Tereshina VM, Memorskaia AS, Dul'kin LM, Goncharov NG: [Fungal lycopene: the biotechnology of its production and prospects for its application in medicine]. *Mikrobiologiya* 75:725-30, 2006.
301. Rao MN, Marmillot P, Gong M, Palmer DA, Seeff LB, Strader DB, Lakshman MR: Light, but not heavy alcohol drinking, stimulates paraoxonase by upregulating liver mRNA in rats and humans. *Metabolism* 52:1287-94, 2003.
302. Panchenko MP, Silva N, Stone JR: Up-regulation of a hydrogen peroxide-responsive pre-mRNA binding protein in atherosclerosis and intimal hyperplasia. *Cardiovasc Pathol*, 2008.
303. Chen L, Lyubimov AY, Brammer L, Vrieling A, Sampson NS: The binding and release of oxygen and hydrogen peroxide are directed by a hydrophobic tunnel in cholesterol oxidase. *Biochemistry* 47:5368-77, 2008.
304. Rother E, Brandl R, Baker DL, Goyal P, Gebhard H, Tigyi G, Siess W: Subtype-selective antagonists of lysophosphatidic Acid receptors inhibit platelet activation triggered by the lipid core of atherosclerotic plaques. *Circulation* 108:741-7, 2003.
305. Kurata M, Suzuki M, Agar NS: Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp Biochem Physiol B* 106:477-87, 1993.
306. Tian WN, Braunstein LD, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, Stanton RC: Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol* 276:C1121-31, 1999.
307. Lord-Fontaine S, Averill-Bates DA: Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: protection by glucose. *Free Radic Biol Med* 32:752-65, 2002.
308. Sun Y, Oberley LW, Li Y: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 34:497-500, 1988.
309. Mahfouz MM, Kummerow FA: Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. *J Nutr Biochem* 11:293-302, 2000.
310. Ceballos-Picot I, Nicole A, Clement M, Bourre JM, Sinet PM: Age-related changes in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in brains of control and transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Mutat Res* 275:281-93, 1992.
311. Aebi H: [Erythrocyte catalase]. *Expos Annu Biochim Med* 29:139-66, 1969.
312. Ceballos-Picot I, Trivier JM, Nicole A, Sinet PM, Thevenin M: Age-correlated modifications of copper-zinc superoxide dismutase and

- glutathione-related enzyme activities in human erythrocytes. *Clin Chem* 38:66-70, 1992.
313. Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H: Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 256:677-86, 1987.
 314. Mueller S, Riedel HD, Stremmel W: Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ -removing enzyme in human erythrocytes. *Blood* 90:4973-8, 1997.
 315. Auger C, Teissedre PL, Gerain P, Lequeux N, Bornet A, Serisier S, Besancon P, Caporiccio B, Cristol JP, Rouanet JM: Dietary wine phenolics catechin, quercetin, and resveratrol efficiently protect hypercholesterolemic hamsters against aortic fatty streak accumulation. *J Agric Food Chem* 53:2015-21, 2005.
 316. Van Zandycke SM, Sohler PJ, Smart KA: The impact of catalase expression on the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech Ageing Dev* 123:365-73, 2002.
 317. Lin PS, Quamo S, Ho KC, Gladding J: Hyperthermia enhances the cytotoxic effects of reactive oxygen species to Chinese hamster cells and bovine endothelial cells in vitro. *Radiat Res* 126:43-51, 1991.
 318. Yen GC, Duh PD, Lin CW: Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res* 37:509-14, 2003.
 319. DeLeve LD, Kaplowitz N: Glutathione metabolism and its role in hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 52:287-305, 1991.
 320. Seidegard J, Ekstrom G: The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 4:791-9, 1997.
 321. Halliwell B: Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35:1147-50, 2007.
 322. Sayre LM, Smith MA, Perry G: Chemistry and biochemistry of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Curr Med Chem* 8:721-38, 2001.
 323. Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I, Giustarini D, Lusini L, Colombo R, Di Simplicio P: Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem* 48:742-53, 2002.
 324. Kasdallah AG, Mornagui B, Gharbi N, Machghoul S, El-Fazaa S: [Metabolic and endocrine effects of water and/or food deprivation in rats]. *C R Biol* 328:463-70, 2005.

325. Yazdanparast R, Bahramikia S, Ardestani A: Nasturtium officinale reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolaemic rats. *Chem Biol Interact* 172:176-84, 2008.
326. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39:44-84, 2007.
327. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160:1-40, 2006.
328. Devasagayam TP, Tilak JC, Bloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD: Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52:794-804, 2004.
329. Djordjevic VB: Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol* 237:57-89, 2004.
330. Yalcinkaya S, Unlucerci Y, Uysal M: Methionine-supplemented diet augments hepatotoxicity and prooxidant status in chronically ethanol-treated rats. *Exp Toxicol Pathol* 58:455-9, 2007.
331. Kumar SA, Sudhakar V, Varalakshmi P: Protective role of eicosapentaenoate-lipoate (EPA-LA) derivative in combating oxidative hepatocellular injury in hypercholesterolemic atherogenesis. *Atherosclerosis* 189:115-22, 2006.
332. Kim JW, Kang KW, Oh GT, Song J, Kim ND, Pak YK: Induction of hepatic inducible nitric oxide synthase by cholesterol in vivo and in vitro. *Exp Mol Med* 34:137-44, 2002.
333. Wilson SH, Chade AR, Feldstein A, Sawamura T, Napoli C, Lerman A, Lerman LO: Lipid-lowering-independent effects of simvastatin on the kidney in experimental hypercholesterolaemia. *Nephrol Dial Transplant* 18:703-9, 2003.

ÖZGEÇMİŞ

Ayşe Yeşim GÖÇMEN, 25.01.1975 tarihinde Antalya'nın Elmalı ilçesinde doğdu. İlkokul öğrenimini 1980-1985 tarihleri arasında Girne (Elmalı) İlkokulunda, ortaöğrenimini 1985-1992 yılları arasında Özel Antalya Lisesi'nde, yüksek öğrenimini 1992-1998 yılları arasında Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde tamamladı. 1998-2001 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. 2002 yılında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. Halen, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi Eczane biriminde eczacı olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizce, Almanca ve Fransızcadır.

Yayınlanan Uluslararası Makaleler

1. Gocmen AY, Sahin E, Kocak H, Tuncer M, Gumuslu S. Levels of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide and lipid peroxidation markers in patients with end-stage renal disease having peritoneal dialysis treatment. *Clin Biochem* 2008;41(10-11):836-40.
2. Gocmen AY, Sahin E, Semiz E, Gumuslu S. Is elevated serum ceruloplasmin level associated with increased risk of coronary artery disease? *Can J Cardiol* 2008;24(3):209-212.
3. Sahin E, Gocmen AY, Kocak H, Tuncer M, Gumuslu S. The association of advanced glycation end-products with glutathione status. *Ann Clin Biochem* 2008;45(Pt 4):369-374.
4. Kocak H, Gumuslu S, Ermis C, Mahsereci E, Sahin E, Gocmen AY, et al. Oxidative stress and asymmetric dimethylarginine is independently associated with carotid intima media thickness in peritoneal dialysis patients. *Am J Nephrol* 2008;28(1):91-96.
5. Gocmen YA, Semiz E, Gumuslu S. Relationship between paraoxonase-1 (PON1) activity and lipoprotein (a) levels in Turkish coronary artery disease patients living in the Antalya region. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005;12(2):185-186.
- 6: Göçmen AY, GümüŖlü S, Semiz E. Association between paraoxonase-1 activity and lipid peroxidation indicator levels in people living in the Antalya region with angiographically documented coronary artery disease. *Clin Cardiol*. 2004;27(7):426-430.

Levels of asymmetric dimethylarginine, nitric oxide and lipid peroxidation markers in patients with end-stage renal disease having peritoneal dialysis treatment

Ayşe Yeşim Göçmen^a, Emel Şahin^a, Hüseyin Koçak^b, Murat Tuncer^b, Saadet Gümüslü^{a,*}

^a Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

^b Department of Nephrology, Faculty of Medicine, Akdeniz University, 07070 Antalya, Turkey

Received 3 March 2008; received in revised form 11 April 2008; accepted 13 April 2008

Available online 23 April 2008

Abstract

Objectives: In this study, we aimed to investigate the activities of paraoxonase-1 (PON1) and nitric oxide synthase (NOS) and the levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA), nitric oxide (NO), oxidized low-density lipoprotein (oxLDL), ceruloplasmin (CP), thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), malondialdehyde (MDA), 4-hydroxynonenal (HNE) and lipids in serum of patients with end-stage renal disease (ESRD) having continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) treatment and controls living in the Antalya region, Turkey.

Design and methods: Fifty-three patients with ESRD were enrolled in this study and were treated by CAPD. As the control group ($n=32$), subjects with normal renal function were included.

Results: Serum PON1 activity and high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) levels were decreased in ESRD patients whereas ADMA, NO, oxLDL, CP, TBARS, MDA and HNE levels and NOS activity were increased with regard to control group. In CAPD patients, ADMA positively correlated with NO, CP, oxLDL, TBARS and MDA levels whereas negatively correlated with PON1 activity. On multiple logistic regression analysis, risk factors associated with ESRD included CP, TBARS, triglycerides (TG) and very low-density lipoprotein-cholesterol (VLDL-C) levels.

Conclusions: Our data have demonstrated that ESRD patients on CAPD treatment exhibit increased lipid peroxidation reactions and decreased antioxidant protection. The assay of serum HNE and MDA may be useful to evaluate the individual accumulation of these toxic aldehydes to test the efficiency of new dialysis strategies in removing them.

© 2008 The Canadian Society of Clinical Chemists. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: End-stage renal disease (ESRD); Continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD); Asymmetric dimethylarginine (ADMA); Nitric oxide synthase; Nitric oxide; Oxidative stress; Paraoxonase; Oxidized low-density lipoprotein; 4-hydroxynonenal; Ceruloplasmin

Introduction

Each year, the number of patients with chronic kidney disease that progress to end-stage renal disease (ESRD) are increasing and the prevalence of impaired kidney function has been estimated to be between 10% and 20% of adult populations in most countries worldwide [1,2]. Continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) extends the lives of ESRD patients by separating colloids and crystalloids in peritoneal capillary

blood using dialysis fluids containing high concentrations of dextrose, acting as an osmotic agent [2]. During CAPD, glucose degradation products, low pH and high osmolality increase reactive oxygen species (ROS) production [3]. Reactive oxygen species may directly alter proteins with the eventual formation of oxidized amino acids [4]. Alternatively, the presence of low pH and renal failure increase protein degradation [5]. Proteolysis of proteins containing methylarginine residues leads to the release of asymmetric dimethylarginine (ADMA) into the plasma [6]. Asymmetric dimethylarginine is a competitive inhibitor of nitric oxide synthase (NOS). In patients with renal failure, plasma ADMA concentrations are reported to be increased whereas

* Corresponding author. Fax: +90 242 2274495.

E-mail address: sgumuslu@akdeniz.edu.tr (S. Gümüslü).

concentrations of arginine, the endogenous substrate for NOS, are reduced [7]. In literature, conflicting results are reported about plasma NOS activity and nitric oxide (NO) levels in patients with renal disease [8,9]. In ESRD patients, the existence of a vicious circle from inhibition of NO production cause a subsequent increase in oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) accumulation and further increases the synthesis of ADMA [10].

Hydroxynonenal (HNE), which is one of the major unsaturated aldehydes yielded by peroxidation of membrane lipids in association with oxidative stress, has been suggested to play critical roles in the pathogenesis of various diseases, such as atherosclerosis, diabetes and chronic renal failure [11]. An association between HNE and ADMA levels has not been previously studied in ESRD patients on peritoneal dialysis. Possessing a peroxidase-like activity, paraoxonase-1 (PON1) was shown to protect against lipoprotein oxidation [12] in ESRD whereas ceruloplasmin (CP) has been reported to act as a pro-oxidant or an antioxidant, depending on its concentration [13]. But no report is present in the literature about its relation with lipid peroxidation or NOS activity in ESRD patients on CAPD.

Therefore, in this study, we matched the subjects for age and sex to eliminate the influence of age and gender and aimed to investigate the changes in the activities of PON1 and NOS and the levels of ADMA, NO, CP and lipid peroxidation markers (oxLDL, thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), malondialdehyde (MDA) and HNE) in patients with ESRD having CAPD treatment living in the Antalya region, Turkey. We also aimed to determine the correlations among ADMA, NO, oxLDL, CP, TBARS, MDA and HNE levels and NOS and PON1 activity in CAPD patients.

Materials and methods

Subjects

Fifty-three ESRD patients (27 females and 26 males) on CAPD for at least 3 months at Akdeniz University School of Medicine and at Antalya State Hospital were enrolled in the study. All patients were clinically stable and free of active infections, diabetes mellitus and autoimmune diseases. Etiologies of chronic renal failure were hypertension ($n=24$), chronic glomerulonephritis ($n=17$) and tubulointerstitial nephritis ($n=12$). None of the patients was receiving antibiotics, corticosteroids or cytotoxic drugs at the time of the study. All patients were on a four to five dialysis exchanges per day with standard dialysis solutions.

As a control group, age and gender matched 32 healthy individual (16 females and 16 males) were enrolled in this study.

Written informed consent was obtained from each participant. The study was approved by the Akdeniz University Ethics Committee of Faculty of Medicine.

Serum samples

Venous blood samples were obtained in the morning after a 12 h fasting. Serum was separated immediately by low-

speed centrifugation (4000 rpm for 10 min at 4 °C) and separated to be used freshly for analysis by biochemists those were blinded to classification of subjects as CAPD patients and controls.

Laboratory investigations

Total cholesterol (TC), low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C), triglycerides (TG), glucose and uric acid levels were assayed employing enzymatic colorimetric methods and albumin and hemoglobin levels were assayed employing, colorimetric methods on a Roche Modular PP auto-analyzer (Roche Diagnostics, 68298 Mannheim, Germany). The factor [triglyceride]/5 was used to estimate VLDL-C concentration [14].

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) assay

Asymmetric dimethylarginine levels were measured using an ELISA kit (Protocol No: 07001, Cardiovasics, Palo Alto, CA). Using a standard curve, the absorbance of the ADMA-antibody-horse radish peroxidase complex in sample was measured at 450 nm. Asymmetric dimethylarginine concentrations of serum samples were determined in $\mu\text{mol/L}$.

Nitric oxide synthase (NOS) activity assay

Measurement of NOS activity was performed by a colorimetric assay (Bioxytech 22113, Oxis International Inc., Portland, OR, USA), which is based on the measurement of nitrite produced in the sample using Griess reagents during a timed reaction compared with a heat-inactivated control sample. Nitrate reductase is utilized for the enzymatic reduction of nitrate to nitrite. In acidic solution, nitrite is converted to nitrous acid, which diazotizes sulfanilamide. This sulfanilamide-diazonium salt is then reacted with *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamine to produce a chromophore which is measured at 540 nm and the results were given as nmol/mL/min .

Table 1
General lipid profile, albumin, hemoglobin, glucose and uric acid levels in CAPD patients and controls

Parameters	Controls ($n=32$)	CAPD patients ($n=53$)	<i>p</i> -value
TC (mg/dL)	176.16 \pm 6.27	211.15 \pm 5.86	<0.001
HDL-C (mg/dL)	47.93 \pm 1.39	40.96 \pm 0.70	<0.001
LDL-C (mg/dL)	103.22 \pm 5.65	127.70 \pm 4.57	<0.005
VLDL-C (mg/dL)	24.29 \pm 1.79	38.05 \pm 2.40	<0.001
TG (mg/dL)	122.97 \pm 8.88	190.23 \pm 11.99	<0.001
Albumin (g/dL)	4.58 \pm 0.08	3.90 \pm 0.06	<0.001
Hb (g/dL)	13.63 \pm 0.31	10.81 \pm 0.20	<0.001
Glucose (mg/dL)	81.46 \pm 1.97	95.89 \pm 2.50	<0.001
Uric acid (mg/dL)	4.75 \pm 0.22	5.77 \pm 0.21	<0.005
Age (years)	42.20 \pm 1.97	42.39 \pm 1.70	n.s.

Values expressed as the mean \pm SEM.

TC, total cholesterol; HDL-C, high-density lipoprotein-cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein-cholesterol; VLDL-C, very low-density lipoprotein-cholesterol; TG, triglycerides; Hb, hemoglobin; CAPD, continuous ambulatory peritoneal dialysis; *n*, number of subjects; n.s. non-significant.

Table 2
Nitric oxide synthase (NOS) and PON1 activities, ADMA, NO, oxLDL, CP, TBARS, MDA and HNE levels in CAPD patients and controls

Parameters	Controls (n=32)	CAPD patients (n=53)	P-value
ADMA ($\mu\text{mol/L}$)	0.67 \pm 0.03	0.89 \pm 0.03	<0.001
NOS activity (nmol/mL/min)	3.18 \pm 0.14	4.56 \pm 0.17	<0.001
NO ($\mu\text{mol/L}$)	89.54 \pm 8.40	139.48 \pm 8.19	<0.001
PON1 activity (U/L)	486.48 \pm 24.60	392.67 \pm 21.35	<0.01
oxLDL (ng/mL)	7.79 \pm 0.62	18.45 \pm 1.43	<0.001
CP (U/L)	120.59 \pm 1.11	212.19 \pm 1.80	<0.001
TBARS ($\mu\text{mol/L}$)	0.96 \pm 0.04	2.16 \pm 0.06	<0.001
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	0.76 \pm 0.03	1.18 \pm 0.04	<0.001
HNE ($\mu\text{mol/L}$)	0.24 \pm 0.01	0.30 \pm 0.01	<0.005

Values expressed as the mean \pm SEM.

ADMA, asymmetric dimethylarginine; NO, nitric oxide; PON1, paraoxonase-1; oxLDL, oxidized-LDL; CP, ceruloplasmin; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances, MDA, malondialdehyde; HNE, 4-hydroxynonenal; CAPD, continuous ambulatory peritoneal dialysis; n, number of subjects.

Nitric oxide (NO) assay

Quantitation of NO performed spectrophotometrically employing the NADH-dependent enzyme nitrate reductase for conversion of nitrate to nitrite prior to quantitation of nitrite using Griess reagent, thus providing accurate determination of total NO production using Griess Reagent (Oxford Biomedical Research, Inc. NB 98, MI 48371 USA). The completed reaction was read at 540 nm. Nitric oxide concentrations were determined in $\mu\text{mol/L}$.

Paraoxonase-1 (PON1) activity assay

Serum PON1 activity was assayed spectrophotometrically as described previously [15,16] by using paraoxon as a substrate. One unit (U) of PON1 activity was defined as 1 μmol of *p*-nitrophenol formed per minute. Paraoxonase-1 activity was expressed as U/L.

Oxidized low-density lipoprotein (oxLDL) assay

Oxidized LDL levels were measured using an ELISA kit (catalog No: K7810 KO, Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany). The absorbance of the complex formed between oxLDL in the sample and the goat-anti oxLDL peroxidase conjugate was measured at 450 nm. Using a standard curve, oxLDL concentrations of samples were determined as ng/mL.

Table 3
Correlation coefficients between ADMA, NO, oxLDL, CP, TBARS, MDA and HNE levels and NOS and PON1 activities in CAPD patients

	ADMA	NOS	NO	PON1	oxLDL	CP	TBARS	MDA	HNE
ADMA	1.000	–	0.437**	–0.591**	0.403**	0.287*	0.523**	0.399**	–
PON1	–0.591**	–0.457**	–0.556**	1.000	–0.513**	–0.344*	–0.564**	–0.674**	–0.496**
oxLDL	0.403**	0.379**	0.339*	–0.380**	1.000	0.339**	0.377**	0.428**	0.419**
CP	0.287*	–	–	–0.344*	–	1.000	0.367**	0.309*	–

* p <0.05.

** p <0.001.

ADMA, asymmetric dimethylarginine; NOS, nitric oxide synthase; NO, nitric oxide; PON1, paraoxonase-1; oxLDL, oxidized-LDL; CP, ceruloplasmin; TBARS, thiobarbituric acid-reactive substances, MDA, malondialdehyde; HNE, 4-hydroxynonenal; CAPD, continuous ambulatory peritoneal dialysis.

Ceruloplasmin (CP) assay

Serum CP was determined according to the method of Schosinsky et al. [17] by using *o*-dianisidine dihydrochloride as a substrate. The results were presented as U/L.

Lipid peroxidation products assay

Malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (HNE) assays

Measurements of serum MDA and HNE were performed by a colorimetric assay kit (Bioxytech LPO-586, Oxis International Inc., Portland, OR, U.S.A.). The results were given as $\mu\text{mol/L}$.

TBARS assay

TBARS levels were measured by a fluorometric method described by Wasowicz et al. [18] and Gumuslu et al. [19] using 1,1,3,3-tetramethoxypropane as a standard. Fluorescence of *n*-butanol extract was measured in a spectrofluorometer (Shimadzu RF-5000 (Kyoto, Japan)), using wavelengths of 525 nm for excitation and 547 nm for emission. The results were estimated as $\mu\text{mol/L}$.

Statistics

All statistical analysis were performed using the SPSS version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Student's *t* test was used for comparison of means. Pearson's correlation coefficient was used to test the strength of any associations between different variables. Multiple logistic regression analysis was used to identify associations between CAPD and the independent parameters. Data were expressed as mean \pm SEM. *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Table 1 reports data of general lipid profiles from CAPD patients and controls. In CAPD patients TC, LDL-C, VLDL-C, TG, glucose and uric acid levels were higher (p <0.005) while HDL-C, hemoglobin and albumin levels were significantly lower (p <0.001) than the controls (Table 1).

In CAPD patients, PON1 activity was significantly lower (p <0.01) than the controls. On the other hand, CAPD patients had elevated levels of ADMA, NO, oxLDL, CP, TBARS, MDA and HNE and NOS activity (Table 2).

Table 3 shows the correlation coefficients among various parameters including ADMA, NOS, NO, PON1, oxLDL, CP, TBARS, MDA and HNE in CAPD patients.

On multiple logistic regression analysis, risk factors associated with CAPD included CP, TBARS, TG and VLDL-C levels.

Discussion

Compounds accumulating in the blood during the development of ESRD have either a direct or an indirect impact on several biochemical and physiological functions [20]. We therefore paid attention to the behavior of some of these parameters in Turkish ESRD patients on peritoneal dialysis living in Antalya region.

There are only a limited number of studies investigating ADMA levels in CAPD patients. Our results denote increased ADMA levels as compared with healthy controls. Our finding is in accordance with the report of Xizo et al. [21] whereas Kielstein et al. [9] reported significant lower levels of ADMA in patients treated with peritoneal dialysis. Interestingly, standard peritoneal dialysis solutions such as 1.5 % and 4.25 % Dianeal have been shown to reverse the hemodynamic effects of ADMA on rat mesenteric arterioles *in vivo* within minutes [9]. For this reason the observed increase in ADMA concentration might be due to increased *in vivo* protein degradation, inhibition of its degradation via dimethylaminohydrolase, diminished renal excretion, and dysfunction of the L-arginine/NO pathway [6] or CAPD treatment.

Mittermayer et al. [22] denoted that ADMA may influence constitutive NO formation in chronic renal failure and elevated ADMA might stimulate endothelial NO release in PD patients. In this study, in spite of the increased levels of the NOS inhibitor ADMA, we observed a significant increase in NOS activity and NO concentration in CAPD patients. Erdogan et al. [23] also reported increased serum NO levels in peritoneal dialysis (PD) patients while Schmidt et al. [24] found decreased nitric oxide production in ESRD patients on PD. As nitrite and nitrate are eliminated via the kidneys [24], they increase in renal failure, despite a low overall NO production. This finding made us assume if the ADMA concentration in ESRD might be reflecting the actual fine tune between NOS pathway and free radical production.

The reason for measuring PON1 activity in this study was to point out that there may be a relationship between PON1 activity and lipid peroxidation parameters which are also indicators of increased free radical production. We observed decreased PON1 activity in ESRD patients having CAPD, which is in accordance with the results of Jurek et al. [25] who suggested that free radical production might be delayed or inhibited by PON1. This idea seems to be supported by our findings on the negative correlations between PON1 activity and ADMA, NO, oxLDL, CP, TBARS, MDA and HNE levels and NOS activity. The lower PON1 activity may be related to increased levels of these compounds in serum. Even though the negative association between lipid peroxidation markers and PON1 is studied [25] no report is present in the literature concerning any relationship between

PON1 activity and ADMA/NOS pathway in ESRD patients on CAPD treatment. For this reason further studies are needed to understand the association between decreased PON1 activity and ADMA/NOS pathway in ESRD patients.

Increased oxidative modification of LDL has been reported in patients receiving hemodialysis treatment but not clarified in patients undergoing PD [26]. In the present study, we measured direct oxLDL, which is based on immunological reactions representing the oxidative changes occurring in the apolipoprotein-B component of LDL [27]. Levels of oxLDL were significantly higher in the CAPD patients than in the controls which are in agreement with the study of Pawlak et al. [28]. The significant positive correlations among oxLDL levels and ADMA, NO, TBARS, MDA, HNE and CP levels and NOS activity, observed in this study suggest a link between these parameters in CAPD patients. Paiva et al. [27] reported that there may be a regulatory system between LDL oxidation, plasma nitrate and ADMA *in vivo*. Taking together the associations among ADMA, PON1 and lipid peroxidation indicators, we assume that, the effect of ADMA/NO system is directed against LDL lipid component as well as its protein moiety.

We found increased CP levels in ESRD patients having CAPD than the controls. Emenaker et al. [29] concluded that CP appears to be lower in CAPD patients and no report underlines increased CP in CAPD patients. On the other hand, in our patient group, the positive correlation of CP with ADMA, MDA and TBARS levels and the negative correlation with HDL-C levels and PON1 activity, made us assume that an antioxidant protein like CP might have changed status from antioxidant to pro-oxidant in the patients group that we have studied. Elevated serum CP levels might be due to high oxidant stress and preserved residual renal function in the presence of ESRD and contribute to increased lipid peroxidation.

Lipid peroxides frequently decompose to reactive aldehydes like HNE and MDA that reacts with nucleic acids, proteins and lipids, causing tissue and organ damages [30]. We have clearly shown increased concentrations of serum TBARS, MDA and HNE in CAPD patients as compared to the controls. No report is present in the literature comparing the levels of these three markers at the same time in CAPD patients. This increase might be attributed to the extensive half-lives of MDA and HNE which are able to diffuse to various tissues that are distant from that of its formation [31]. In spite of CAPD, which provides a more physiological condition; they might not have been removed from plasma because of insufficient excretion and they rediffuse to circulation.

In conclusion, this is the first study that provides information on the levels of various oxidant and antioxidant parameters in Turkish ESRD patients on CAPD living in the Antalya region. This study indicates that the balance between the oxidative stress and the antioxidant protection is shifted in favor of the oxidants during ESRD. Besides, multiple logistic regression analysis revealed that the level of CP is the best independent risk factor for ESRD in this study population. This supports the concept that CP might have changed status from antioxidant to pro-oxidant in ESRD patients having CAPD and may, therefore, be an important determinant of clinical events. The increase in

ADMA, nitrite, nitrate and lipid peroxidation levels might indicate insufficient renal excretion of these compounds in spite of the CAPD treatment. The assay of lipid peroxidation indicators may be useful to evaluate the individual accumulation of these toxic metabolites to test the efficiency of new dialysis strategies in removing them. On the other hand, the relationship between PON1 activity and ADMA/NO pathway merits further studies with a larger group including healthy volunteers having CAPD treatment to evaluate the paradoxical effect of CAPD solutions on ADMA/NO pathway and the oxidant-antioxidant balance.

Acknowledgments

This work was supported by Akdeniz University Research Projects Unit.

References

- [1] Levin A. The need for optimal and coordinated management of CKD. *Kidney Int Suppl* 2005;99:7–10.
- [2] Lamb EJ, Newman DJ, Price CP. Kidney disease. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. St Louis, Missouri, USA: Elsevier Saunders; 2006. p. 1721–2.
- [3] Tang DC, Wen Chen T, Huang TP, Chen CL, Liu TY, Wei YH. Increased oxidative damage to peripheral blood leukocyte DNA in chronic peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:1321–30.
- [4] Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications. *Kidney Int Suppl* 2000;76:S120–5.
- [5] Walls J. Effect of correction of acidosis on nutritional status in dialysis patients. *Miner Electrolyte Metab* 1997;23:234–6.
- [6] Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 1999;43:542–8.
- [7] Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 1992;339:572–5.
- [8] Wever R, Boer P, Hijmering M, et al. Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;5:1168–72.
- [9] Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:594–600.
- [10] Smirnova IV, Kajstura M, Sawamura T, Goligorsky MS. Asymmetric dimethylarginine precludes LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H782–90.
- [11] Nakashima I, Liu W, Akhand AA, et al. 4-hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions. *Mol Aspects Med* 2003;24(4–5):231–8.
- [12] Gugliucci A, Mehlhaff K, Kinugasa E, et al. Paraoxonase-1 concentrations in end-stage renal disease patients increase after hemodialysis: correlation with low molecular AGE adduct clearance. *Clin Chim Acta* 2007;377:213–20.
- [13] Craig WY, Poulin SE, Palomaki GE, Neveux LM, Ritchie RF, Leduc TB. Oxidation-related analytes and lipid and lipoprotein concentrations in healthy subjects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:733–9.
- [14] Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499–502.
- [15] Gocmen YA, Semiz E, Gumuslu S. Relationship between paraoxonase-1 (PON1) activity and lipoprotein (a) levels in Turkish coronary artery disease patients living in the Antalya region. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2005;12:185–6.
- [16] Gocmen AY, Gumuslu S, Semiz E. Association between paraoxonase-1 activity and lipid peroxidation indicator levels in people living in the Antalya region with angiographically documented coronary artery disease. *Clin Cardiol* 2004;27:426–30.
- [17] Schosinsky KH, Lehmann HP, Beeler MF. Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of *o*-dianisidine dihydrochloride. *Clin Chem* 1974;20:1556–63.
- [18] Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993;39:2522–6.
- [19] Gumuslu S, Serteser M, Ozben T, Balkan S, Balkan E. Inhibitory role of *N* omega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor, on brain malondialdehyde and conjugated diene levels during focal cerebral ischemia in rats. *Clin Chim Acta* 1997;267:213–23.
- [20] Lameire N, Vanholder R, De Smet R. Uremic toxins and peritoneal dialysis. *Kidney Int Suppl* 2001;78:S292–7.
- [21] Xiao S, Wagner L, Schmidt RJ, Baylis C. Circulating endothelial nitric oxide synthase inhibitory factor in some patients with chronic renal disease. *Kidney Int* 2001;59:1466–72.
- [22] Mittermayer F, Schaller G, Pleimer J, et al. Asymmetrical dimethylarginine plasma concentrations are related to basal nitric oxide release but not endothelium-dependent vasodilation of resistance arteries in peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:1832–8.
- [23] Erdogan C, Unlucerci Y, Turkmen A, Kuru A, Cetin O, Bekpinar S. The evaluation of oxidative stress in patients with chronic renal failure. *Clin Chim Acta* 2002;322:157–61.
- [24] Schmidt RJ, Yokota S, Tracy TS, Sorkin MI, Baylis C. Nitric oxide production is low in end-stage renal disease patients on peritoneal dialysis. *Am J Physiol* 1999;276:F794–7.
- [25] Jurek A, Turyna B, Kubit P, Klein A. LDL susceptibility to oxidation and HDL antioxidant capacity in patients with renal failure. *Clin Biochem* 2006;39:19–27.
- [26] O'Byrne D, Devaraj S, Islam KN, et al. Low-density lipoprotein (LDL)-induced monocyte-endothelial cell adhesion, soluble cell adhesion molecules, and autoantibodies to oxidized-LDL in chronic renal failure patients on dialysis therapy. *Metabolism* 2001;50(2):207–15.
- [27] Paiva H, Laakso J, Ruokonen I, et al. Plasma asymmetric dimethylarginine (ADMA), nitrate and the indices of low-density lipoprotein oxidation. *Clin Chim Acta* 2006;371:97–101.
- [28] Pawlak K, Pawlak D, Brzosko S, Mysliwiec M. Carotid atherosclerosis is associated with enhanced beta-chemokine levels in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Atherosclerosis* 2006;186:146–51.
- [29] Emenaker NJ, DiSilvestro RA, Nahman NS, Percival S. Copper-related blood indexes in kidney dialysis patients. *Am J Clin Nutr* 1996;64:757–60.
- [30] Slatter DA, Bolton CH, Bailey AJ. The importance of lipid-derived malondialdehyde in diabetes mellitus. *Diabetologia* 2000;43:550–7.
- [31] Poon HF, Calabrese V, Scapagnini G, Butterfield DA. Free radicals: key to brain aging and heme oxygenase as a cellular response to oxidative stress. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2004;59:478–93.