

44800

T.C.  
MARMARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**d- $\alpha$  -TOKOFEROL'ÜN DÜZ KAS HÜCRESİ ÜZERİNE OLAN  
ETKİSİNİN İN VIVO OLARAK İNCELENMESİ VE BUNUN  
ATEROSKLEROZDAKİ ÖNEMİ**

**DOKTORA TEZİ  
DR. ÖNDER ŞİRİKÇİ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. NESRİN ÖZER**

44800

**İSTANBUL, 1995**

Tüm doktora eğitimim süresince gösterdiği yakın ilgi, değerli katkı ve  
yönlendirmelerinden dolayı  
Sayın Prof. Dr. Nesrin Özer'e

doktora eğitimim süresince değerli katkı ve desteklerini gördüğüm  
Sayın Prof. Dr. Kaya Emerk'e  
Sayın Prof. Dr. Yavuz Taga'ya  
Sayın Prof. Dr. A. Süha Yalçın'a  
Sayın Doç. Dr. Serpil Bilsel'e  
tüm çalışma arkadaşlarıma

ve bütün eğitim hayatım boyunca hiç bir fedakarlıktan kaçınmayan aileme en içten  
teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

|  |    |
|--|----|
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ   | 1  |
| 2. GENEL BİLGİLER  | 3  |
| 2.1 Ateroskleroz   | 3  |
| 2.1.1 Arter duvarının yapısı   | 3  |
| 2.1.2 Aterosklerozda arter duvarında görülen değişiklikler                                     | 4  |
| 2.1.3 Aterosklerozun patogenezi ile ilgili teoriler  | 6  |
| 2.1.4 Hiperkolesterolemiye arter duvarının yanıtı  | 8  |
| 2.2 Düz kas hücreleri ve ateroskleroz  | 9  |
| 2.2.1 Arter duvarında bulunan düz kas hücre fenotipleri  | 9  |
| 2.2.2 Düz kas hücre çoğalmasını sağlayan sinyaller   | 11 |
| 2.3 Protein kinaz C  | 13 |
| 2.3.1 Protein kinaz C'nin yapısal özellikleri  | 13 |
| 2.3.2 Protein kinaz C'nin düz kas hücre çoğalmasındaki rolü                                    | 15 |
| 2.4 E vitamini ve ateroskleroz   | 17 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM   | 22 |
| 3.1 Gereçler   | 22 |
| 3.2 Yöntemler  | 23 |
| 3.2.1 Tavşanlarda aterosklerozun deneysel olarak oluşturulması                                 | 23 |
| 3.2.2 Tavşan torasik aorta düz kasının hazırlanması  | 23 |
| 3.2.3 Serum kolesterol düzeylerinin ölçülmesi  | 23 |
| 3.2.4 Serum triasilgliserol düzeylerinin ölçülmesi   | 24 |
| 3.2.5 Serum $\alpha$ -tokoferol düzeylerinin ölçülmesi   | 24 |
| 3.2.6 Mikroskopik inceleme   | 25 |
| 3.2.7 Aorta düz kas hücrelerinin homojenizasyonu, sitozolik ve membran fraksiyonlarının ayrımı | 25 |
| 3.2.8 Protein tayini   | 26 |
| 3.2.9 Protein kinaz C aktivitesinin ölçülmesi  | 26 |
| 3.2.10 Protein kinaz C ve $\alpha$ -aktin ekspresyonunun ölçülmesi                             | 28 |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.10.1 Sodyum dodesil sülfat/Poliakrilamid jel elektroforezi   | 28        |
| 3.2.10.2 "Immunoblotting" (Western blotting)   | 29        |
| 3.2.10.3 "Enhanced" kemiluminesans (ECL) ile görüntüleme:  | 29        |
| 3.2.11 İstatistiksel analiz  | 30        |
| <b>4. SONUÇLAR</b>   | <b>31</b> |
| <b>4.1 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin serum lipid ve E vitamini düzeylerine etkisi</b>                    | <b>31</b> |
| 4.1.1 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin serum kolesterol düzeylerine etkisi                                  | 31        |
| 4.1.2 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin serum triasilgliserol düzeylerine etkisi                             | 32        |
| 4.1.3 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin serum E vitamini düzeylerine etkisi                                  | 32        |
| <b>4.2 Mikroskopi sonuçları</b>  | <b>33</b> |
| 4.2.1 Işık mikroskopisi  | 33        |
| 4.2.2 "Scanning" elektron mikroskopisi (SEM)   | 35        |
| 4.2.3 "Transmission" elektron mikroskopisi (TEM)   | 35        |
| <b>4.3 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin protein kinaz C üzerine etkisi</b>                                  | <b>38</b> |
| 4.3.1 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin protein kinaz C aktivitesi üzerine etkisi                            | 38        |
| 4.3.2 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin protein kinaz C'nin sitozolden membrana translokasyonuna etkisi      | 40        |
| 4.3.3 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin damar düz kas hücresi sitozolik protein kinaz C ekspresyonuna etkisi | 42        |
| 4.3.4 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin damar düz kas hücresi sitozolik $\alpha$ -aktin ekspresyonuna etkisi | 43        |
| <b>5. TARTIŞMA</b>   | <b>45</b> |
| <b>6. ÖZET</b>   | <b>52</b> |
| <b>7. SUMMARY</b>  | <b>54</b> |
| <b>8. KAYNAKLAR</b>  | <b>56</b> |

## KISALTMALAR

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>AP-1</b>                    | aktivatör protein-1  |
| <b>ATP</b>                     | adenozin trifosfat   |
| <b>bFGF</b>                    | “basic fibroblast growth factor”                               |
| <b>cAMP</b>                    | siklik adenozin monofosfat                                     |
| <b>CAPS</b>                    | 3-(sikloheksilamino)-1-propan sülfonik asit                    |
| <b>DAG</b>                     | 1,2-diasilgliserol   |
| <b>DTT</b>                     | 1,4-dithio-DL-threitol   |
| <b>ECL</b>                     | “enhanced” kemiluminesans                                      |
| <b>EDTA</b>                    | etilendiamin tetraasetik asit                                  |
| <b>EGF</b>                     | “epidermal growth factor”                                      |
| <b>EGTA</b>                    | etilenglikol-O,O'-bis-(2-aminoetil)-N,N,N',N'-tetraasetik asit |
| <b>ELISA</b>                   | “enzyme linked immunosorbent assay”                            |
| <b>GFAP</b>                    | glial fibriller asidik protein                                 |
| <b>HB-EGF</b>                  | “heparin binding epidermal-like growth factor”                 |
| <b>HPLC</b>                    | yüksek performanslı sıvı kromatografisi                        |
| <b>HRP</b>                     | “Horse radish peroxidase”                                      |
| <b>IGF 1</b>                   | “insulin-like growth factor-1”                                 |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>  | interleukin 1- $\beta$   |
| <b>IP<sub>3</sub></b>          | inozitol 1,4,5-trifosfat                                       |
| <b>LDL</b>                     | düşük dansiteli lipoprotein                                    |
| <b>MAPK</b>                    | mitojen ile aktive olan protein kinaz                          |
| <b>NF-<math>\kappa</math>B</b> | nükleer faktör kappa B   |
| <b>PBS</b>                     | fosfat ile tamponlanmış salin                                  |
| <b>PDGF</b>                    | “platelet derived growth factor”                               |
| <b>PIP<sub>2</sub></b>         | fosfatidil inozitol 4,5-difosfat                               |
| <b>PI-PLC</b>                  | fosfoinozitide özgü fosfolipaz C                               |
| <b>PKC</b>                     | protein kinaz C  |
| <b>PMA</b>                     | forbol miristat asetat   |
| <b>PMSF</b>                    | fenilmetil sülfonil florid                                     |

|              |   |
|--------------|---|
| <b>POD</b>   | peroksidaz  |
| <b>PS</b>    | fosfatidil serin  |
| <b>RER</b>   | “rough” endoplazma retikulumu                           |
| <b>TBS</b>   | tris ile tamponlanmış salin                             |
| <b>TEM</b>   | “transmission” elektron mikroskopi                      |
| <b>TEMED</b> | N,N,N',N'-tetrametiletildiamin                          |
| <b>TGF</b>   | “transforming growth factor”                            |
| <b>TTBS</b>  | % 0.1 (m/v) Tween 20 içeren tris ile tamponlanmış salin |
| <b>VLDL</b>  | çok düşük dansiteli lipoprotein                         |
| <b>WHHL</b>  | “Watanabe Heritable Hyperlipidemic” tavşan              |



# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Aterosklerotik damar hastalıkları (iskemik kalp hastalığı, aort anevrizması, alt ekstremitelerin arteriyel hastalıkları ve serebrovasküler hastalıklar) ve komplikasyonları bir çok toplumda görülen ölüm nedenlerinin başında gelmektedir.

Bu hastalığın temel özelliği, -farklı risk faktörlerinin etkisi altında değişik tetikleyici mekanizmalar ile başlayabilse bile- ortak bir son yolda, yani intimal kalınlaşma ile seyretmesi ve bunun sonucunda çeşitli tıkaçıcı damar hastalıklarının ve bunun yerine bağlı olarak da farklı klinik tabloların oluşmasıdır. İntimal kalınlaşma, düz kas hücrelerinin damarın media tabakasından intima tabakasına göç etmeleri, burada çoğalmaları ve fazla miktarda hücreler arası matriks sentezlemeleri ile oluşur. Bu arada endotel hücrelerinde işlev bozukluğu, çeşitli kan hücreleri ile endotel altı tabakaların etkileşimi, monositlerin intimaya yerleşerek makrofaj haline gelmeleri, hiperkolesterolemi ve makrofajların ve daha sonra da düz kas hücrelerinin dokudaki artmış kolesterol yükünü temizlemeye çalışırken içleri lipid vakuolleri dolu köpük hücreler haline gelmesi bu hastalık sürecinde opere eden diğer mekanizmalardır.

Düz kas hücrelerinin proliferasyonu ise, hücrelerin organizmanın hızlı büyüme dönemlerinde gösterdiği sentetik fenotipe dönmeleri ile mümkündür. Aterosklerozda düz kas hücre proliferasyonunu sağlayan çeşitli dış uyaranlardan en çok üzerinde durulan ikisi “Interleukin 1- $\beta$ ” (IL-1 $\beta$ ) ve “Platelet derived growth factor” (PDGF)’dir. Bu suda çözünen polipeptid sitokinlerin taşıdıkları sinyalin ise hücre içinde protein kinaz C (PKC) üzerinden iletildiği ve aterosklerozda çoğalmakta olan düz kas hücrelerinin PKC aktivitelerinin artmış olduğu gösterilmiştir.

Aterosklerozun gelişimini önlemede çeşitli antioksidanların ve özellikle E vitamininin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. E vitamini gerek hücre zarlarını gerekse lipoproteinleri oksidasyondan ve serbest radikallerden koruyarak bu etkisini göstermektedir. Bununla birlikte, E vitamininin antioksidan etkisinden bağımsız olarak düz kas hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı, bu etkinin proliferasyonu uyaran etkene ve kullanılan hücre tipine özgü olduğu in vitro deneyler ile gösterilmiştir. E vitamininin biyolojik aktivitesine sahip olan çeşitli stereoizomerlerden yalnızca  $\alpha$ -

tokoferol bu etkiyi göstermektedir. E vitamininin hangi mekanizma üzerinden antiproliferatif etki gösterdiğini araştıran çalışmalar devam etmektedir. Ancak,  $\alpha$ -tokoferolün proliferasyonda önemli bir rolü olan PKC aktivitesini baskıladığı bilinmektedir.

Bu çalışmada biz;

1. kolesterolden zengin dietle deneysel olarak ateroskleroz oluşturulan tavşanlarda düz kas hücre proliferasyonunu mikroskopik ve moleküler düzeyde incelemeyi ve bu proliferasyonun mekanizmasının PKC aktivitesi üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğini,
2. E vitamininin in vitro olarak gösterilen antiproliferatif etkisinin, kolesterolden zengin dietle deneysel olarak ateroskleroz oluşturulan tavşanlara E vitamini desteği verilmesi ile in vivo olarak gözlenip gözlenmiyeceğini; gözlendiği takdirde bu etkinin düz kas hücrelerine çoğalma sinyalinin iletilmesinde bir kavşak enzim olan PKC'nin baskılanması üzerinden olup olmadığını in vivo bir model üzerinde araştırmayı amaçladık.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Ateroskleroz

Ateroskleroz, elastik ve musküler arterlerin duvarlarının kalınlaşarak lümenlerinin daralması ve arterin kanlandığı alanlara giden kan miktarının azalması ile seyreden bir hastalıktır. Aterosklerotik lezyonlar koroner, karotid, baziller ve vertebral arterler gibi musküler arterlerde, aorta, iliyak ve femoral arterler gibi elastik arterlerde ve daha seyrek farkedilse de kalp kapaklarında yama tarzında, fokal olarak bulunurlar. Farklı yapı ve yerlerdeki arterlerde görülen ve farklı klinik tablolara neden olabilen bu sürecin ortak mekânizması ise, endotel hücrelerinin zararlanması, endotel altı dokuların kan hücrelerine maruz kalması, monositlerin damar duvarına göçü ve burada makrofaj haline gelmeleri, arterlerin media tabakasındaki düz kas hücrelerinin intima tabakasına göç ederek burada çoğalmaları, makrofajların ve daha sonra düz kas hücrelerinin lipidleri fagosite ederek köpük hücreler oluşturmaları, en son evrede de bu lipidlerin miktarının hücrelerin temizleme kapasitesini aşması halinde lipidlerin hücreler arası matrikste birikmesidir. Tüm bu değişikliklerin içerisinde, lümenin tıkanmasına yol açması nedeni ile düz kas hücre proliferasyonu önemli bir yer tutar.

#### 2.1.1 Arter duvarının yapısı

Arter duvarı üç tabakadan oluşur: tunika intima, tunika media, tunika adventisya (1-3).

Tunika İntima: Arter lümenini döşeyen ve tek katlı yassı epitelden oluşan endotel hücre tabakası da dahil olmak üzere, damarın internal elastik laminaya dek uzanan iç tabakasına intima denir. “Tight junctionlar” ile birbirlerine bağlı endotel hücreleri ve altındaki bazal lamina arter duvarı ile kan arasında bir bariyer görevi görür.

İntima da iki tabakadan oluşur. Lümenin hemen altındaki iç tabaka, ince bir ağ yapısında non fibröz bir proteoglikan zemin maddesinden oluşur ve *proteoglikan tabaka* adını alır. Bu tabakada çok az sayıda elastik lif bulunur, düz kas hücreleri seyrek ve hem sentetik hem de kontraktıl fenotipte düz kas hücreleri bu tabakada bulunabilir. Endotel hücre tabakasının hemen altında az sayıda izole makrofajlar

bulunabilir. Bu tabakanın altında media'ya komşu olan ikinci tabakaya *muskuoelastik tabaka* denir. Bu tabakada düz kas hücreleri, kollagen ve elastik lifler çok daha yoğun olarak bulunurlar. Buradaki düz kas hücreleri kontraktil tiptedir ve birbirine yakın tabakalar halinde yerleşmişlerdir.

Tunika Media: İnternal elastik laminadan eksternal elastik laminaya dek uzanan tabakaya media denir. Media'da yalnızca düz kas hücreleri bulunur. Bu tabakanın kalınlığı her arterde değişiktir; küçük musküler arterlerde tek bir düz kas hücre tabakasından oluşabilirken, aorta gibi elastik arterlerde birbirlerinden elastik laminalar ile ayrılmış pek çok düz kas hücre tabakasının üstüste dizilmesi ile oluşabilir. Bu düz kas hücreleri birbirlerine "gap junction"lar ile bağlıdır ve etraflarını kollagen ve elastik lifler çevreler. Düz kas hücreleri arter duvarının bağ dokusunu oluşturan kollagen, elastin ve proteoglikanları da sentezler ve salgırlar.

Tunika Adventisya: Arterin en dış tabakasıdır. İç yüzeyinde eksternal elastik lamina ile media'ya komşudur. Bu tabaka gevşek bir şekilde örülmüş kollagen lifleri, elastik fiberler, düz kas hücreleri ve fibroblastlardan oluşmuştur. Damar duvarının dış tabakalarını besleyen "vasa vasorum" ve sinir uçları da bu tabakada bulunur.

### 2.1.2 Aterosklerozda arter duvarında görülen değişiklikler

Aterosklerotik lezyonlar, lezyonun evresine, bireyin maruz kaldığı risk faktörlerine, bu risk faktörlerine maruz kalma süresine ve arter yatağının yapısına göre lezyonu oluşturan bağ dokusu, hücre tipi, bunların göreceli miktarları ve lezyon içinde bulunan lipidlerin bileşimi açısından farklılıklar gösterir.

Stary (4-6) aterosklerotik lezyonları 5 karakteristik evrede sınıflandırmıştır:

Tip I lezyon - İzole makrofaj köpük hücreleri: Mikroskopik veya kimyasal olarak intimada lipid birikimlerinin ve bu birikimler ile ilgili hücrel reaksiyonların ilk kez gözleendiği evredir. En sık bebek ve çocuklarda gözlenir, ancak yetişkinlerde de bulunabilir. Tip I lezyonlar genellikle çıplak gözle görülmez. İntimada lipid damlacıkları içeren küçük ve izole makrofaj grupları (makrofaj köpük hücresi) oluşur. Bu kümeler genellikle adaptif, eksantrik intimal kalınlaşmanın görüldüğü bölgelerde

görülür. Düz kas hücrelerinde lipid damlacıkları görülmez, intimadaki düz kas hücrelerinin fenotip dağılımı aterosklerotik olmayan intimadaki gibidir.

Tip II lezyon - Yağlı çizgi: Tip II lezyon, arterlerin intimal yüzeyinde yama tarzında çıplak gözle görülebilen sarı-beyaz renkli yağlı çizgilerden oluşur. Ancak, tüm tip II lezyonlar çıplak gözle görülmeyebilir. Bu lezyonlar, makrofaj köpük hücrelerinin izole hücreler olarak değil, tabakalar oluşturacak şekilde birbiri üzerine sıralanması ile oluşur. İntimadaki düz kas hücrelerinde de makrofajlardaki gibi yağ damlacıkları gözlenir. Düz kas hücrelerinin her iki fenotipinde de bulunan “rough” endoplazma retikulumu (RER) miktarı artar, ancak düz kas hücrelerinin sayılarında bu aşamada bir artış gözlenmez. Ayrıca, lipid damlacığı içermeyen makrofaj sayısı da tip I lezyona kıyasla artmıştır. Tip II lezyonda dokuda bulunan lipidlerin çoğu hücre içerisinde, bunların çoğunluğu da makrofajlar içerisinde. Steinberg’in (7) 1991’de lezyonların lipid bileşimini araştıran çalışmasında bu tip lezyon içerisindeki lipidlerin primer olarak kolesterol esterlerinden (% 77), kolesterol ve fosfolipidlerden oluştuğu gösterilmiştir.

Tip I ve tip II lezyon, erken lezyon olarak kabul edilirler. İntima organizasyonundaki bozulma minimaldir ve lipid düzeyleri düşünce geriler.

Tip III lezyon - Ara lezyon: Preateroma olarak da bilinir. Morfolojik ve kimyasal olarak tip II ile, tip IV olarak sınıflandırılan ateroma arasında bulunan lezyonlardır. Tip II’deki hücresel lezyonlara ek olarak, mikroskopik olarak gözlenebilen ve bazen düz kas hücre tabakaları arasında birikintiler oluşturabilecek miktarlarda lipid damlacıkları hücreler arası boşlukta görülür. Lipid birikintileri, makrofaj ve makrofaj köpük hücre tabakalarının altında yer alır ve düz kas hücrelerini birbirinden ayırır. İntimal düz kas hücrelerinde de lipid damlacıkları görülebilir. Bu aşamada büyük bir lipid kütlesi (lipid çekirdeği) henüz oluşmamıştır.

Tip IV lezyon - Ateroma: İntimadaki yapısal elemanları aralayarak organizasyon bozukluğu ve arteriyel deformatelere neden olan hücreler arası bir lipid çekirdeği kütlesinin varlığı en belirgin kriterdir. Lipid çekirdeği, tip III lezyondaki izole lipid adacıklarının birleşerek devamlılık kazanması ile oluşur. Yapısal bozulma tip III lezyona göre çok daha fazladır. Lipid çekirdeğin ortasında düz kas hücreleri

bulunabilir, proteoglikan tabakadaki düz kas hücreleri RER'den zengindir ve lipid damlacıkları içerirler. Bu evrede lipid çekirdeğin üzerindeki proteoglikan tabaka henüz kollagenöz (fibröz) bir şapka haline gelmemiştir. Ateroma, düz kas hücreleri ve kollagen artışı henüz minimal olan dokudaki yapıyı bozucu bir lipid birikimidir. Lipid birikiminin oluşturduğu kalınlık genellikle lümeni tıkayacak kadar değildir.

Tip V lezyon - Fibroateroma: Fibroateromanın ateromadan farkı, lezyonun üzerinde değişen miktarlardaki kollagen içinde RER'den çok zenginleşmiş düz kas hücrelerinden oluşan bir fibröz şapkanın bulunmasıdır. Bu hücreler, lipid çekirdeğin üzerinde bulunan köpük hücre tabakasının çevresinde paralel tabakalar oluştururlar. Bazen şapkanın önemli bir hacmini kollagen oluşturur. Bu lezyon obstrüktif ve klinik olarak semptomatik olma özelliğini düz kas hücreleri ve kollagen miktarındaki artıştan alır. Bu fibröz plaklar nekroz, kalsifikasyon, fissür, ülserasyon ve trombotik olaylar gibi komplikasyonlara neden olabilir.

### 2.1.3 Aterosklerozun patogenezi ile ilgili teoriler

Aterosklerozun patogenezi ile ilgili ileri sürülen ve bugün en çok kabul gören teoriler arasında lipid peroksidasyon hipotezi (8), düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidatif modifikasyon hipotezi (9), monoklonal ve antioksidan hipotez bulunur (10). 1986 yılında ise Ross (11,12), 'zararlanmaya yanıt' hipotezini ortaya atmıştır.

Bugün yaygın kabul gören bu hipotez, çeşitli sitokinlerin, yüksek düzeydeki kolesterolün veya mekanik travmanın endotel hücrelerinde trombojenik olmayan bir yüzey oluşturma, bütünlüğü bozulmamış bir permeabilite bariyeri oluşturma, damar tonusunun sağlanması, çeşitli sitokinlerin yapımı, bazal membranın idamesi, endotel tabakasını kat etmekte olan lipoproteinleri modifiye edebilme gibi işlevlerinin bir veya daha fazlasında -zararlanma veya aktivasyon şeklinde- değişikliklere yol açtığını ve bunun aterosklerotik lezyonların oluşumuna dek süren çeşitli otokrin, parakrin ve hücreler arası etkileşimlere neden olduğunu kabul eder. Endotel hücre işlev bozukluğu, lipoproteinlerin damar duvarı tarafından tutulmasında bir artışa, endotel yüzeyinde özgün adheziv glikoproteinlerin belirmesine, çeşitli sitokinlerin veya büyüme faktörlerinin salgılanmasına neden olabilir. Endotel zararlanmasına yol açan

olaylar başlangıçta endotel tabakasının soyulmasına yol açmayabilir; dahası, ilk lezyonlar endotelin morfolojik olarak bütünlüğünü koruduğu bölgelerde görülür (12). İşlevleri bozulan endotel hücrelerinin üzerlerine yapışan lökositler ve altlarındaki düz kas hücreleri tarafından salgılanan kemoatraktan ve büyümeyi düzenleyen moleküllerin etkisi ile, monositler ve T lenfositler endotel yüzeyine yapışır ve endotel hücrelerinin arasından intimaya göç ederler (13). Bu süreç devam ederse monositler endotel tabakasının altında makrofaj haline gelirler. Aterosklerotik sürecin erken evrelerinde medial düz kas hücreleri de intimaya göç ederek hem çoğalırlar hem de yeni hücreler arası matriks sentezleyerek aterosklerotik süreçteki en önemli olaylardan birisi olan intimal kalınlaşmaya neden olurlar. Makrofajlar, ve daha sonra da düz kas hücreleri, endotel tarafından artmış miktarlarda alınan lipoproteinleri çöpçü reseptörler aracılığı ile alarak köpük hücre haline gelirler. Bu köpük hücrelerinin ve eşlik eden lenfositlerin birleşmesi ile yağlı çizgi olarak adlandırılan lezyon oluşur (5). Düz kas hücre tabakaları, lipid dolu makrofajlar ve hücreler arası boşlukta biriken lipid damlacıklarının üstüste birikmesi ile aterosklerotik lezyonlar ilerler. Hücre göçünün ve çoğalmasının devam etmesi, lezyonların ilerleyerek fibröz bir karakter kazanmasına neden olur. Yer yer endotel hücre tabakasında çekilmeler olur ve altta yatan lipid dolu makrofajlar ve düz kas hücreleri lümene ekspozе olarak trombositlerin bağlanmasını sağlarlar ve bir mural trombus için çekirdek oluştururlar (11). Bu yüzden, aterosklerotik süreçte düz kas hücreleri endotel hücrelerinden salınan maddelerin, açığa çıkan endotel altı dokuya yapışan trombositlerin, makrofajların, T lenfositlerin ve kan bileşenlerinin etkisi altındadır.

Tıkayıcı aterosklerotik lezyonların oluşumunda üç ana mekanizmanın rol oynadığı kabul edilmektedir (4,14):

1. düz kas hücreleri, makrofajlar ve muhtemelen lenfositlerin intimaya göç ederek çoğalmaları,
2. düz kas hücreleri tarafından elastik lifler, kollagen ve proteoglikanlardan oluşan bir bağ dokusu matriksi yapımı,
3. ilgili hücreler ve çevreleyen matriks içerisinde lipid ve çoğu serbest, bir kısmı esterleşmiş kolesterolün birikmesi.

#### 2.1.4 Hiperkolesterolemiye arter duvarının yanıtı

Çoğu dokuda olduğu gibi arter duvarı da dolaşımdan lipoproteinler de dahil olmak üzere bazı moleküllerin geçişine uğrar. Bu lipoproteinlerin bir kısmı oradaki hücrelerin (endotel ve düz kas hücreleri) gereksinimleri için kullanılırlar, çoğu ise damar duvarını lenfatikler ile terk ederler ve dolaşıma katılırlar. Hiperkolesterolemi ve eşlik eden yüksek LDL düzeyi ise, ateroskleroz ve kalp damar hastalıklarının en önemli risk faktörlerinden birisidir.

Tavşan, domuz ve bazı maymun türlerinde kolesterolden zenginleştirilmiş diet ile insanlarda gözlenen ateroskleroz plaklarına benzer lezyonlar oluşturmak mümkündür. Kolesterol ile besleme, aynı endotel zararlanması gibi damar duvarında bazı metabolik değişikliklere neden olmaktadır. Deneysel olarak hiperkolesterolemik yapılan hayvanlarda arterlerin intimasında görülen ilk değişiklik, endotel tabakasının geçirgenliğinin artması sonucunda lipid damlacıklarının ve makrofajların birikerek köpük hücreleri oluşturmasıdır (15-17). Doku, oldukça aterojenik olan masif bir  $\beta$ -lipoprotein kütesine maruz kalınca lipoproteinler hücreler arası matriks tarafından da tutulmaya başlanır. Öte yandan, kemoatraktan maddeler yapışmış olan lenfosit ve monositler endotel altı bölgelere yönlendirilmiş göçe uğrarlar ve burada monositler makrofaj haline gelir ve dokuyu lipoproteinlerden temizlemeye çalışır. LDL reseptör aktivitesi hücre içi kolesterol düzeyleri ile ters orantılı olarak değişir, ancak okside LDL, LDL reseptöründen bağımsız yollar -çöpçü reseptörler- aracılığı ile alınmaya başlar ve hücre içi kolesterol birikimi ve köpük hücre oluşumu artar. Makrofajlar -bir kısmı modifiye veya okside olmuş- lipoprotein partiküllerini alarak köpük hücre haline gelirler. Makrofajlardaki çöpçü reseptörlerin sayısı -LDL reseptöründe olduğu gibi- yüksek kolesterol düzeylerine yanıt olarak azaltılmaz (18). “Watanabe Heritable Hyperlipidemic” (WHHL) tavşanlarda çöpçü reseptörler için yarışmalı inhibitörler kullanılarak okside LDL’in çöpçü reseptörlere bağlanması engellenmiş ve aortada kolesterol birikimi ve aterosklerozun ilerlemesi önlenmiştir (19). Hücreler arası matrikste kollagen ve glikozaminoglikan miktarı artar, sentetik organellerinin sayısı artmış düz kas hücreleri belirir ve bu hücrelerde bulunan bazı enzimlerin aktivitelerinde de değişiklikler gözlenir (20). Tavşan aortik düz kas hücreleri ile



yapılan çalışmalar, sentetik fenotipe modülasyonun apo B/E reseptörü üzerinden artmış LDL ve çok düşük dansiteli lipoproteinlerin (VLDL) bağlanması ile ilişkili olduğunu göstermiştir (21). Okside LDL makrofajlardan ve endotel hücrelerinden damar düz kas hücreleri için mitojenik olan sitokinlerin salgılanmasını uyardığıdır (22). Ayrıca, nativ ve malonildialdehid ile modifiye edilmiş LDL'in sıçan aortik düz kas hücrelerinin proliferasyonunu uyardıkları in vitro olarak gösterilmiştir (23).

Okside olmuş LDL'nin endotel tabakasının zararlanmasında önemli bir rolü vardır. LDL'in nasıl okside olduğu tam olarak bilinmese de, lipid peroksidasyonu LDL'in üzerindeki en azından çok doymamış yağ asitlerini ve apolipoprotein B'yi (apo B) modifiye eder. Endotel tarafından oluşturulan okside LDL, endotele direk olarak zarar verebilir, monositlerin ve T lenfositlerin yapışmasının ve göçünün artmasına neden olabilir (7). Yapılan in vitro çalışmalarda modifiye LDL'in endotel üzerindeki sitotoksik etkilerinin kültür ortamına antioksidanlar eklenmesi ile giderildiği gösterilmiştir (24). LDL'deki apo B'nin glikozaminoglikanların sülfat grupları ile etkileşmesi, LDL'nin intimada tutulması için bir mekanizma olabilir; aterosklerotik süreç ilerlerken damar duvarı bağ dokusundaki hyaluronik asit azalırken sülfatlı glikozaminoglikanlar artar (25).

Hiperkolesterolemide ise, nativ veya modifiye olmuş  $\beta$ -lipoproteinler (LDL ve VLDL) hepatik sinüzoidal hücreler ve endotel tabakası tarafından tutulur ve yıkılırlar. LDL'deki enzimatik veya non-enzimatik değişiklikler (asialasyon, glikolizasyon, peroksidasyon) makrofajlar tarafından tutulma oranını belirgin bir şekilde artırır (22).

## **2.2 Düz kas hücreleri ve ateroskleroz**

### **2.2.1 Arter duvarında bulunan düz kas hücre fenotipleri**

Düz kas hücreleri, memeli arterlerinin mediasında bulunan tek hücre tipidir; bu yüzden kasılma - gevşeme ile damarın gerilimini korumaktan hücreler arası matriksi üretme ve salgılamaya dek bir dizi işlev üstlenmiştir. Bu işlevleri yerine getirebilmek için düz kas hücreleri bir dizi değişik fenotip sergileyebilirler (26). Bu fenotipler yelpazesinin bir ucunda bütün görevi sentezlemek ve çoğalmak olan düz kas hücresi vardır; bu

hücreler morfolojik olarak fibroblastlara benzerler; 'sentetik' hücrelerin sitoplazmasında yaygın bir RER, belirgin bir Golgi kompleksi ve serbest ribozomlar bulunurken az sayıda miyofilaman içerirler. Bu hücreler daha çok embriyo ve gelişen genç organizmada bulunurlar ve damar duvarının oluşmasında rol alırlar. Bu hücreler çoğalırlar ve kollagen ve elastin gibi hücreler arası matriks bileşenlerini sentezlerler. Organizmanın büyüme ve gelişmesi sırasında bu hücrelerin sentetik organel içeriği azalır ve miyofilamanlar sitoplazmanın gittikçe artan bir hacmini kaplarlar. Aynı zamanda hücrelerin miyozin ve tropomiyozin içeriğinde belirgin bir yükselme olur. Bu değişiklikler de sentezleme ve çoğalma kapasitesindeki bir düşüşü getirirken bunun yerine hücrede kasılma yetisi gelişir.

Yelpazenin diğer ucunda ise bütün görevi yalnızca kasılmak olan düz kas hücresi vardır. Yetişkinlerin damarlarında yaygın olarak bulunan bu 'kontraktıl' hücrenin sitoplazması hemen tamamen miyofilamanlar ile doludur, RER, Golgi ve serbest ribozomlar gibi diğer organeller ise az sayıda bulunur. Arterlerin enine kesitlerinin incelenmesi ile bu hücrelerin katmanlar oluşturan halkalar halinde düzenlendikleri görülür. Her hücre kollagen tip IV, laminin, entaktin ve heparan sülfat proteoglikanlarından oluşan bir bazal membran ile çevrilidir (27). Bu hücreler kimyasal ve mekanik uyarana kasılarak yanıt verirler ve kan basıncını ve akımını düzenlemede rol alırlar. Bu hücreler sentetik fenotipe dönme yeteneğine sahiptirler ve bu fenotip modülasyonu aterogenezin başlangıcındaki önemli olaylardan birisidir (26).

Yetişkinlerin arterlerinde normalde hücrelerin çoğu kontraktıl tipte bulunsalar da, arter duvarı canlı ve dinamik bir doku olduğu için yelpazenin herhangi bir noktasındaki bir hücre fenotipi ile karşılaşmak mümkündür. Düz kas hücreleri değişen gereksinimlere göre de fenotiplerini değiştirebilirler (28). Her ne kadar hem vasküler hem de visseral düz kas hücrelerinin kontraktıl iken de bölünme yeteneğinde oldukları gösterilmişse de (29), mitozda gözlenen düz kas hücrelerinin geniş bir çoğunluğu en azından kısmen sentetik bir fenotipe doğru modüle edilmişlerdir (26). Bu yüzden düz kas hücre proliferasyonu için kontraktilden sentetik fenotipe doğru modülasyonun bir gereklilik olduğu görülmektedir. Bu modülasyonun karakteristik özellikleri bilinmemektedir; düz kas hücreleri kalın filamanlarını kaybederler, miyozin immünolojik olarak



saptanamayacak kadar azalır, kontraktil filamanlarını kaybettikleri için hücreler kasılma yeteneklerini kaybederler, sentetik organellerinde yeniden bir artış olur (30). Arteriyel düz kas hücrelerinin sentetik bir fenotip sergilemelerinin önemi, bu hücrelerin çoğalarak intimal kalınlaşmaya neden olabilmelerindedir. Bu fenotip modülasyonundan sonra hem düz kas hücresi göçünün hem de çoğalma hızının arttığı gösterilmiştir (20,26). Sıçan aortası düz kas hücrelerinin PDGF-benzeri bir mitojeni salgulamalarının da bu fenotip modülasyonuna bağlı olduğu in vitro olarak gösterilmiştir (31). Kontraktil hücreler ile karşılaştırılınca, sentetik tip hücreler tarafından kollagenin yapısına eklenen [<sup>3</sup>H] prolin miktarında 4 kat artış olduğu gösterilmiştir (20).

Endotel zararlanmasından sonra, eğer zararlanan alan yeterli büyüklükte ise, media'daki düz kas hücreleri intimaya göç ederek çoğalırlar ve elastik liflere dik olarak yerleşmiş düz kas hücrelerinden oluşan yeni bir intima oluştururlar. Endotel zararlanmasından üç hafta sonra bu hücrelerin çok miktarda RER ve serbest ribozom içerdikleri görülmüştür. Düz kas hücrelerinin üstünü örten endotel tabakasının yeniden oluşmasından sonra, yeni intimadaki düz kas hücrelerinin sentetik organellerinde bir azalma, miyofilaman içeriğinde ve timidin indekslerinde ise normale dönüş olduğu gözlenmiştir (32,33).

### 2.2.2 Düz kas hücre çoğalmasını sağlayan sinyaller

Düz kas hücrelerinin çoğalması; ateroskleroz, hipertansiyon ve restenoz gibi patolojik süreçlerdeki anahtar olaylardan birisidir. Düz kas hücrelerinin çoğalması üç kaynaktan kontrol edilebilir;

1. kan hücrelerinden salınan büyüme faktörleri ile,
2. damar duvarından salınan inhibitörler ile,
3. damar duvarındaki hücrelerin kendileri tarafından salgılanan büyüme faktörleri ile kontrol edilebilir.

Damar duvarındaki aterosklerotik lezyonlarda PDGF, “basic fibroblast growth factor” (bFGF), “insulin-like growth factor-1” (IGF-1), “epidermal growth factor” (EGF),

“heparin binding EGF-like growth factor” (HB-EGF) ve “transforming growth factor- $\alpha$  ve - $\beta$  (TGF- $\alpha$  ve - $\beta$ ) gibi pek çok büyüme faktörü izole edilmiştir ancak bunların etkileri kendilerine ait reseptörleri taşıyan hücreler ile sınırlıdır. Damar düz kas hücreleri EGF ve FGF reseptörleri taşırlar ve her ikisine de mitojenik olarak yanıt verirler. Düz kas hücrelerinin çoğalmasını sağlayabilen büyüme faktörleri ve sitokinler (PDGF, IGF, IL-1, TNF- $\alpha$ ) normal arterlerde bulunmaz, ancak zararlanmadan sonra veya aterosklerotik süreçte ekspresyonları son derece artar. Bunlardan en çok ilgi toplayan ikisi IL-1 $\beta$  ve PDGF’dir (34,35). Daha sonra IL-1 $\beta$ ’nin etkisinin direk bir etki olmayıp, PDGF-AA’nın indüksiyonu ve salınımı üzerinden olduğu gösterilmiştir (36).

Transforme olmamış düz kas hücreleri kültür ortamında serum yokluğunda çoğalmazlar. Ross ve beraberindekiler (37,38), serumdaki çoğalmayı sağlayan aktif bileşenin trombosit kaynaklı PDGF olduğunu göstermişlerdir. PDGF, düz kas hücrelerinin göç etmesini ve çoğalmasını sağlayan en önemli faktördür. Trombositlerden salınır, serumda bulunur. Bunun dışında parakrin ve otokrin salgılarda da bulunur. PDGF, A ve B zincirlerinden oluşan bir dimerdir (AA, AB, BB). Değişik PDGF izoformları en az iki ayrı yüksek affiniteli reseptöre - $\alpha$  ve - $\beta$  bağlanarak hedef hücre üzerindeki etkilerini gösterirler (39). Düz kas hücrelerinde PDGF’nin yalnızca A zinciri eksprese edilmekte ve PDGF-AA homodimerleri sentezlenmektedir. Endotel ve makrofaj hücrelerinde ise B zinciri eksprese edilir.

PDGF reseptörünün intrinsik bir protein kinaz aktivitesi olduğu gösterilmiştir (40-42). Ligandın reseptöre bağlanması, reseptörün hücre içindeki bir bölgede bir tirozin kalıntısının otofosforilasyonuna, fosfoinozid hidrolizine, hücre içi iyon, pH ve kalsiyum değişikliklerine neden olur (43,44). Bu sinyal ileti kaskadının aktive olması sonucunda Aktivatör Protein-1 (AP-1) ve Nükleer Faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri aktive olur, belirli genlerin ekspresyonunda değişiklikler görülür ve DNA replikasyonu ve hücre bölünmesine yol açan karmaşık bir dizi biyolojik yanıt gerçekleşir (45). Serumsuz bırakılan düz kas hücrelerinin PDGF’e yanıt olarak hücre döngüsüne girdikleri, DNA’larını replike ettikleri ve

bölündükleri gösterilmiştir.

Damar düz kas hücreleri, özgün PDGF reseptörüne sahip olduğu gösterilen ilk hücre tiplerinden birisidir (46). PDGF mezenkimal orijinli tüm hücrelerde (fibroblast, düz kas hücreleri, glial hücreler) etkilidir, ancak epitel hücreleri ve hematopoietik hücreler üzerinde reseptörleri bulunmaz (42). PDGF, düz kas hücrelerinin yönlendirilmiş göçü, çoğalması, LDL alımlarının artması, matriks proteinlerinin sentezi ve vazokonstriksiyon gibi farklı düzeylerde hücrel değişikliklere neden olabilir (47).

PDGF'nin damar düz kas hücrelerinin göçünü ve çoğalmasını uyardığı ve PDGF'e karşı üretilen antikorların yeni intimal düz kas hücre birikimini baskıladığı gösterilmiştir (35). Sıçan damar düz kas hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda PDGF-BB'e ilk yanıt olan PDGF reseptörünün otofosforilasyonunu fosfolipaz C'nin tirozin-fosforilasyonunun izlediği gösterilmiştir. Bunlar hücrel çoğalma ile ilgili sinyal iletisindeki anahtar reaksiyonlardır. Pek çok çalışmada düz kas hücreleri için güçlü bir kemoatraktan ve mitojen olan PDGF-B zincirinin aterosklerotik lezyonların tüm evrelerinde arttığı gösterilmiştir (47). PDGF-B zincirine özgün olan PDGF  $\beta$ -reseptör altbirimi de gelişen lezyonlarda yüksek bulunmuştur.

## **2.3 Protein kinaz C**

### **2.3.1 Protein kinaz C'nin yapısal özellikleri**

Protein kinazlar, bir fosfat vericisinden bir fosfat alarak substrat proteinin alıcı amino asidine aktaran enzimlerdir. Fosfat vericisi sıklıkla ATP'dir. Kinazların çoğunun birden fazla substratı bulunabilir; bu yüzden substrat proteinin özgüllüğüne değil, alıcı amino asitlerin özgüllüğüne göre sınıflandırılırlar.

Protein kinaz C (PKC, EC 2.7.1.37) çok yaygın bir substrat özgüllüğü olan bir serin/treonin kinazdır (48). Düz kas da dahil olmak üzere pek çok dokuda bulunur. Düz kastaki enzimin molekül ağırlığı yaklaşık 80 kDa'dur ve bir monomer olarak bulunur. Enzimatik ve klonlama çalışmaları PKC'nin hem farklı genler tarafından kodlanan hem de tek bir RNA transkriptinin farklı kesilmesi ile elde edilebilen en az

12 izoenzimden oluşan bir aile olduğunu göstermiştir (49,50). Bunlar üç ana grup içerisinde;  $Ca^{2+}$ 'a duyarlı olan konvansiyonel PKC'ler [conventional PKC, cPKC] (PKC  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$ ),  $Ca^{2+}$ 'a duyarlı olmayan yeni PKC'ler [novel PKC; nPKC] (PKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\eta$ , L) ve atipik PKC'ler [aPKC] (PKC  $\zeta$ ,  $\lambda$ ,  $\iota$   $\mu$ ) olarak sınıflandırılırlar.

Bu izoenzimler farklı hücre tiplerinde ve hücre içinde farklı lokalizasyonlarda bulunabilir (51). Beyinde tüm PKC izoformları bulunurken diğer dokularda daha kısıtlı bir dağılım gözlenir. Genelde bir hücre tipinde farklı PKC izoenzimleri bulunur. Çeşitli hücre tiplerinde bir veya daha fazla PKC izoformunun bulunması, belirli PKC izoformlarının farklı hücre içi yolları aktive edebileceği ve değişik substratları fosforilleyebileceğini düşündürmektedir. Bu da farklı hücre tiplerinde PKC'nin aktive edilmesi ile gözlenebilen farklı yanıtları açıklayabilir. PKC izoformlarının biyolojik rolleri henüz tam olarak anlaşılamamıştır. PKC izoformlarının düz kas hücrelerinin farklılaşma düzeyine göre de değişiklik gösterebileceği bildirilmiştir (52).

PKC'lerin primer yapısında değişkenlik gösteren ve yüksek oranda dizin homolojisi gösteren iyi korunmuş bölgeler ve değişkenlik gösteren bölgeler bulunur.  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$  türlerinde dört tane iyi korunmuş bölge ( $C_1$ - $C_4$ ), ve beş değişken bölge görülür ( $V_1$ - $V_5$ ) (53). nPKC ve aPKC'lerde ise  $C_2$  bölgesi bulunmaz. Her polipeptidin  $C_1$  ve  $C_2$ 'yi içeren N ucunda,  $Ca^{2+}$ , fosfolipid ve diasilgliserol veya forbol esterleri ile etkileşen düzenleyici bölge bulunur. C ucu ise,  $C_3$  ve  $C_4$ 'den oluşan katalitik bölgeyi oluşturur.

Düzenleyici bölge ( $C_1$  ve  $C_2$ ):  $\zeta$ ,  $\lambda$  ve  $\iota$  hariç tüm izoformların  $C_1$  bölgesinde, "cysteine-zinc DNA binding finger" dizinine benzeyen iki tane sisteinden zengin bölge bulunmaktadır (54).  $C_2$  bölgesinin ise  $Ca^{2+}$  bağlanmasında rol aldığı düşünülmektedir.

$C_1$  bölgesinde, PKC substratlarındaki fosforile edilebilen serin veya treonin bölgelerinde görülen korunmuş dizinlere benzeyen bir dizin bulunur (konvansiyonel PKC'lerde RKGALRQK), ancak fosforile olabilecek serin veya treonin kalıntıları içermez (55). Bu bölgeye psödosubstrat bölgesi denir ve PKC'nin aktivitesinin düzenlenmesinde rol alır. Kofaktörlerin yokluğunda bu bölge aktif merkeze bağlanarak enzimin substratlar ile etkileşmesini engeller.  $Ca^{2+}$ , fosfolipid ve

diasilgliserolün bağlanması ise konformasyonel bir değişikliğe neden olur ve psödosubstrat bölgesi aktif merkezden ayrılarak substratın bağlanabilmesine ve olanak tanır (56). Bu bölgenin proteolitik olarak ayrılması, geride kalan PKC'nin aktive olması ile sonuçlanır.

PKC izoenzimleri arasında korunmamış olan düzenleyici bölgedeki V<sub>1</sub> bölgesinin substrat özgünlüğü üzerinde bir rolü olduğu düşünülmektedir.

Katalitik bölge (C<sub>3</sub> ve C<sub>4</sub>): C<sub>3</sub> ve C<sub>4</sub> bölgelerini içeren karboksil ucunun protein kinaz aktivitesi içeren bölge olduğu düşünülmektedir (41). Bu bölge, diğer protein kinazlar ile de yüksek oranda dizin homolojisi göstermektedir. C<sub>3</sub> ve C<sub>4</sub> bölgelerinde birer ATP bağlama bölgesi bulunur; C<sub>3</sub>'deki bu bölgenin çıkarılması ise kinaz aktivitesi olmayan bir proteinin oluşmasına neden olur.

### 2.3.2 Protein kinaz C'nin düz kas hücre çoğalmasındaki rolü

Çok geniş bir yelpazedeki hücre dışı sinyaller (peptid hormonlar, büyüme faktörleri, nörotransmitterler), hedef hücrenin membranında yer alan özgün reseptörlerine bağlanırlar. Bu reseptörlerin aktivasyonu, hücre içinde ikinci ulakların oluşmasına yol açar. Bu ikinci ulaklar da çeşitli kinaz ve fosfatazları aktive ederler. Sinyal iletisi sırasında çeşitli kinaz ve fosfatazların aktivasyonu ise, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gibi belirli metabolik değişikliklere neden olur. Protein kinaz ve fosfatazlar, bu işlevleri ile hücrelerin metabolik işlevlerinin ve uyarılara verilen yanıtın kontrolünde önemli bir rol oynarlar.

Mitojenik bir uyarının hücre içinde iletilmesinde rol alan üç ana sinyal iletisi yolu bilinmektedir: tirozin kinaz aktivitesi gösteren transmembran reseptörlerin fosforilasyonu, siklik AMP (cAMP) bağımlı sinyal iletisi ve Ca<sup>2+</sup> ve fosfoinozitid metabolitlerinin rol aldığı sinyal iletisi yolu.

Hücre dışı sinyallerin bir kısmı (peptid hormonlar, büyüme faktörleri, nörotransmitterler), hedef hücrenin hücre zarında yer alan ve G proteinleri aracılığı ile fosfoinozitide özgü fosfolipaz C (PI-PLC) ile ilişkide olan özgün reseptörlerine bağlanırlar (48). Reseptörün liganda bağlanması PI-PLC'nin aktivasyonuna bu da

zardaki fosfatidilinozitol 4,5-difosfatın (PIP<sub>2</sub>) hidrolizine ve hücre içi ikinci ulak olan inozitol 1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) ve 1,2-diasilgliserol (DAG) oluşmasına yol açar. Suda çözünebilen bir metabolit olan IP<sub>3</sub> sitozol içerisinde dağılarak endoplazma retikulumu (düz kas hücrelerinde sarkoplazma retikulumu) üzerinde yer alan IP<sub>3</sub> reseptörüne bağlanır. Bir Ca<sup>2+</sup> kanalı olan reseptör açılır ve endoplazma retikulumu içindeki Ca<sup>2+</sup>, konsantrasyon gradyanı -yaklaşık 10<sup>4</sup> kat- uyarınca sitozole geçer (57). Lipofilik olan DAG ise zar üzerinde kalır ve PKC'nin aktivasyonunda rol alır.

PKC hücre zarı içerisindeki lipidler ile ilişkiye geçince aktive olmaktadır (41). Zar fosfolipidlerinden fosfatidilserin (PS) PKC aktivasyonundaki esansiyel kofaktörlerden birisidir. İlk aşamada enzim/Ca<sup>2+</sup>/fosfolipid üçlü kompleksinin oluştuğu, daha sonra DAG bağlanması ile enzimin aktive olduğu ileri sürülmüştür. Bu aktivasyon proteindeki bir konformasyon değişikliğine ve/veya fosfatazların enzime etki edememesine bağlı olabilir. PKC'nin fosfolipidlerin varlığında DAG ile aktivasyonu, tüm PKC izoformlarının ortak özelliğidir. DAG veya forbol esterleri ile PKC'nin etkileşmesi, enzimin sitozolden membrana translokasyonuna neden olmaktadır. Pek çok araştırmacı, çeşitli hücre tiplerinde uygun uyarılma sonucunda PKC'nin sitozolden hücre zarına transloke olduğunu göstermişlerdir. Böylece enzim, kofaktörlerin ulaşılabilir bir hale gelmesi ile de inaktif durumdan aktif bir duruma geçmektedir. Diasilgliserol enzimin Ca<sup>2+</sup> a olan affinitesini artırarak Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonunda net bir artış olmadan enzimin aktive olabilmesini sağlar. PKC, tümör oluşturan forbol esterlerinin hücre içindeki reseptörüdür. Forbol esterleri de, diasilgliserol gibi enzimin Ca<sup>2+</sup> a olan affinitesini artırarak fizyolojik Ca<sup>2+</sup> konsantrasyonlarında tamamen aktive olmasını sağlarlar. PKC, "calpain" ile kısıtlı bir proteoliz ile de aktive edilebilir. Oluşan parçalardan daha küçük olanı Ca<sup>2+</sup>, fosfolipid veya diasilgliserolden bağımsız olarak aktiftir.

PKC'nin uyarı-yanıt eşleşmesinde rol aldığı ilk kez trombositlerden serotonin salınması için gösterilmiştir (41). Daha sonra pek çok hücre sel bileşenin salınması, eksositoz, iyon geçişinin düzenlenmesi, reseptör ile sinyal ileti sisteminin etkileşiminin düzenlenmesi, düz kas kasılması, gen ekspresyonu ve hücre çoğalması gibi pek çok metabolik işlevde rol aldığı gösterilmiştir (58). Damar düz kas hücrelerinin PDGF ile



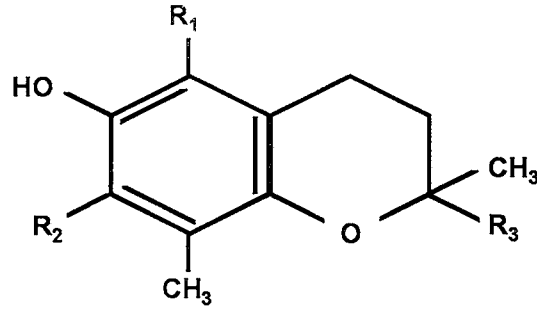
uyarılan proliferasyonunda PKC'nin rol aldığı hücre kültürlerinde gösterilmiştir (59). Kültür ortamına bir protein kinaz C inhibitörü olan "Staurosporin" veya "calphostin" eklenmesi, düz kas hücrelerinin serum ile uyarılan proliferasyonunu baskılamıştır (60,61).

PKC'nin aktivasyonu ise hücre içi haberleşmede, mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAP kinase) aktivitesinin uyarılması (62), transkripsiyonel ve translasyonel mekanizmadaki AP-1, NF- $\kappa$ B ve diğer bileşenlerin fosforilasyonu (45,63) gibi bir dizi olaylar zincirini başlatır. Bu olaylar ilk sinyalin amplifikasyonuna neden olacak ve hem transkripsiyonel hem de translasyonel düzeyde gen ekspresyonunu değiştirecektir. Düz kas hücrelerinin proliferasyonunu sağlayan sinyal ileti kaskadında da PKC'nin önemli bir ara eleman olduğu, hücre proliferasyonunun baskılandığı durumlarda PKC'nin de inhibe olduğu gösterilmiştir (50,64). Hücrelerin proliferasyonu sırasında erken dönemde gözlenen olaylardan birisi olan AP-1'in DNA'ya bağlanmasının aktivasyonu, düz kas hücrelerinde aynı zamanda PKC'nin aktivatörü olan forbol miristat asetat (PMA) tarafından aktive edilebilmektedir (64).

## 2.4 E vitamini ve ateroskleroz

E vitamini,  $\alpha$ -tokoferolün biyolojik aktivitesine sahip olan tüm bileşiklere verilen jenerik bir isimdir. Bitkisel yağlarda bulunan doğal tokoferol ve tokotrienollerin vücutta sentezlenemedikleri için diet ile alınmak zorunda oldukları ve beslenmede esansiyel bir rolü olduğu bilinmektedir. Doğada vitamin E aktivitesi gösteren 8 bileşik bulunmaktadır: d- $\alpha$ , d- $\beta$ , d- $\gamma$ , ve d- $\delta$  tokoferol ve d- $\alpha$ , d- $\beta$ , d- $\gamma$ , ve d- $\delta$  tokotrienol. Hepsi de 6-hidroksikroman halkasına izoprenoid takılar takılmış bileşiklerdir (Şekil 1).

Doğal izoformların asetat ve süksinat türevleri ve sentetik tokoferollerin asetat ve süksinat türevleri farklı güçlerde vitamin E aktivitesi gösterirler. Bunların içerisinde d- $\alpha$  tokoferol en yüksek biyolojik aktiviteye sahiptir ve diğerlerinin aktivitesi de  $\alpha$ -tokoferol ile karşılaştırılarak kıyaslanır.



|                    | R <sub>1</sub>   | R <sub>2</sub>   | R <sub>3</sub>   |
|--------------------|------------------|------------------|--|
| <b>α-tokoferol</b> | -CH <sub>3</sub> | -CH <sub>3</sub> | -(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub><br> <br>CH <sub>3</sub> |
| <b>β-tokoferol</b> | -CH <sub>3</sub> | -H               | -(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub><br> <br>CH <sub>3</sub> |
| <b>γ-tokoferol</b> | -H               | -CH <sub>3</sub> | -(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub><br> <br>CH <sub>3</sub> |
| <b>δ-tokoferol</b> | -H               | -H               | -(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub><br> <br>CH <sub>3</sub> |

**Şekil 1:** E vitamininin kroman halkası ve α, β, γ, ve δ tokoferol izomerlerinin takıları

Diet tipi ve içeriği kalp damar hastalıkları riskinin önemli bir belirleyicisidir. Dietle alınan besin maddelerinden çok doymamış ve tek doymamış yağ asitlerinden zengin bitkisel besinler, Selenyum gibi eser elementler ve A vitamini (peroksi ve “thiyl” radikalleri tutucusu), C vitamini (suda çözünen ana radikal tutucu), karotenoidler (“singlet oxygen quencher”) ve E vitamini (d-α-tokoferol; yağda çözünen zincir kırıcı radikal tutucu) bu riski azaltan en önemli maddelerdendir (10). Yağda çözünen bir bileşik olan E vitamini, hücre zarları arasındaki yağ moleküllerinin arasında ve dolaşımdaki düşük dansiteli lipoproteinlerin dış fosfolipid tabakası üzerinde bulunur, ve burada normal metabolizma sırasında oluşan radikalleri tutar (65). Bu yüzden LDL oksidasyonu sırasında E vitamini ilk tükenen antioksidandır ve özellikle çok doymamış yağ asitlerinden zengin olan yerlerin ve oksijen ile direk temas eden dokuların oksidan



hasardan korunmasında önemlidir.

Okside LDL'in endotel zararlanmasına neden olması ve aterosklerozda gözlenen ilk değişiklik olan okside LDL'in makrofajlarca alınarak köpük hücre oluşumuna katkıda bulunması nedeni ile, E vitamini de dahil olmak üzere antioksidanların plazma lipoproteinlerini ve/veya damar hücrelerini serbest radikal hasarından koruyarak aterosklerotik süreci önleme veya yavaşlatmadaki rolleri bilinmektedir. 1991'de yayınlanan ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından desteklenen epidemiyolojik bir çalışmada, iskemik kalp hastalığından ölüm için en önemli riskin -yüksek kolesterol, hipertansiyon veya sigaradan daha önemli- düşük kan E vitamini düzeyi olduğu gösterilmiştir (66). E vitamininin kolesterol ile beslenen primatlarda aortada aterom plağı oluşumunu azalttığı bilinmektedir (67). E vitamininin endotel hücreleri tarafından oluşturulan LDL oksidasyonunu da azalttığı gösterilmiştir (68). E ve C vitaminleri, okside LDL'in endotel üzerindeki sitotoksik etkilerine de karşı yönde etki gösterirler (69).

Esansiyel antioksidanların koruyucu etkileri için üç ayrı mekanizma önerilmektedir:

1. E ve C vitaminleri lipid ve sulu ortamlarda mobil radikal tutucular olarak çalışırlar. Hücreleri ve vücudun diğer bileşenlerini serbest radikal hasarından korurlar. LDL ve hücre zarları tabakaları arasına yerleşen  $\alpha$ -tokoferol, kolaylıkla ve hızla oluşan lipid peroksidlerini tutarlar (10).

2. Lipoksijenazlar ve fosfolipaz A<sub>2</sub> gibi enzimlerin redoks fonksiyonları, C ve E vitaminleri tarafından yere özgü olarak modüle edilebilir ve "peroksid tonusları" doza bağımlı bir şekilde regüle edilirler. Lipid peroksidlerin oluşumu ve ortadan kaldırılması arasındaki denge de bu "peroksid tonusunu" oluşturur ve siklooksijenazın aktivitesini kontrol eder (10,65).

3. İkinci haberciler veya bunların sinyal ileticileri yapıcı antioksidan olan bileşikler tarafından yere özgü olarak modüle edilirler, fakat bu bileşiklerin radikal tutucu özelliklerinin bu modülasyondaki fonksiyonel katkılarının ne olduğu tam olarak bilinmemekte, yapılan gözlemlerin açıklanabilmesi için bu bileşiklerin radikal tutucu

özelliklerinden başka etki mekanizmalarının bulunmaları gerekmektedir (10).

d- $\alpha$ -Tokoferol'ün antioksidan özelliklerinden bağımsız olarak düz kas hücre çoğalmasını ve protein kinaz C aktivasyonunu önlediği hücre kültürlerinde gösterilmiştir (23,64,70,71).  $\alpha$ -Tokoferol kültür ortamında düz kas hücrelerinin çoğalmasını belirgin olarak baskılamakta,  $\alpha$ -tokoferol ile aynı antioksidan etkinlik potansiyeline sahip olan  $\beta$ -tokoferol hücre çoğalmasını baskılamamaktadır. Çoğalmayı baskılamadaki bu fark iki molekülün hücre içine farklı miktarlarda alınmalarından da kaynaklanmamakta ve bu moleküller hücre içine alınmak için bir yarışma göstermemektedirler (61,64). Ayrıca membran peroksidasyonunu  $\alpha$ -tokoferolden çok daha fazla oranda baskılayan  $\alpha$ -tokotrienolün düz kas hücreleri üzerindeki antiproliferatif etkisi  $\alpha$ -tokoferol ile aynı orandadır. d- $\alpha$ -Tokoferol'ün gösterdiği bu antiproliferatif etki hücre tipine özgüdür ve çoğalmayı uyarmak için kullanılan mitojene göre de farklılık gösterir, ancak bu etki, sıçan düz kas hücresi (A7r5), insan aorta düz kas hücresi, fare fibroblastı (Balb/3T3), fare nöroblastoma hücresi (NB2a) gibi pek çok hücre tipi için geçerlidir (64,72). E vitamininin pek çok hücre içi işleve ait sinyal iletilisi sırasında önemli bir rol oynadığı düşünülen protein kinaz C'yi inhibe ettiği in vitro olarak gösterilmiştir (64,71,73). Ortamdaki  $\alpha$ -tokoferol konsantrasyonu arttıkça hücrelerin [ $^3$ H] Timidin inkorporasyonu ve PKC aktiviteleri aynı oranda düştüğü gözlenmiştir.  $\beta$ -Tokoferol'ün ise PKC üzerinde baskılayıcı bir etkisi olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca,  $G_0$  fazındaki hücrelere  $\alpha$ -tokoferolün eklenmesi AP-1'in DNA'ya bağlanmasını baskılamazken PMA ile uyarılan hücrelere eklenen  $\alpha$ -tokoferol AP-1'in DNA'ya bağlanmasını engelleyebilmektedir (74).  $\alpha$ -Tokoferol ile PKC arasındaki etkileşiminin moleküler temeli tam olarak bilinmemektedir. Ancak,  $\alpha$ -tokoferolün protein kinaz C'nin veya onun fosforile ettiği substratların defosforilasyonunu sağlayan bir fosfatazi aktive ederek PKC'yi inhibe ettiği yolunda bazı bulgular vardır (64,72).

Bu etkileşimlerin sonucu olarak E vitamininin aterosklerozdaki koruyucu etkilerinin yalnızca radikal tutucu özelliklerinden kaynaklanamayacağı, antioksidan etkisinden bağımsız olarak ve muhtemelen PKC aracılığı ile, aterogenezin düz kas hücre

proliferasyonu, endotel hücre işlev bozukluğu ve lipid birikimi, makrofajların solunum patlaması ve düz kas hücre çoğalması gibi pek çok aşamasını kontrol ederek koruyucu etki gösterdiği ileri sürülmüştür (70,71,75).



## 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1 Gereçler

Araştırma yaşları 2-6 ay arasında değişen 16 albino erkek tavşan ile gerçekleştirilmiştir. Pelet tavşan yemi Jet Yem Sanayii'den alınmıştır. Kolesterol Merck, E-vitamini ise (Ephynal) Roche'dan alınmıştır.

Serum kolesterol ve triasilgliserol ölçümleri Technicon RA-1000 otoanalizörü kullanılarak kolorimetrik yöntemler ile tayin edilmiştir. Serum  $\alpha$ - tokoferol düzeyleri LC-GA Shimadzu isokratik pompa, C-18 Phenomenex kolon, Knauer UV (292 nm) dedektör ve Spectra-Physics integratör kullanılarak ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilmiştir.

Aorta örnekleri elektron mikroskopik inceleme için hazırlandıktan sonra Biorad E 3000 kritik nokta kurutucuda kurutulmuş ve Biorad "sputter coater" ile altın kaplanmıştır. Elektron mikroskopik incelemeleri Jeol EM 1200 ile yapılmıştır.

Aorta homojenizasyonunda IKA Ultra Turrax homojenizatör kullanılmıştır. Protein kinaz C aktiviteleri ise Upstate Biotechnology Inc.'dan (NewYork) temin edilen "Non-Radioisotopic Protein Kinase Assay System" ile, absorbanları ise Ceres UV 900 HDİ (BioTek Instruments Inc.) ile belirlenmiştir.

Immobilon-P transfer membranı Millipore'dan sağlanmıştır. Molekül ağırlığı belirleyicileri, anti-PKC antikoru ve düz kas hücresi anti- $\alpha$ -aktin monoklonal antikoru ise Sigma'dan temin edilmiştir. Immunoblottlardaki bantlar gri skala dansitometre ile (Molecular Dynamics) değerlendirilmiştir.

İstatistiksel analizler ve grafikler Microsoft Excel'in 5.0 sürümü ile yapılmıştır.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesinin başta Biyokimya A. B. D. olmak üzere, Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı, Histoloji ve Embriyoloji A. B. D. laboratuvarları, Çevre Endüstriyel Analiz Laboratuvarı, Hipokrat Tanı Laboratuvarı ve Bern Üniversitesi Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Enstitüsünün olanaklarından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

## 3.2 Yöntemler

### 3.2.1 Tavşanlarda aterosklerozun deneysel olarak oluşturulması

Yaşları 2-6 ay arasında değişen 16 albino erkek tavşan üç gruba ayrıldı;

Grup 1: 5 tavşan 8 hafta süre ile günde 100 g tavşan yemi ile beslendi.

Grup 2: 5 tavşan 8 hafta süre ile günde % 2 (w/w) kolesterol içeren 100 g tavşan yemi ile beslendi.

Grup 3: 6 tavşan 8 hafta süre ile günde % 2 (w/w) kolesterol içeren 100 g tavşan yemi ile beslendi ve 50 mg/kg/gün E vitamini kas içine injekte edildi.

### 3.2.2 Tavşan torasik aorta düz kasının hazırlanması

Tavşanlara 50 mg/kg i.m. ketamine hidroklorür anestezisi uygulandıktan sonra göğüs kafesleri açıldı ve aortaları serbestleştirildi. Aortalar arkus hizasından kesildi ve yaklaşık 5 mm uzunluğunda bir parça mikroskopik incelemeler için 15 mM sodyum fosfat ile tamponlanmış salin (PBS) içerisindeki % 4 glutaraldehid içinde tespit edildi. Daha sonra aortanın diyaframı kat ettiği noktaya kadar olan kısmı çıkarıldı ve 10 mM PBS (pH 7.4) içerisinde kandan tamamen arınana dek yıkandı. Damarın adventisyası künt disseksiyonla ayrıldı. Aorta uzunlamasına açıldı ve bir bisturi ile endotel tabakası kazındı. Bu şekilde elde edilen media tabakası eppendorf tüp içerisinde tartıldı, azot gazı eklenerek homojenize edileceği güne dek -70 °C'de saklandı.

### 3.2.3 Serum kolesterol düzeylerinin ölçülmesi

Serum kolesterol düzeyleri, enzimatik olarak renkli kinonemin bileşiklerinin oluşturulması ve bu renkli bileşiklerin absorbanlarının 500 nm.'de belirlenmesi ile ölçüldü, kolesterol düzeyleri mg/dL olarak ifade edildi.

Prensip:

Kolesterol esterleri  $\xrightarrow{\text{kolesterol esteraz}}$  Kolesterol + yağ asitleri

Kolesterol + O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{kolesterol oksidaz}}$  Kolest-4 en-3 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + fenol + amino-4-antipirin  $\xrightarrow{\text{peroksidaz}}$  Kinonemin bileşikleri (442)

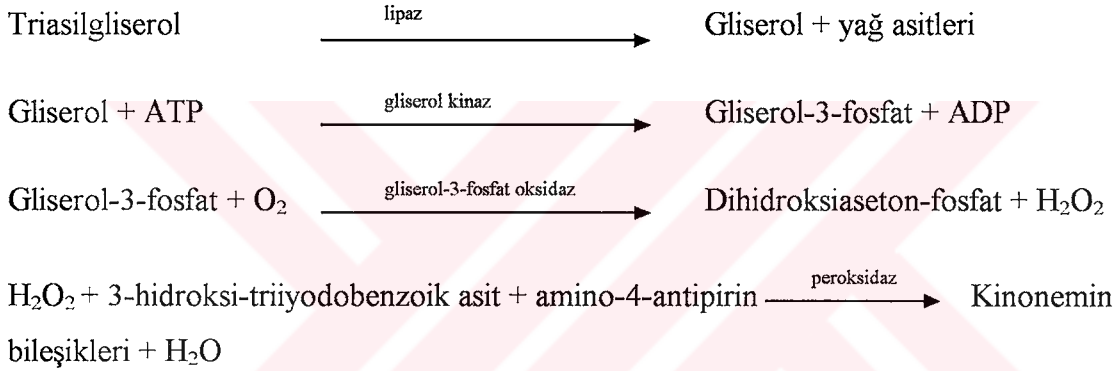
#### Kullanılan reaktifler:

1.2 mmol /L Sodyum kolat, 0.12 mmol/L Amino-4-antipirin, >500 U/L Peroksidaz, >35 U/L Kolesterol oksidaz, >200 U/L Kolesterol esteraz, 100 mmol/L Fosfat tampon pH 7.0 ve 26 mmol/L Fenol

#### 3.2.4 Serum triasilgliserol düzeylerinin ölçülmesi

Serum triasilgliserol düzeyleri enzimatik olarak renkli kinonemin bileşiklerinin oluşturulması ve bu renkli bileşiklerin absorbanlarının 500 nm.'de belirlenmesi ile ölçüldü, triasilgliserol düzeyleri mg/dL olarak belirtildi.

#### Prensip:



#### Kullanılan reaktifler:

2.28 mmol/L Gliserol, 0.25 mmol/L Amino-4-antipirin, 0.654 mmol/L Adenozin-5-trifosfat, 400 U/L Gliserol kinaz, 1800 U/L Gliserol-3-fosfat oksidaz, 600 U/L Lipaz, 800 U/L Peroksidaz, 100 mmol/L Piperazin dietan sülfonik asit, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> ve 0.4 mmol/L 3-hidroksi-2,4,6 triyodobenzoik asit.

#### 3.2.5 Serum α-tokoferol düzeylerinin ölçülmesi

Serum α-tokoferol düzeyleri ters faz HPLC ile tayin edilmiştir (76).

200 µL tavşan serumu, eşit hacimde 1 g/L askorbik asit içeren etanol ile deproteinize edildi. 24 µL asetonitril eklendi ve 1 dakika vorteks ile çalkalandı. Üzerine 500 µL HPLC grade hekzan eklenerek 2 dakika vorteks ile çalkalandı. 1 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek üst faz toplandı. Alt faz iki kez daha aynı şekilde hekzan ile ekstre

edildi ve üst fazlar bir araya toplandı. Üst fazların toplamı tekrar 1 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi ve berrak kısımdan 1 mL alınarak azot gazı altında uçuruldu. Tüpteki kalıntı üzerine 10 µL askorbik asit (1 g/L) / etanol eklendi, vorteks ile çalkalandı, 150 µL mobil faz (metanol : su; 95 : 5) eklendi, 1 dakika vorteks ile çalklandı, 1 dakika sonike edildi. Karışım 45 nm filtrelerden süzüldü. Bu süzüntüden alınan 50 µL örnek, akış hızı 1.2 mL/dk olacak şekilde HPLC kolonuna injekte edildi. İntegratörden çıkan kromatogramlarda α-tokoferol piklerinin alıkonma zamanına uyumlu pikler tanımlandı. Pik büyüklükleri, konsantasyonu bilinen α-tokoferol standartı pik büyüklüğü ile karşılaştırılarak hesaplandı, E vitamini düzeyleri µg/mL olarak ifade edildi.

### 3.2.6 Mikroskopik inceleme

Doku örnekleri 4° C'de 0.15 M PBS içerisindeki % 4'lük glutaraldehid (pH 7.2) içerisinde tespit edilerek 3 saat tampon ile yıkandı. 0.15 M fosfat tampon içerisinde OsO<sub>4</sub> içerisinde 2 saat tespit edilen dokular 4 saat tampon ile yıkandı, daha sonra oda sıcaklığında yükselen etanol serilerinden geçirilerek suları alındı. Toluende saydamlaştırılarak 1 gece toluen-epon (1:1) karışımında bırakıldı, sonra epon 812 ortamına gömüldü. Ultramikrotomda alınan 1 µm kalınlığındaki kesitler Azur B ile boyanarak ışık mikroskopi incelemesi için kullanıldı. Aynı mikrotom ile alınan 600 °A kalınlığındaki kesitler ince bakır gridler üzerine alındı, uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyandı ve elektron mikroskopik incelemeleri yapıldı (77,78).

Taramalı mikroskop çalışmaları için dokular etanol serilerinden sonra etanol - amil asetat karışımında bekletildi ve saf amil asetata alındı. Kritik nokta kurutucuda kurutulan dokular altın kaplanarak taramalı elektron mikroskopik incelemeye alındı.

### 3.2.7 Aorta düz kas hücrelerinin homojenizasyonu, sitozolik ve membran fraksiyonlarının ayrımı

200-300 mg arasındaki aorta örnekleri bisturi ile yaklaşık 1 mm<sup>2</sup>lik parçalara ayrıldı. Önce 0.5 mL "buffer A" [20 mM Tris, pH 7.5, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, 10 mM EGTA, % 10 (v/v) Glicerol, 1 mM PMSF] eklenerek Turrax homojenizatorde 9500

rpm'de buz içerisinde 75 saniye homojenize edildi, karışımın hacmi buffer A ile 1500  $\mu\text{L}$ 'e tamamlandı.

Karışım  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 5 dakika 500 x g santrifüj edilerek çekirdek fraksiyonu uzaklaştırıldı. Üst faz,  $4^{\circ}\text{C}$ 'da 100,000 x g'de 60 dakika santrifüj edildi. Üst faz (**sitozolik fraksiyon**) alındı ve protein kinaz C aktivitesi belirlenene dek buz içerisinde bekletildi. Pelet (**membran fraksiyonu**) % 0.1 Triton X-100 içeren 400  $\mu\text{L}$  buffer A içerisinde yeniden süspansiyon edildi. Süspansiyon  $+4^{\circ}\text{C}$ 'da 40 dakika çalkalandı, daha sonra  $4^{\circ}\text{C}$ 'da 100,000 x g'de 60 dakika santrifüj edilerek, üst faz alındı (**çözünmüş membran fraksiyonu**). Membran ve sitozol fraksiyonlarına son konsantrasyonları sırası ile 0.1 mM, 0.01 mM ve 1 mM olacak şekilde  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ,  $\beta$ -gliserofosfat ve NaF eklendi.

Bu örneklerin protein içerikleri belirlendi; konsantrasyonları, 12  $\mu\text{L}$ 'sinde 10  $\mu\text{g}$  protein içerecek şekilde buffer A ile ayarlandı ve PKC aktiviteleri belirlendi.

### 3.2.8 Protein tayini

Aorta homojenatlarının protein içerikleri Lowry (79) yöntemi ile belirlendi. 50  $\mu\text{L}$  homojenat, 1 mL 50:1 oranında karıştırılmış 0.1 N NaOH içerisindeki % 2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve % 1 sodyum potasyum tartarat içerisindeki % 0.5  $\text{CuSO}_4$  ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi ve üzerine 0.1 mL 1:1 oranında sulandırılmış Folin Ciocalteu ayracı eklendi. Protein standartı olarak % 0.1 sığır serum albumini kullanıldı. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilen karışımların absorbansları 750 nm. de belirlendi ve protein konsantrasyonları  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  olarak ifade edildi.

### 3.2.9 Protein kinaz C aktivitesinin ölçülmesi

Protein kinaz C aktiviteleri bir ELISA yöntemi olan "Non-Radioisotopic Protein Kinase Assay System" ile belirlendi.

#### Prensip:

Bir "intermediate filament" bileşeni olan glial fibriller asidik protein (GFAP) in vitro olarak protein kinaz C için bir substrat görevi görür. GFAP'nin 3. ile 13. amino asit kalıntıları olan Arg-Arg-Arg-Val-Thr-fosfoSer-Ala-Ala-Arg-Arg-fosfoSer



(fosfopeptid G1) sentetik peptidine karşı geliştirilen Fare monoklonal YC-10 antikorunun GFAP'ın 7 ile 12. amino asit kalıntıları arasında kalan yerel fosforillenme yeri dizisini (Thr-fosfoSer-Ala-Ala-Arg-Arg) tanıdığı gösterilmiştir (80).

“Non-Radioisotopic Protein Kinase Assay System” içerisinde bulunan çözeltiler:

1. Bileşik çözelti: 25 mM Tris-HCl pH 7.0, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ATP, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 µg PS
2. Durdurma çözeltisi: % 20 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
3. Yıkama çözeltisi
4. Substrat A: Tetrametilbenzidin
5. Substrat B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
6. 200 mM EGTA

Deney protokolü:

Aorta homojenatlarının sitozolik ve membran fraksiyonlarının protein konsantrasyonları 12 µL'de 10 µg protein olacak şekilde ayarlandıktan sonra, her fraksiyonun PKC aktiviteleri, her örnekten ikişer adet olacak şekilde belirlendi.

1. 12 µL kinaz örneği, 108 µL bileşik çözelti ile karıştırılarak 25 °C'lık bir su banyosunda 5 dakika bir ön inkübasyona tutuldu. Her örnek için PS içeren iki pozitif deney (test) ve eşit hacimde EGTA içeren iki negatif kontrol (kör) hazırlandı.
2. Bu karışımdan 100 µL alınarak G1 fosfopeptid kaplı kuyucuklara aktarıldı, 25 °C'lık su banyosunda 5 dakika inkübe edilerek örneklerdeki PKC'nin kuyulardaki fosfopeptid G1'i fosforile etmesi sağlandı.
3. 100 µL durdurma çözeltisi eklendi.
4. Yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı.
5. Her kuyuya 100 µL YC-10 monoklonal antikorunu eklendi, 25 °C'lık su banyosunda 30 dakika inkübe edilerek monoklonal antikorun fosforillenen peptide bağlanması sağlandı.
6. Yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı.
7. Her kuyuya 100 µL peroksidaz (POD) ile konjuge edilmiş fare Ig G antikorunu

eklendi, 25 °C'lık su banyosunda 60 dakika inkübe edilerek bağlanmış olan YC-10 monoklonal antikorlarının peroksidaza konjuge edilmiş olan "anti-mouse Ig G" tarafından tanınması sağlandı.

8. Yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkandı.
9. Her kuyuya 100 µL substrat çözeltisi eklendi, 25 °C'lık su banyosunda 3 dakika inkübe edildi.
10. Her kuyuya 100 µL durdurma çözeltisi eklendi ve kuyuların absorbansları 450 nm'de belirlendi.

PKC enzim aktiviteleri, her örnek için çalışılan deney ve kör absorbans farkları ( $\Delta A$ ) kullanılarak  $\Delta A / \text{dakika} / \mu\text{g}$  protein olarak ifade edildi.

### 3.2.10 Protein kinaz C ve $\alpha$ -aktin ekspresyonunun ölçülmesi

Protein kinaz C ve  $\alpha$ -aktin ekspresyonları "immunoblotting" ile belirlendi. Bu amaçla önce Sodyum dodesil sülfat / Poliakrilamid jel elektroforezi (SDS/PAGE) ile proteinler ayrıştırıldı, daha sonra ayrıştırılan proteinler blotlandı.

#### 3.2.10.1 Sodyum dodesil sülfat/Poliakrilamid jel elektroforezi

Protein elektroforezi Biorad Mini jel 10 x 7.5 x 0.1 cm kullanılarak Laemmli'nin (81) tanımladığı yönteme göre yapıldı. Poliakrilamidin % 30'luk (w/v) ve bisakrilamidin % 0.8'lik (w/v) sudaki çözeltisi kullanılarak % 5 (yükleme) ve % 8'lik (ayırıcı) jeller yapıldı. Ayırıcı jel için kullanılan tamponun son konsantrasyonları 0.375 M Tris pH 8.8, 2 mM EDTA ve % 0.1 (m/v) SDS idi. Jelin polimerizasyonu TEMED'in % 0.05 (v/v) ve amonyum persülfatın % 10'luk sudaki çözeltisi kullanılarak sağlandı. % 5'lik yüklemeye jel tamponunun son konsantrasyonları 0.125 M Tris pH 6.8, 2 mM EDTA ve % 0.1'lik (m/v) SDS idi. Yürütme tamponu ise 288 g glisin, 60 g Tris, 4.8 g EDTA'nın 10 L suda çözülmesi ve 10 g SDS eklenmesi ile hazırlandı. Yüklemeye jeli 20 mA, ayırıcı jel ise 30 mA akım altında yürütüldü. Her yürütmede önceden boyanmış uygun boyutlu molekül ağırlığı belirleyicileri kullanıldı. Sitozolik ve membran fraksiyonları, her kuyuda 20 µg protein olacak şekilde yüklendi.

### 3.2.10.2 “Immunoblotting” (Western blotting)

Elektroforezle ayrıştırılan proteinler 10 mM CAPS pH 11 ve % 10 (v/v) metanol içeren buz soğukluğunda tampon içerisinde 140 mA akım altında 1 saatte poliakrilamid / SDS jelinden Immobilon P membrana aktarıldı. Aktarma işleminin etkinliği, jele daha önceden eklenmiş olan önceden boyanmış olan molekül ağırlığı belirleyicileri ile izlendi. Membran 5 dakika süre ile TBS (20 mM Tris, 130 mM NaCl, pH 7.0) ile yıkandı.

Blotlar oda sıcaklığında bir saat süre ile % 5 (m/v) yağsız süt tozu içeren TBS ile bloke edildi ve 2 kez 5 dakika süre ile TTBS [TBS + % 0.1 (v/v) Tween 20] ile yıkandı. Anti-PKC antikoruna % 1 (m/v) BSA/ % 0.1 (m/v) NaN<sub>3</sub> içeren PBS içerisinde çözüldü. Blotlar anti-PKC antikoruna ile 1 gece inkübe edildi. Membranlar 2 x 10 dakika TTBS içerisinde yıkandı ve seçilen görüntüleme yöntemine için uygun oranlarda seyreltilmiş ikinci antikor ile inkübe edildi.

$\alpha$ -Aktin ekspresyonunun ölçümü için aynı blotlar önce anti-PKC antikorlarından arındırıldı. Bunun için blotlar, 100 mM 2-merkaptoetanol, % 2 SDS, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7 içeren bir tamponda 50 °C’da 30 dakika yıkandı. Daha sonra blotlar 2 x 10 dakika TTBS ile yıkandı, 2 x10 dakika % 5 (m/v) yağsız süt tozu içeren TBS ile bloke edildi. Blotlar düz kas hücresi anti- $\alpha$ -aktin monoklonal antikoruna ile 1 gece inkübe edildi. Membranlar 2 x 10 dakika TTBS içerisinde yıkandı ve seçilen görüntüleme yöntemine için uygun oranlarda seyreltilmiş ikinci antikor ile inkübe edildi.

### 3.2.10.3 “Enhanced” kemiluminesans (ECL) ile görüntüleme:

#### Prensip:

Kemiluminesansın prensibi bir kimyasal reaksiyon ile uyarılan bileşiklerin, uyarılmış haldeki enerjilerini ışık emisyonu olarak saçmalarına dayanır. Luminol gibi halkasal diasilhidrazidlerin “Horseradish Peroxidase” (HRP) / H<sub>2</sub>PO<sub>2</sub> tarafından alkali koşullar altında okside edilmesi çok kullanılan sistemlerden birisidir. Oksidasyon ile uyarılan luminol bazal enerji düzeyine dönerken ışık saçar. Bu oksidasyonun fenoller gibi çeşitli

“enhancer”ların varlığında yapılması ise ışık emisyonunu güçlendirir.

HRP ile işaretli antikolar ile konjuge edilen immobilize edilmiş belirli antijenler, “enhanced” kemiluminesans ile görüntülenebilir.

Protokol:

Blotlar, “Horseradish Peroxidase” ile konjuge edilmiş, TTBS ile 1:10,000 oranında seyreltilmiş, tavşan Ig G’sine karşı geliştirilmiş antikor ile 1 saat inkübe edildi, TTBS ile 4 x 10 dakika yıkandı, Amersham International’ın ECL görüntüleme kiti ile görüntülendi ve görülen bantlar dansitometre ile ölçüldü.

### 3.2.11 İstatistiksel analiz

Gruplardan elde edilen verilerin ortalama, standart sapma ve varyans gibi istatistiksel parametreleri belirlendikten sonra, varyanslarının eşit veya farklı olmalarına göre varyansları eşit gruplar için tek yönlü t-testi veya varyansları farklı gruplar için tek yönlü t-testi ile karşılaştırıldılar.

## 4. SONUÇLAR

### 4.1 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin serum lipid ve E vitamini düzeylerine etkisi

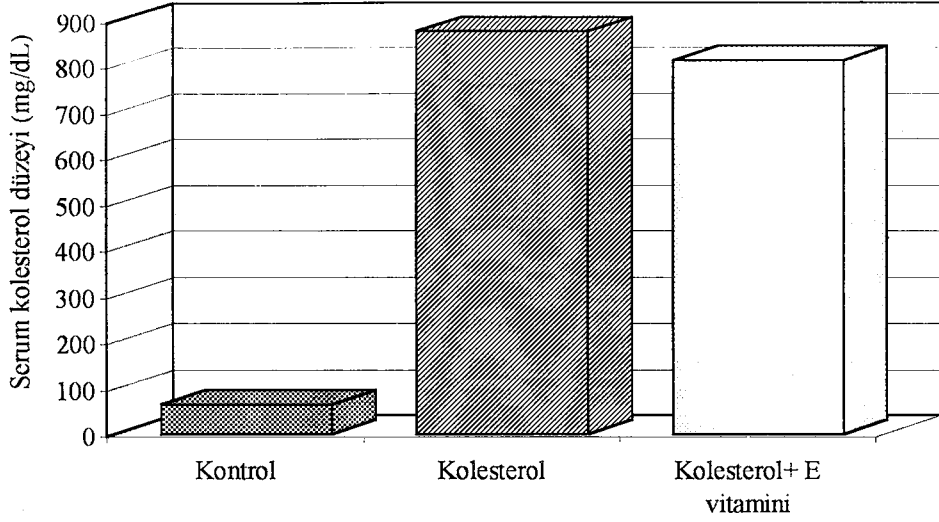
#### 4.1.1 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin serum kolesterol düzeylerine etkisi

Kontrol grubundaki tavşanların serum kolesterol düzeyi ortalaması  $64 \pm 11$  mg/dL iken kolesterol ile beslenen gruptaki tavşanların serum kolesterol düzeyi ortalaması  $875 \pm 573$ , kolesterol ve E vitamini ile beslenen gruptaki tavşanların serum kolesterol düzeyi ortalaması da  $811 \pm 300$  mg/dL idi (Tablo 1). 2. ve 3. gruptaki tavşanların serum kolesterol düzeyleri, kontrol grubundaki tavşanların serum kolesterol düzeylerinden istatistiksel olarak farklı (sırası ile;  $p < 0.01$  ve  $p < 0.001$ ) iken, 2. ve 3. gruptaki tavşanların serum kolesterol düzeyleri arasında  $\alpha = 0.05$  güvenirlilik aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 2).

**Tablo 1:** Her üç gruptaki tavşanın serum total kolesterol, triasilgliserol ve E vitamini düzeyleri (ortalama  $\pm$  standart sapma)

|                             | Kontrol<br>(n=5) | Kolesterol<br>(n=5) | Kolesterol + E vitamini<br>(n=6) |
|-----------------------------|------------------|---------------------|----------------------------------|
| Total kolesterol<br>(mg/dL) | $64 \pm 11$      | $875 \pm 573^*$     | $811 \pm 300^{**}$               |
| Triasilgliserol<br>(mg/dL)  | $150 \pm 48$     | $214 \pm 127$       | $270 \pm 201$                    |
| E vitamini<br>( $\mu$ g/mL) | $3.2 \pm 1.3$    | $9.8 \pm 2.9$       | $122.6 \pm 42.7^{**}$            |

kontrol ile kıyaslandığında \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ ; ortalama  $\pm$  standart sapma



**Şekil 2:** Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin serum kolesterol düzeylerine etkisi.

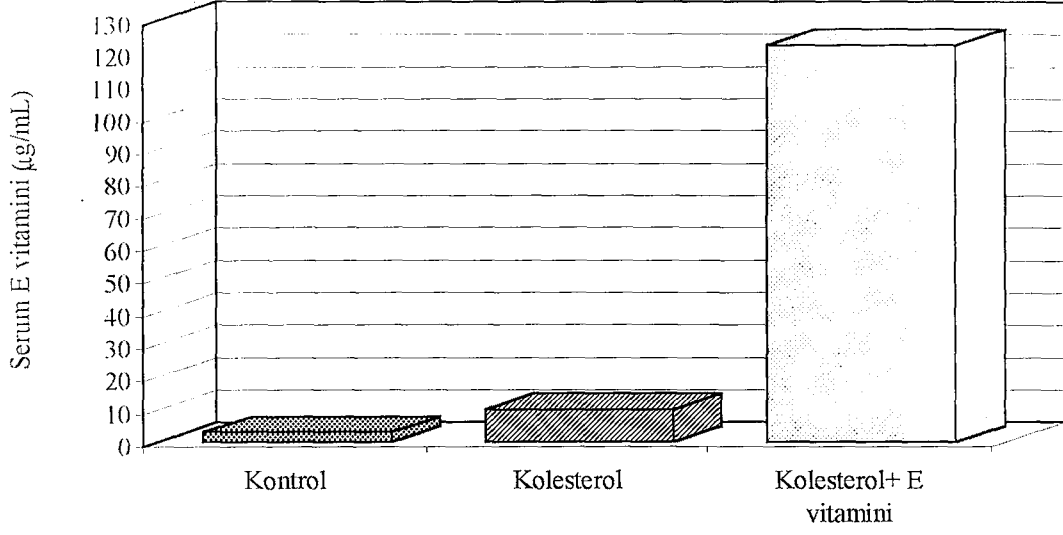
#### 4.1.2 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin serum triasilgliserol düzeylerine etkisi

Kontrol grubundaki tavşanların serum triasilgliserol düzeyi ortalaması  $150 \pm 48$  mg/dL iken kolesterol ile beslenen gruptaki tavşanların serum triasilgliserol düzeyi ortalaması  $214 \pm 127$ , kolesterol ve E vitamini ile beslenen gruptaki tavşanların serum triasilgliserol düzeyi ortalaması da  $270 \pm 201$  mg/dL idi. Bu sonuçlar karşılaştırıldığı zaman her üç grubun serum triasilgliserol düzeyleri arasında  $\alpha=0.05$  güvenirlilik aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 1).

#### 4.1.3 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin serum E vitamini düzeylerine etkisi

Kontrol grubundaki tavşanların serum E vitamini düzeyi ortalaması  $3.2 \pm 1.3$   $\mu\text{g/mL}$ , kolesterol ile beslenen gruptaki tavşanların serum E vitamini düzeyi ortalaması  $9.8 \pm 2.9$   $\mu\text{g/mL}$  ve kolesterol + E vitamini verilen gruptaki tavşanların serum E vitamini düzeyi ortalaması da  $122.6 \pm 42.7$   $\mu\text{g/mL}$  idi (Tablo 1). Kolesterol + E vitamini verilen gruptaki tavşanların serum E vitamini düzeyleri, kontrol grubundaki ve kolesterolde zengin diet ile beslenen gruptaki tavşanların serum E vitamini

düzeylerinden istatistiksel olarak farklı idi ( $p<0.001$ ) (Şekil 3).



**Şekil 3:** Kolesterolde zengin diet ile beslenme ve E vitamini verilmesinin serum E vitamini düzeylerine etkisi.

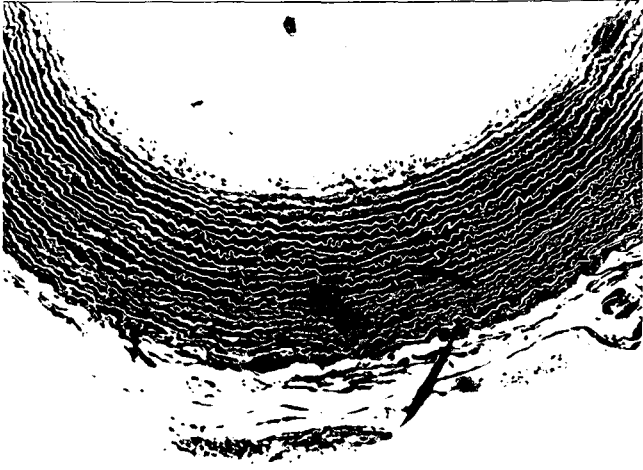
## 4.2 Mikroskopi sonuçları

### 4.2.1 Işık mikroskopisi

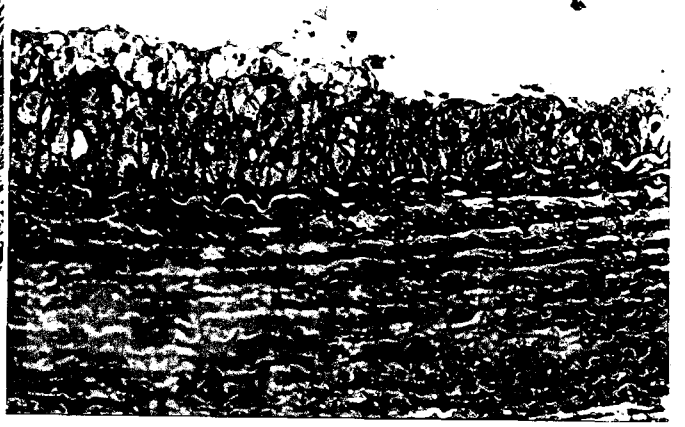
Her üç gruptan da alınan aorta örneklerinden 1 mm kalınlığında kesitler hazırlandı ve ışık mikroskopunda incelendi. Kontrol grubundaki tavşanların aorta örneklerinde bütünlüğü bozulmamış endotel tabakası ve normal bir intima ve media tabakasına sahip olan damar kesitleri görüldü (Şekil 4 A).

Kolesterolde zengin diet ile beslenen grupta endotel tabakasının bütünlüğünün bozulduğu ve intimada yer yer 7-8 hücre tabakasına varan belirgin bir kalınlaşma olduğu gözlemlendi. İntimadaki hücrelerin sitoplazmalarında lipid vakuollerinin birikerek köpük hücreleri oluşturduğu, bazı alanlarda tüm sitoplazmanın bu vakuoller ile kaplandığı gözlemlendi. Mediadaki hücrelerin aksine, intimadaki hücrelerin uzun eksenleri elastik liflere dik yerleşmiş olduğu, elastik liflerin ondülasyonlarının bozulmuş olduğu ve düz kas hücreleri arasında yer yer lipid damlacıklarının bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4 B). Şekil 4 C'de ise oluşan köpük hücreler daha büyük büyütme ile gösterilmiştir.

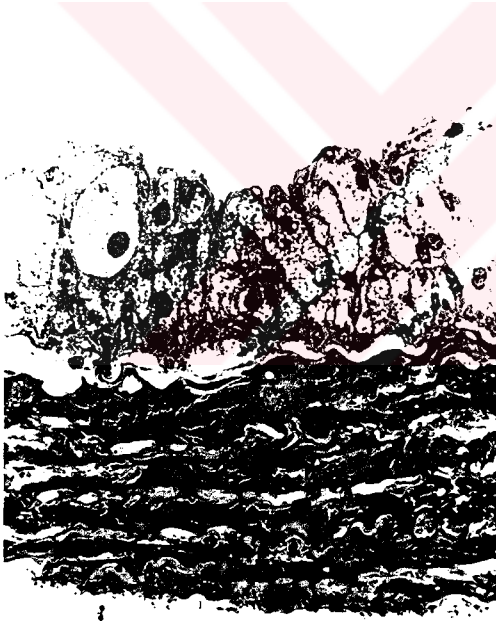




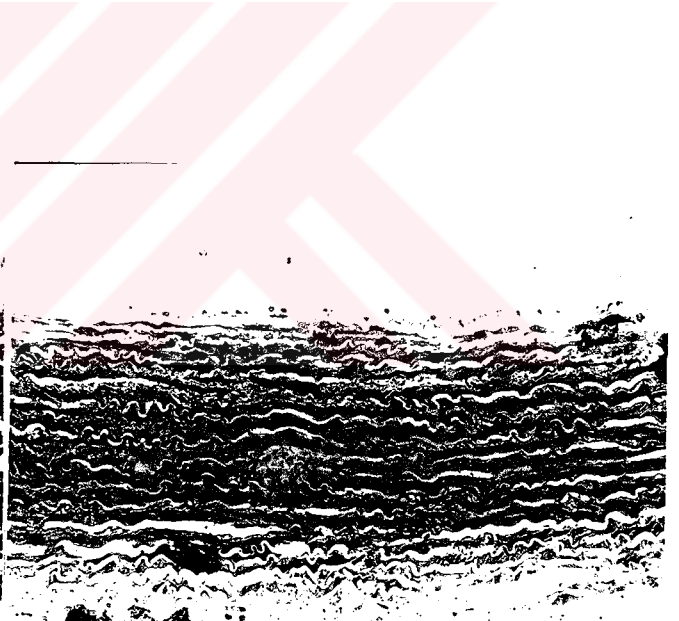
(A)



(B)



(C)



(D)

**Şekil 4:** Her deney grubunu temsil eden bir tavşanın aortasının ışık mikrokopi fotoğrafları. A) kontrol grubu (x10 büyütme), B) kolesterol grubu (x20 büyütme), C) kolesterol grubu (x40 büyütme), D) kolesterol + E vitamini grubu (x20 büyütme)



Şekil 4 D de görüldüğü gibi, Kolesterol + E vitamini verilen grupta, 2. gruba kıyasla damar yapısının normale çok yakın olduğu, intimal kalınlaşmanın olmadığı veya minimal olduğu, intimada veya mediada köpük hücrelerin görülmediği, media tabakasındaki elastik liflerin ondülasyonların ise normal olduğu gözlemlendi.

#### 4.2.2 “Scanning” elektron mikroskopisi (SEM)

Kontrol grubundaki tavşanların aortalarının SEM incelemesinde oldukça düzgün bir endotel örtüsünün bulunduğu, endotel hücrelerinin şekil ve boyutlarının homojen olduğu ve üzerlerine trombositlerin yapışmadığı gözlemlendi (Şekil 5 A).

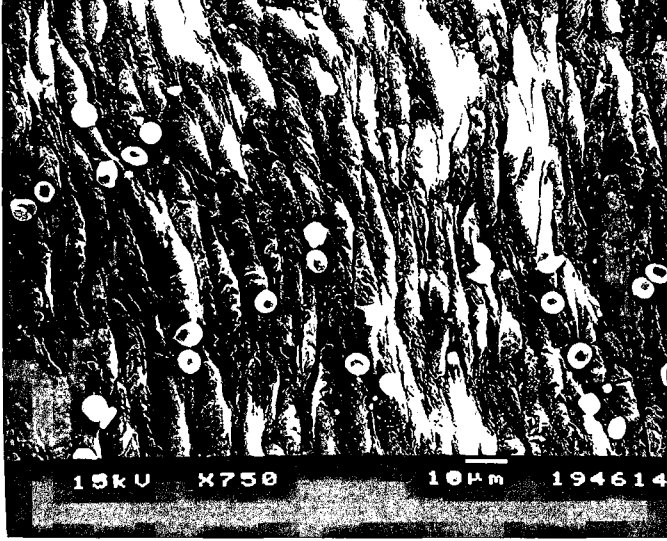
Kolesterolden zengin dietle beslenen gruptaki tavşanların aortalarının SEM incelemesinde endotel tabakasının düzgün bir yüzey oluşturmadığı, yüzey rölyefinin bozulduğu, endotel hücrelerinin şekillerinin bozulduğu ve yer yer aralarının açılarak altta yatan intima tabakasının ortaya çıktığı görüldü (Şekil 5B). Bazı bölgelerde yaygın trombus alanlarının bulunduğu, ve daha büyük büyütmelelerde bu bölgelerin bir fibrin ağı ile kaplı bulunduğu görüldü Şekil 5C’de zarar görmüş endotel hücreleri görülmektedir..

Kolesterol + E vitamini verilen grupta, endotel tabakası yüzeyinin 2. gruba kıyasla daha düzgün olduğu, açık alanların bulunmadığı ancak yine de endotel hücrelerinin şekil ve boyut olarak 1. grup kadar homojen olmadığı gözlemlendi. Bu grupta trombosit tutunmasının ve fibrin ağının çok daha az olduğu görüldüğü saptandı (Şekil 5 C).

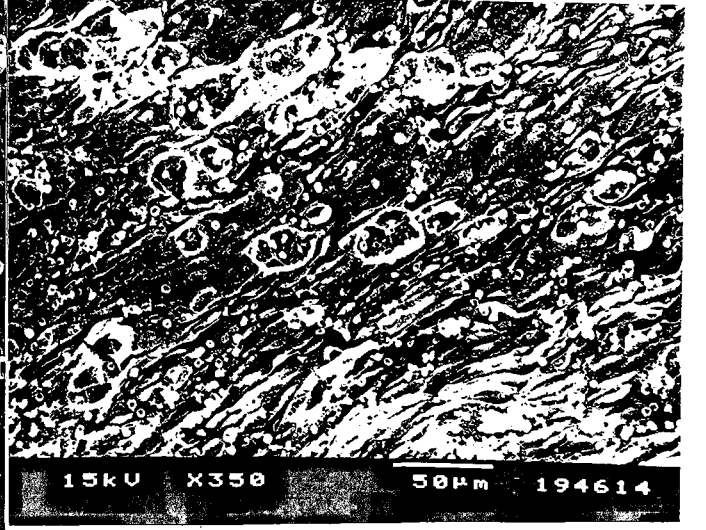
#### 4.2.3 “Transmission” elektron mikroskopisi (TEM)

Kontrol grubundaki tavşanların aortalarının TEM incelemelerinde düz kas hücrelerinin çok sayıda miyofilaman içerdiği, sitoplazmalarında az sayıda organel bulunduğu ve tipik düz kas hücresi görünümünde oldukları saptandı (Şekil 6 A).

Kolesterol ile beslenen grupta düz kas hücrelerinin sitoplazmalarındaki miyofilamanların kaybolduğu, mitokondri, golgi aparatı, ER ve ribozom gibi



(A)



(B)

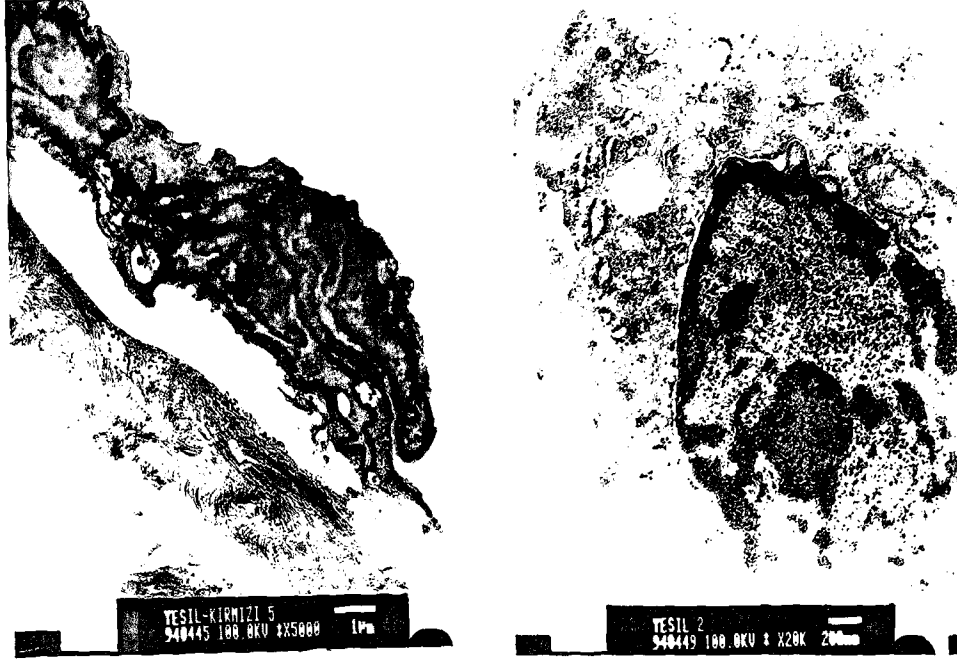


(C)



(D)

**Şekil 5:** Her deney grubunu temsil eden bir tavşanın aortik düz kas hücre SEM fotoğrafları; A) kontrol grubu, B) kolesterol grubu, C) kolesterol grubu, D)kolesterol + E vitamini grubu



(A)

(B)



(C)

**Şekil 6:** Her deney grubunu temsil eden bir tavşanın aortik düz kas hücre TEM fotoğrafları; A) kontrol grubu, B) kolesterol grubu, C) kolesterol + E vitamini grubu

organellerin sayısında belirgin bir artış olduğu, ve çok sayıda lipid dolu vakuollerin bulunduğu gözlemlendi (Şekil 6 B).

Kolesterol + E vitamini verilen gruptaki tavşanların aortalarının TEM incelemelerinde düz kas hücrelerinin bir miktar organel içermekle birlikte, hemen hemen hiç lipid vakuolleri olmadığı ve hücrelerde belirgin miktarda miyofilaman bulunduğu görüldü (Şekil 6 C).

Tüm bu sonuçları göz önüne alınca, kontrol grubundaki tavşanlarda normal bir elastik arter morfolojisi bulunduğu, kolesterolden zengin diet ile beslenen tavşanlarda ise tip III ve tip IV aterosklerotik lezyonların gözlenebildiğine ve aterosklerozun tüm morfolojik karakteristiklerinin bulunduğu karar verildi. Kolesterolden zengin dietle birlikte E vitamini verilen grupta gözlenen aterosklerotik değişikliklerin ise minimal olduğu ve arter yapısının normalden çok az sapma gösterdiği saptandı.

### 4.3 Kolesterolden zengin diet ve E vitamini verilmesinin protein kinaz C üzerine etkisi

#### 4.3.1 Kolesterolden zengin diet ve E vitamini verilmesinin protein kinaz C aktivitesi üzerine etkisi

Her üç grup tavşanın aorta düz kas homojenatının sitozolik ve membran fraksiyonlarında ölçülen PKC aktiviteleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

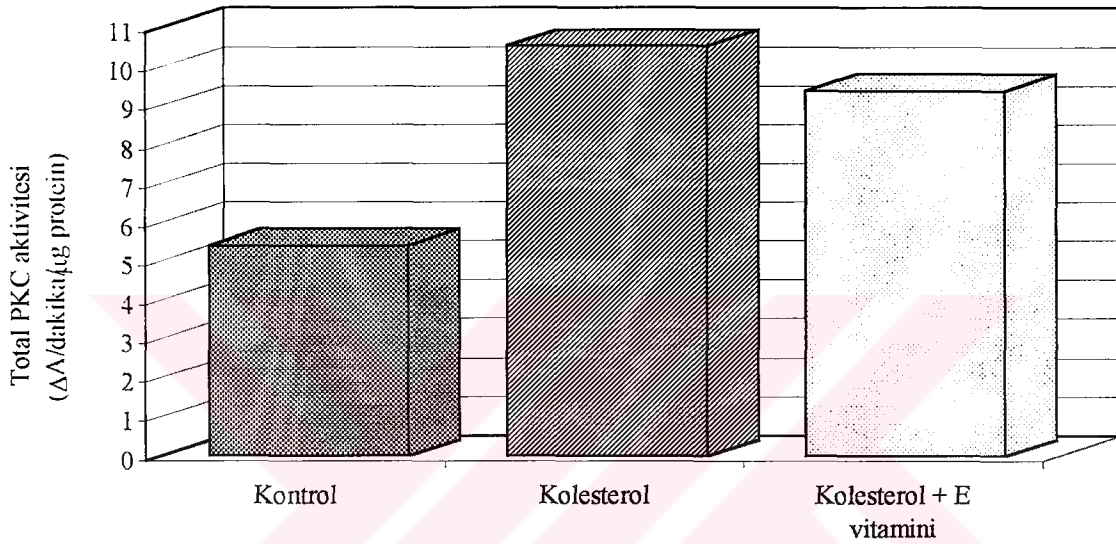
**Tablo 2:** Damar damar düz kas PKC aktiviteleri ( $\Delta A$  / dakika /  $\mu g$  protein)

|                    | Kontrol         | Kolesterol        | Kolesterol + E vitamini |
|--------------------|-----------------|-------------------|-------------------------|
| Sitozolik aktivite | 1.85 $\pm$ 1.10 | 4.42 $\pm$ 0.75*  | 4.15 $\pm$ 0.52*        |
| Membran aktivitesi | 3.57 $\pm$ 1.27 | 6.13 $\pm$ 2.04** | 5.26 $\pm$ 1.36 **      |
| Total aktivite     | 5.42 $\pm$ 1.89 | 10.55 $\pm$ 2.12* | 9.41 $\pm$ 0.94*        |

kontrol ile kıyaslandığında \*  $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.05$ ; ortalama  $\pm$  standart sapma

Kolesterol grubundaki tavşanların total PKC aktivitesi ortalaması (10.55  $\pm$  2.12) ve

kolesterol + E vitamini verilen gruptaki tavşanların total PKC aktivitesi ortalamasının ( $9.41 \pm 0.94$ ), kontrol grubundaki tavşanların total PKC aktivite ortalamasından ( $5.42 \pm 1.89$ ) istatistiksel olarak farklı olduğu bulundu ( $p < 0.01$ ). Kolesterol ile beslenen tavşanlar ile kolesterol + E vitamini ile beslenen tavşanların total PKC aktivitesi ortalamaları arasında ise  $\alpha = 0.05$  güvenlik aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 7).

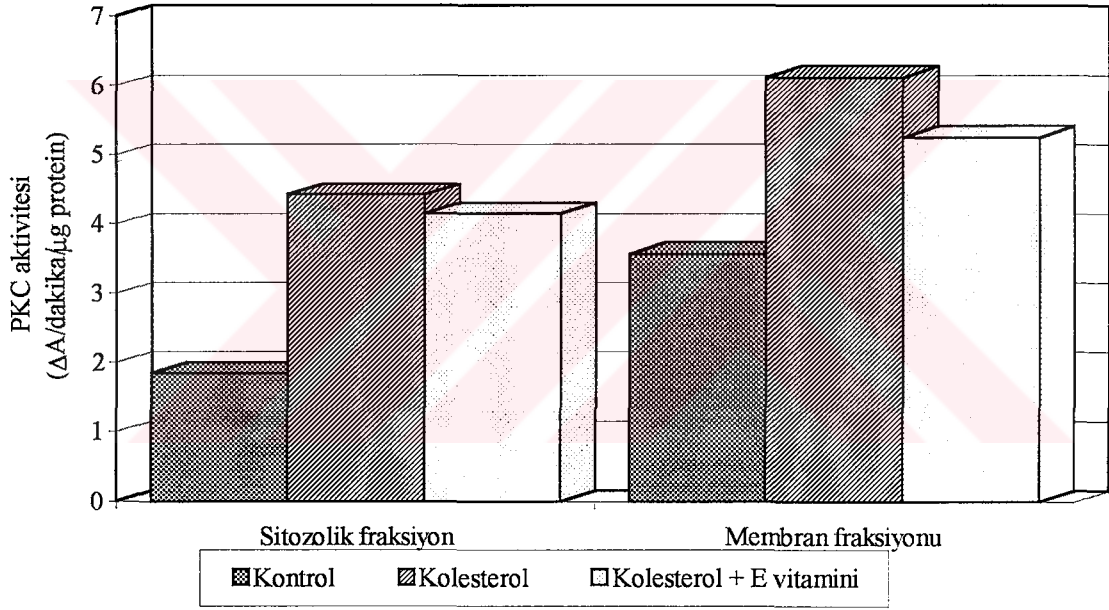


**Şekil 7:** Kolesterolde zengin diyetle beslenme ve E vitamini verilmesinin damar düz kas hücreleri total PKC düzeylerine etkisi.

Düz kas hücrelerinin sitozolik ve membran fraksiyonlarının PKC aktiviteleri de, gruplar arasında benzer bir dağılım gösterdiği görüldü. Kontrol grubundaki tavşanların aorta düz kas hücrelerinin sitozolik fraksiyon PKC aktivitesi ortalaması  $1.85 \pm 1.10$ , membran fraksiyonu PKC aktivitesi ortalaması  $3.57 \pm 1.27$ ; kolesterol ile beslenen gruptaki tavşanların aorta düz kas hücrelerinin sitozolik fraksiyon PKC aktivitesi ortalaması  $4.42 \pm 0.75$ , membran fraksiyonu PKC aktivitesi ortalaması  $6.13 \pm 2.04$  ve kolesterol + E vitamini ile beslenen gruptaki tavşanların aorta düz kas hücrelerinin sitozolik fraksiyon PKC aktivitesi ortalaması  $4.15 \pm 0.52$ , membran fraksiyonu PKC aktivitesi ortalaması  $5.26 \pm 1.36$  idi (Tablo 2). Grupların sitozolik fraksiyon PKC aktiviteleri ortalamaları karşılaştırılınca, kolesterol ve kolesterol + E vitamini ile



beslenen grupların kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu görüldü ( $p<0.01$ ). Kolesterol ile beslenen grup ile kolesterol + E vitamini alan grubun sitozolik PKC aktiviteleri ortalamaları arasında ise  $\alpha=0.05$  güvenlik aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. Grupların membran fraksiyonundaki PKC aktiviteleri ortalamaları karşılaştırılınca da aynı dağılım şekli görüldü; kolesterol ve kolesterol + E vitamini ile beslenen grupların kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu bulundu ( $p<0.05$ ). Kolesterolde zengin diet ile beslenen grup ile kolesterol + E vitamini verilen grubun sitozolik PKC aktiviteleri ortalamaları arasında ise  $\alpha=0.05$  güvenlik aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 8).



**Şekil 8:** Kolesterolde zengin dietle beslenme ve E vitamini verilmesinin damar düz kas hücrelerinin sitozolik ve membran fraksiyonundaki PKC aktivitelerine etkisi.

#### 4.3.2 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin protein kinaz C'nin sitozolden membrana translokasyonuna etkisi

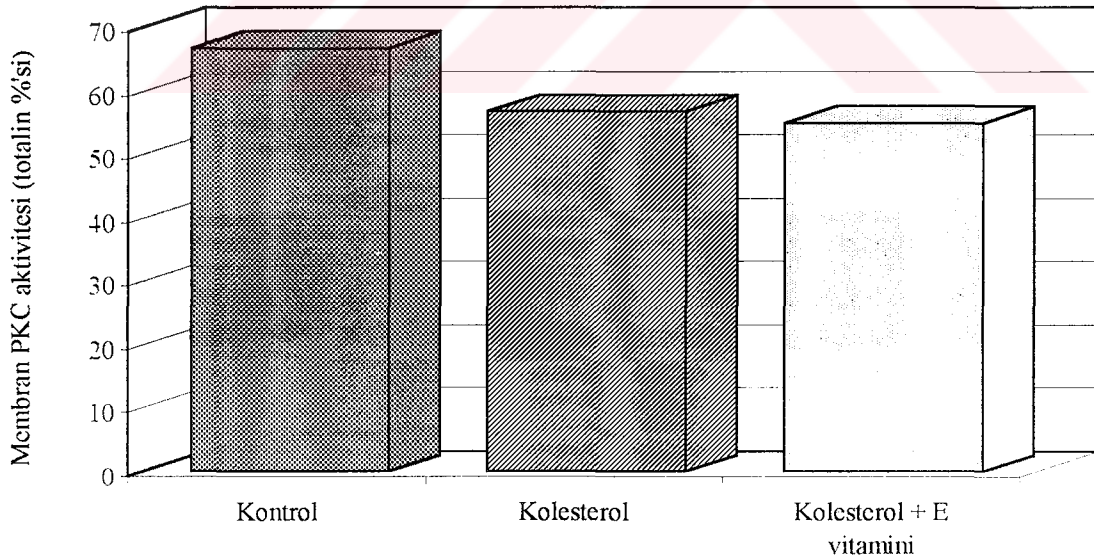
PKC'nin sitozolden membrana translokasyonunda gruplar arasında farklılık olup olmadığını anlamak için her denegin düz kas hücre membran fraksiyonunda ölçülen

PKC aktivitesinin, total PKC aktivitesinin yüzde kaçı olduğu hesaplandı ve membran PKC aktiviteleri totalin %'si olarak ifade edildi (Tablo 3). Kontrol grubundaki tavşanların membran PKC aktiviteleri total aktivitenin %  $66.9 \pm 12.1$ 'i, kolesterol grubunun %  $56.9 \pm 9.6$ 'sı ve kolesterol + E vitamini grubunun %  $55.1 \pm 9.9$ 'u idi. Bu oranlar arasında  $\alpha=0.05$  güvenlik aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 9).

**Tablo 3:** Damar düz kas hücrelerinin membran PKC aktivitelerinin total aktiviteye oranları

|   | Kontrol         | Kolesterol     | Kolesterol + E vitamini |
|---|-----------------|----------------|-------------------------|
| Membran aktivitesi<br>(Totalin %'si olarak) | $66.9 \pm 12.1$ | $56.9 \pm 9.6$ | $55.1 \pm 9.9$          |

ortalama  $\pm$  standart sapma



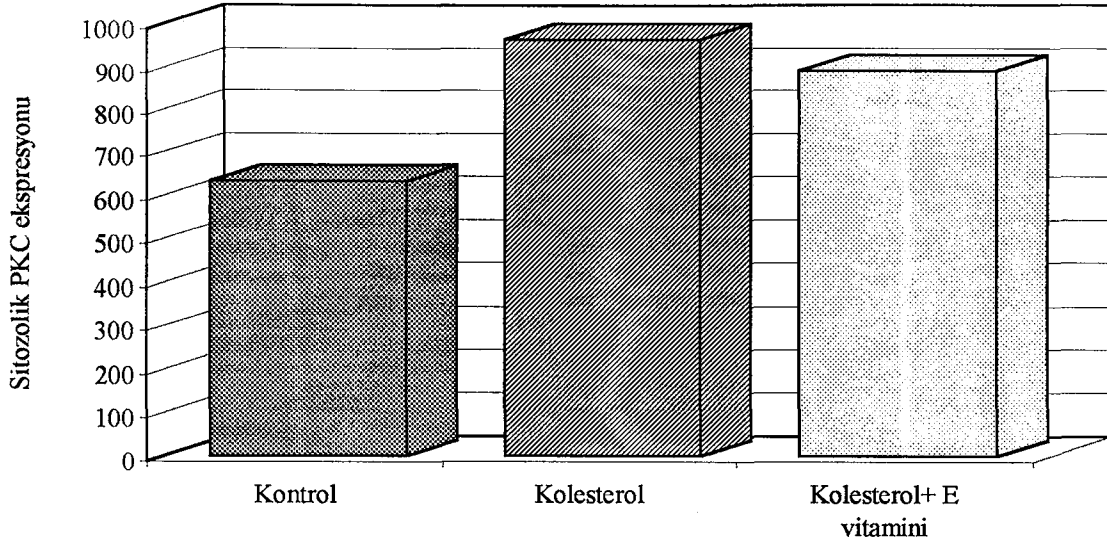
**Şekil 9:** Kolesterolden zengin diet ile beslenme ve E vitamininin damar düz kas hücresinde PKC'nin sitozolden membrana translokasyonuna etkisi.



#### 4.3.3 Kolesterolde zengin diet ve E vitamini verilmesinin damar düz kas hücreleri sitozolik protein kinaz C ekspresyonuna etkisi

Kolesterol ile beslenen guruplardaki gerek sitozolik ve membran fraksiyonlarındaki PKC aktivitelerinin, gerekse total PKC aktivitesinin kontrol gurubundan yüksek çıkması üzerine, bunun hücre içerisindeki PKC'nin aktive olmasından mı yoksa PKC ekspresyonunun artmasından mı kaynaklandığını anlayabilmek için sitozolik ve membran fraksiyonlarına ait homojenatlar SDS - PAGE ile ayrıldı ve ayrılan bantlar SDS - PAGE jelinden Immobilon P membranlara aktarıldı. Blotlar anti-PKC antikoruna ile inkübe edildi ve daha sonra "Horseradish Peroxidase" ile konjuge edilmiş, tavşan Ig G'sine karşı geliştirilmiş antikor ile inkübe edilerek ECL ile görüntülendi, ve bantlar dansitometre ile değerlendirildi.

Kontrol grubu ortalaması  $635.5 \pm 186.0$ , kolesterol ile beslenen grubun ortalaması  $968.0 \pm 263.6$ , kolesterol + E vitamini ile beslenen grubun ortalaması  $893.8 \pm 89.0$  olarak ölçüldü (Tablo 4). Bu sonuçlar karşılaştırıldığı zaman, kolesterol ve kolesterol + E vitamini ile beslenen grupların kontrol grubundan istatistiksel olarak farklı olduğu bulundu ( $p < 0.05$ ). Kolesterol ile beslenen grup ile kolesterol + E vitamini alan grubun sitozolik PKC ekspresyon miktarları arasında ise  $\alpha = 0.05$  güvenlik aralığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 10).



**Şekil 10:** Kolesterolde zengin diyetle beslenme ve E vitamini verilmesinin damar düz kas hücrelerinin sitozolik PKC ekspresyonuna etkisi.

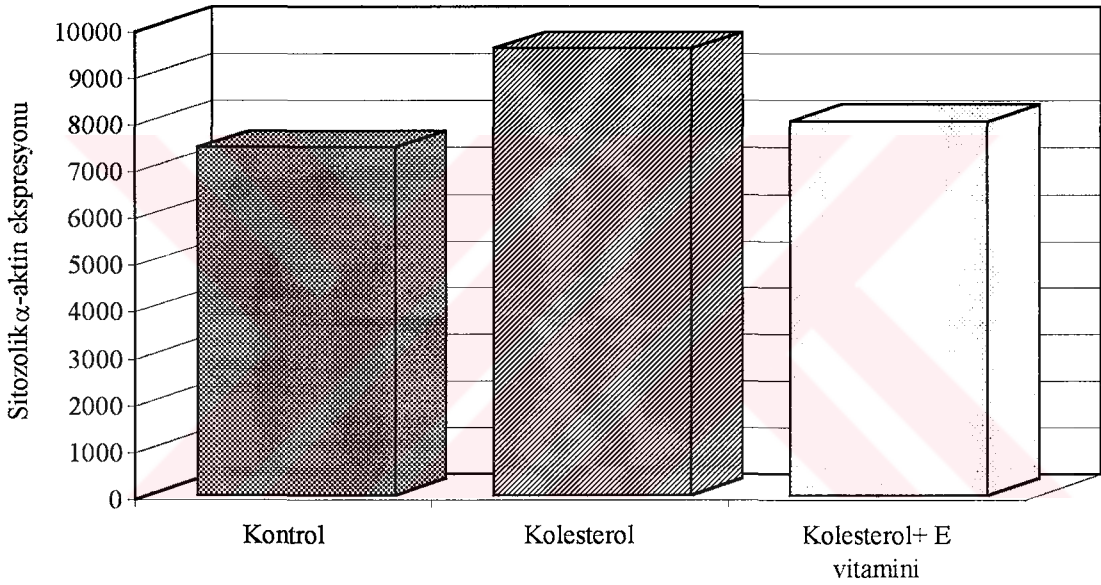
#### 4.3.4 Kolesterolde zengin diyet ve E vitamini verilmesinin damar düz kas hücresi sitozolik $\alpha$ -aktin ekspresyonuna etkisi

Kolesterol ve kolesterol + E vitamini ile beslenen gruplardaki tavşanların aorta düz kas hücrelerinin sitozolik PKC miktarlarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak arttığı gösterilmesi üzerine, bu artışın yalnızca PKC'ye mi özgü olduğu, yoksa protein sentezindeki genel bir artışı mı yansıttığını anlayabilmek için aorta homojenatlarının sitozolik fraksiyonunda damar düz kas hücresine özgü bir protein olan  $\alpha$ -aktin düzeyleri karşılaştırıldı (Tablo 4). Kontrol grubunun ortalaması  $7439.8 \pm 2652.9$ , kolesterol ile beslenen grubun ortalaması  $9558.5 \pm 1052.5$ , kolesterol + E vitamini ile beslenen grubun ortalaması ise  $8001.8 \pm 1475.6$  olarak ölçüldü. Bu sonuçlar karşılaştırıldığı zaman ise  $\alpha=0.05$  güvenlik aralığında her üç grubun ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Şekil 11).

**Tablo 4:** Sitolik protein kinaz C ve  $\alpha$ -aktin ekspresyonu ortalamaları

|  | <b>Kontrol</b>      | <b>Kolesterol</b>   | <b>Kolesterol + E vitamini</b> |
|--|---------------------|---------------------|--------------------------------|
| <b>Sitolik PKC ekspresyonu</b>                       | 635.5 $\pm$ 186.0   | 968.0 $\pm$ 263.6*  | 893.8 $\pm$ 89.0*              |
| <b>Sitolik <math>\alpha</math>-aktin ekspresyonu</b> | 7439.8 $\pm$ 2652.9 | 9558.5 $\pm$ 1052.5 | 8001.8 $\pm$ 1475.6            |

kontrol ile kıyaslandığında \* $p < 0.05$ ; ortalama  $\pm$  standart sapma



**Şekil 11:** Kolesterolde zengin diyetle beslenme ve E vitamini verilmesinin damar düz kas hücrelerinin sitozolik  $\alpha$ -aktin ekspresyonuna etkisi.

## 5. TARTIŞMA

Ateroskleroz; yüksek kan kolesterol düzeyi, yüksek LDL / HDL oranı, hipertansiyon, sigara içimi, sedanter yaşam tarzı, diyabet gibi farklı risk faktörlerinin söz konusu olduğu kişilerde farklı tetikleyici mekanizmalar ile başlayabilen, ancak patogenezindeki ana mekanizma intimal proliferasyon olan bir hastalık sürecidir.

Embriyoda ve gelişmekte olan organizmada düz kas hücrelerinin proliferasyon indeksleri yüksektir ve görünüm olarak fibroblastları andırırlar; çok sayıda Golgi aparatı, ribozom ve RER gibi sentetik organeller içerirler, uyarılara sekretuar ve proliferatif yanıt verirler. Bu hücreler sentetik fenotipteki düz kas hücrelerini oluştururlar; esas görevleri çoğalmak ve hızla büyüyen organizma için gerekli hücreler arası bağ dokusunu sağlamaktır (46).

Yetişkin bir organizmada ise damar düz kas hücrelerinin proliferasyon hızları çok düşüktür ve karakteristik görünümünü kazanmışlardır; az sayıda organel içerirler, kontraktıl miyofilamanlardan zengindirler ve kimyasal ve mekanik uyarılara kasılarak yanıt verirler. Bu hücreler kontraktıl fenotipteki düz kas hücrelerini oluştururlar; esas görevleri kasılmak ve damar duvarının tonusunu ayarlayarak dolaşımın düzenlenmesine aracı olmaktır (82).

Damar düz kas hücrelerinin organizmanın büyüme ve gelişmesi sırasında gösterdikleri bu yapısal ve işlevsel değişiklikler sentetik fenotipten kontraktıl fenotipe geçiş olarak tanımlanabilir (26). Ancak yetişkin organizmada da, damar düz kas hücreleri doku onarımı sırasında, aterosklerozda ve kültür ortamında yüksek proliferasyon hızı ve sentetik fenotip sergileyebilirler. Bu fenotip modülasyonu, hücre çoğalması için bir gerekliliktir (20). Bu modülasyonun aterosklerozdaki önemi, sentetik fenotipteki hücrelerin mediadan intimaya göç edebilmelerinde, büyüme dönemindeki gibi artmış miktarlarda hücreler arası bağ dokusu sentezleyebilmelerinde ve çoğalarak aterosklerozda klinik bulgulara yol açan ana mekanizma olan intimal kalınlaşmaya ve obstrüksiyona neden olabilmelerinden kaynaklanmaktadır.

Deneysel olarak hiperkolesterolemik yapılan hayvanlarda görülen aterosklerotik lezyonların insanlardaki aterosklerotik lezyonlar ile nerede ise aynı olduğu çeşitli

araştırmacılar tarafından primat, tavşan, domuz gibi turler üzerinde gsterilmiştir (12,14). Kolesterol ile besleme, -aynı endotel zararlanması gibi- damar duvarında bazı metabolik değişikliklere neden olmakta; hcreler arası matriks miktarı artmakta, sentetik organellerinin sayısı artmış dız kas hcreleri ve bu hcrelerde bulunan bazı enzimlerin aktivitelinde de değişiklikler gzlennmektedir (20). Tavşanlarda deneysel koşullarda oluşturulan hiperkolesterolemi ile aterosklerotik lezyon oluşumu arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışmada, tavşanları 60 gın süre ile % 2 kolesterol içeren diet ile beslemenin histolojik ve biyokimyasal olarak insanlardaki lezyonlara benzeyen ve tekrarlanabilir aterosklerotik lezyonların oluşturulabilmesi için yeterli olduğu gsterilmiştir (83). Bu çalışmada biz de, ateroskleroz modelini oluşturabilmek için tavşanları 8 hafta süre ile günde % 2 (w/w) kolesterolden zenginleştirilmiş 100 g tavşan yemi ile besledik. Deney suresinin sonunda kolesterol verilen gruptaki tavşanların kan kolesterol dizeylerinin, kontrol grubundaki tavşanların kan kolesterol dizeylerinden istatistiksel olarak farklı (sırası ile  $p<0.01$  ve  $p<0.001$ ) bulunması, bizim diete eklediğimiz kolesterol dozunun ve bu dieti uyguladığımız surenin tavşanları hiperkolesterolemik yapmak için yeterli olduğunu gstermektedir.

Mikroskopi sonuçlarında açıkça gdrldüğü gibi, kolesterol verilen tavşanlarda endotel tabakasının bozulduğu, yer yer aralarının açılarak altta yatan intima tabakasının ortaya çıktığı, bazı bdlgelerde yaygın trombus alanlarının bulunduğu ve daha bdyk bdytmelerde bu bdlgelerin bir fibrin ağı ile kaplı olduğu, intimanın belirgin olarak kalınlaştığı, kdpk hcrelerin oluştuğu, ve media tabakasında dız kas hcreleri arasında da yer yer lipid damlacıklarının bulunduğu gzlendi. Bu gruptaki rneklerin TEM incelemesinde dız kas hcrelerinin kontraktıl filamanlarını kaybettiği, sentetik organellerden zenginleştiği de gdrlmektedir. Bu bulgular bize bu gruptaki tavşanlarda tip III ve tip IV aterosklerotik lezyonların oluştuğunu ve dız kas hcrelerinin sentetik fenotipe modulasyonlarının gerçekleştiğini gstermektedir.

Kolesterol + E vitamini grubundaki tavşanlar ise aynı Şekilde 8 hafta süre ile günde % 2 (w/w) kolesterolden zenginleştirilmiş 100 g tavşan yemi ile beslenmiş ve ek olarak 50 mg/kg kas içi E vitamini injeksiyonu yapılmıştır. Bu gruptaki rneklerin endotel tabakasının daha dızgün olduğu, açık alanların bulunmadığı, trombosit tutunmasının

ve fibrin ağının çok daha az olduğu, intimal kalınlaşmanın olmadığı veya minimal olduğu, intimada veya mediada köpük hücrelerin görülmediği, media tabakasındaki elastik liflerin ondülasyonların ise normal olduğu gözlemlendi. Bu bulgular E vitamini desteğinin hiperkolesterolemik denekleri aterosklerotik lezyon gelişiminden histolojik ve morfolojik kriterler açısından çarpıcı bir şekilde koruduğunu ve düz kas hücrelerinin kontraktıl fenotiplerini önemli ölçüde değiştirmedeğini göstermektedir.

Dietin çeşitli besin maddeleri açısından içeriğinin ateroskleroz riskini belirleyen faktörlerden birisi olduğu bilinmektedir. Bunlardan dietin çok ve tek doymamış yağ asiti içeriği, Selenyum, A vitamini, C vitamini, karoten ve E vitamini içeriği üzerinde en çok durulmuş olanlardır. E ve C vitaminlerinin kronik marjinal eksiklerinin deney hayvanları ve insanlarda arteriyoskleroz benzeri lezyonlar oluşturduğu bildirilmiştir (10). E vitamininin kolesterol ile beslenen primatlarda aorta ateromatozunu ve karotid arter stenozunu azalttığı bilinmektedir (67). Gey ve Moser, diyetle verilen E vitamininin WHHL tavşanlarında aortadaki plak alanını küçülttüğünü bildirmiştir (10). Farklı risk faktörlerinin değişik toplumlardaki ağırlığını ve bu toplumlardaki antioksidan vitaminlerin ve çok doymamış yağ asitlerinin miktarını belirlemeyi amaçlayan WHO / MONICA projesinde, farklı kültürler arasında koroner kalp hastalığı mortalitesinin en güçlü ters orantılı belirteçinin E vitamini düzeyi olduğu gösterilmiştir (84). 1991'de yayınlanan ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından desteklenen epidemiyolojik bir çalışmada, düşük kan E vitamini düzeyinin bazı toplumlarda iskemik kalp hastalığından ölüm için en önemli risk -yüksek kolesterol, hipertansiyon veya sigaradan daha önemli- olduğu gösterilmiştir (66).

E vitamininin aterosklerozdaki bu koruyucu etkisi genellikle antioksidan etkilerine bağlanmıştır. E vitamini hücre zarlarındaki yağ moleküllerinin arasında ve dolaşımdaki düşük dansiteli lipoproteinlerin dış fosfolipid tabakası üzerinde bulunur. Her lipoprotein molekülü üzerinde 6 -10 E vitamini bulunduğu düşünülmektedir. E vitamini bulunduğu yerlerde metabolizma sırasında oluşan radikalleri ve oksidasyon ürünlerini tutar (65). Okside LDL'in endotel zararlanmasına neden olması ve aterosklerozda gözlenen ilk değişiklik olan okside LDL'in makrofajlarca alınarak köpük hücre oluşumuna katkıda bulunması nedeni ile, E vitamini de dahil olmak üzere



çeşitli antioksidanların plazma lipoproteinlerini ve/veya damar düz kas hücrelerini serbest radikal hasarından koruyarak aterosklerotik süreci önleme veya yavaşlatmadaki rolleri bilinmektedir. Bu yüzden LDL oksidasyonu sırasında E vitamini ilk tükenen antioksidandır (85) ve özellikle çok doymamış yağ asitlerinden zengin olan yerlerin ve oksijen ile direk temas eden dokuların oksidan hasardan korunmasında önemlidir. Çok doymamış yağ asitleri düzeyi yüksek olupta onları lipid peroksidasyonundan koruyacak düzeyde yeterli antioksidan maddeleri olmayan kişilerin ateroskleroz riskinin daha yüksek olduğu düşünülmektedir. E vitamininin bu koruyucu rolü çok çeşitli aşamalarda ve hedefler üzerinde olabilir. Dolaşımdaki lipoproteinler, endotel hücreleri, intimadaki proteoglikan yapı, organizmanın inflammatuvar yanıtı, monosit - makrofajlar, düz kas hücreleri, fibroblastlar, miyokardiyal işlev bozuklukları, trombositler ve pıhtılaşma faktörleri bunlardan en çok bilinenlerdir (10). Bizim mikroskopi sonuçlarımız literatürdeki bir çok epidemiyolojik ve deneysel çalışma ile uyum göstermektedir (7,8,10,67,86,87).

Hücre proliferasyonunu uyaran sinyallerin hücre zarındaki reseptörlerine bağlanması hücre içi ikinci ulakların oluşmasına yol açar. Bu ulaklar ise çeşitli protein kinaz ve fosfatazları aktive ederler. Bu enzimlerin çeşitli hücre içi proteinleri fosforile veya defosforile etmesi ile bu proteinlerin biyolojik aktivitelerinin post-translasyonel ve geçici olarak modüle edilebilmesi mümkün olur. Çeşitli hücre dışı sinyallerin, düz kas hücre zarında yer alan özgün reseptörlerine bağlanarak PI-PLC'yi aktive etmesi sonucunda  $PIP_2$  hidrolizi ve hücre içi ikinci ulaklar olan  $IP_3$  ve DAG oluşur. Lipofilik olan DAG zar üzerinde kalarak PKC'nin aktivasyonunda rol alır, uygun uyarılma sonucunda PKC sitozolden hücre zarına transloke olur, böylece kofaktörler ulaşılabilir bir hale gelir ve enzimin aktivasyonu sağlanır (41). PKC'nin aktivasyonu ise hücre içi haberleşmede, mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAP kinase) aktivitesinin uyarılması, transkripsiyonel ve translasyonel mekanizmadaki AP-1 ve NF- $\kappa$ B gibi çeşitli transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu gibi bir dizi olaylar zincirini başlatır (62,63). Bir transkripsiyon faktörünün fosforilasyonu onun DNA'ya bağlanma aktivitesini, transkripsiyonel aktivitesini veya hücre içi lokalizasyonunu değiştirebilir (88). Bu olaylar ilk sinyalin amplifikasyonuna ve hem transkripsiyonel hem de



translasyonel düzeyde gen ekspresyonunu değişmesine neden olur. Tüm bu veriler protein kinaz C'nin düz kas hücrelerinin pek çok dış uyarana yanıtı ve kendi metabolik ve gelişimsel ihtiyaçlarının gereği düzenlemeleri yaparken hücre içi sinyal iletilisinde bir kavşak enzim olduğunu göstermektedir. PKC'nin pek çok hücre tipinin proliferasyonu ve farklılaşmasında rolü olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (49).

$\alpha$ -Tokoferol'ün antioksidan özelliklerinden bağımsız olarak, düz kas hücrelerinin büyümesini baskılayan direk bir etkisi olduğu, bu sırada PKC'nin aktivasyonunun baskılandığı da hücre kültürlerinde gösterilmiştir (23,70,71).  $\alpha$ -Tokoferol kültür ortamında düz kas hücrelerinin çoğalmasını belirgin olarak baskılayan,  $\alpha$ -tokoferol ile aynı antioksidan etkinlik potansiyeline sahip olan  $\beta$ -tokoferol hücre çoğalmasını baskılamamaktadır. Çoğalmayı baskılamadaki bu fark iki molekülün hücre içine farklı miktarlarda alınmasından da kaynaklanmamakta, üstelik membran peroksidasyonunu  $\alpha$ -tokoferolden çok daha fazla oranda baskılayan  $\alpha$ -tokotrienol, düz kas hücreleri üzerinde  $\alpha$ -tokoferol ile aynı oranda antiproliferatif etki göstermektedir (61). d- $\alpha$ -Tokoferol'ün gösterdiği antiproliferatif etki hücre tipine özgüdür ve çoğalmayı uyarmak için kullanılan mitojene göre de farklılık gösterir, ancak bu etki, pek çok düz kas hücre tipi için geçerlidir (72).

Özer ve beraberindekiler (23), insan ve sıçan kaynaklı düz kas hücre kültürlerinde LDL'nin büyüme faktörü gibi etki gösterdiğini, hücre proliferasyonunu PKC aktivitesini artırarak uyardıklarını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada d- $\alpha$ -tokoferolün bu hücrelerin LDL ile aktive olan proliferasyonunun PKC aktivitesinin inhibisyonu ile engellendiği de gösterilmiştir. Bu bilgilerin ışığı altında çalışmamızda hiperkolesteroleminin düz kas hücre proliferasyonuna etkisinin moleküler temelini in vivo şartlarda incelemek amacı ile PKC enziminin aktivitesini hücrenin sitozolik ve membran fraksiyonlarında ölçtük. Kolesterol verilmesinin bu hücrelerde PKC aktivitesini her iki fraksiyonda da artırdığını gözledik. Ancak, protein kinaz C'nin aktivasyonu sırasında sitozolden membrana transloke olduğu bilinmektedir (41,89). Biz de, ölçülen PKC aktivitelerinin, PKC'nin sitozolden membrana translokasyonunu yansıtmayı yansıtmadığını belirleyebilmek için her tavşanın düz kas hücre membranındaki

PKC aktivitesini total PKC aktivitesine oranlandık. Grupların bu oranları karşılaştırıldığı zaman her üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gördük.

Bu sonuçlar bize bu deneysel ateroskleroz modelinde kolesterol veya kolesterol + E vitamini alan tavşanların damar düz kas hücrelerinin gerek total, gerekse sitozolik ve membran fraksiyonundaki PKC aktivitelerinin kontrol grubuna kıyasla yüksek çıkmasının kompartmanlar arasında translokasyon nedeni ile olmadığını göstermektedir.

Kolesterol ile beslenen gruplardaki gerek sitozolik ve membran fraksiyonlarındaki PKC aktivitesinin gerekse total PKC aktivitesinin kontrol grubundan yüksek çıkması üzerine, bunun hücre içerisindeki PKC'nin aktive olmasından mı yoksa bu proteinin sentezinin artmasından mı kaynaklandığını anlayabilmek için sitozolik ve membran fraksiyonlarına ait homojenatlardaki PKC ekspresyonu "immunoblotting" ile değerlendirildi.

Kolesterol ve kolesterol + E vitamini verilen gruplardaki PKC ekspresyonunun kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksek olduğu görüldü ( $p < 0.05$ ). E vitamini verilen hiperkolesterolemik tavşanların aorta düz kas hücrelerindeki gerek sitozolik ve membran fraksiyonlarındaki PKC aktivitesinin, gerekse hücrenin total PKC aktivitesinin, E vitamini almayan hiperkolesterolemik tavşanların PKC aktivitesinden hep düşük olma eğilimi gösterdiği gözlemlendi. E vitamini alan grubun PKC aktivitelerinde görülen bu baskılanma eğilimi, PKC ekspresyonunda da görüldü.

Bu sonuçlar bize, aterosklerozda düz kas hücrelerinin proliferasyonunu sağlayan uyarının hücre içindeki sinyal iletilişinde PKC'nin rol aldığını, ancak bunun yalnızca enzimin aktivasyonu ile değil, aynı zamanda hücre içindeki PKC ekspresyonunun artması ile de olduğunu ilk kez ex vivo olarak göstermektedir.

Kolesterol ile aktive edilen hücre içi PKC ekspresyonundaki artışın PKC'ye mi özgü olduğu, yoksa protein sentezindeki genel bir artışın bir parçası mı olduğunu anlamak için grupların sitozolik fraksiyonlarında düz kas hücresine özgü bir protein olan

aktin içerikleri karşılaştırıldı ve her üç grubun  $\alpha$ -aktin içeriği arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Bu da, kolesterol ile beslenen gruplarda gözlenen PKC ekspresyonundaki artışın genel bir protein sentezi artışından kaynaklanmadığını, düz kas hücrelerinde spesifik olarak PKC ekspresyonunun arttığını göstermektedir.

Bütün verileri göz önüne alınca, kolesterolden zengin dietle beslenme düz kas hücrelerinin PKC aktivitelerini ve ekspresyonlarını artırmakta, hücrelerin fenotipik görüntülerini değiştirmekte, proliferasyonlarına ve bunun sonucunda aterosklerotik lezyonların -tüm evreleri ile- oluşmasına neden olmaktadır. Denekleri E vitamini ile desteklemek ise, PKC ekspresyonundaki bu artışı kısmen azaltmaktadır. Baskılanma oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da, tüm parametrelerde aynı eğilim görülmektedir. Ancak, E vitaminin koruyucu etkisi histolojik parametrelerde çok daha çarpıcı bir şekilde ortaya çıkmaktadır. E vitamini desteği alan grupta intimal kalınlaşma hemen hemen hiç görülmemekte, media tabakasındaki elastik liflerin yapısı korunmakta ve köpük hücreler gözlenmemektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma aterosklerozda risk faktörlerinden birisi olan hiperkolesteroleminin damar düz kas proliferasyonunu artırdığını ve bu sırada görülen biyokimyasal değişikliklerden birisinin PKC ekspresyonu ve aktivitesindeki artış olduğunu ilk kez *ex-vivo* olarak kanıtlamaktadır. E vitamininin düz kas hücrelerinde proliferasyon sinyallerinin hücre içi iletilişinde kısmen etkili olduğunu göstermekle birlikte bu konu ile ilgili çalışmalarımız devam etmektedir.

## 6. ÖZET

Ateroskleroz, farklı risk faktörleri tarafından tetiklenebilen ve düz kas hücrelerinin mediadan intimaya göç ederek çoğalmaları sonucunda intima tabakasının kalınlaşması ile seyreden bir hastalıktır. Ateroskleroza tetikleyen en önemli risk faktörlerinden birisi hiperkolesterolemidir.

Protein kinaz C düz kas hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasına ait sinyallerin iletilmesinde kavşak rolü oynayan bir enzimdir. PKC'nin aktivasyonu ise MAP kinaz, AP-1, NF- $\kappa$ B gibi çeşitli enzimleri ve transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonuna ve aktivasyonuna neden olur.

E vitamininin bir antioksidan olarak kalp damar hastalıklarından koruyucu rolü bilinmektedir. Son yıllarda, d- $\alpha$ -tokoferol'ün düz kas hücre çoğalmasını ve protein kinaz C aktivasyonunu önlediği ve bu etkinin antioksidan özelliklerinden bağımsız olduğu hücre kültürlerinde gösterilmiştir.

Biz de, düz kas hücre proliferasyonu ile PKC arasında in vitro olarak gösterilen bu ilişkinin deneysel bir ateroskleroz modelinde gözlenip gözlenmeyeceğini in vivo olarak araştırmayı ve E vitamininin in vitro olarak gösterilen antiproliferatif etkisinin bu modelde gözlenip gözlenmeyeceğini ve bu etkinin PKC üzerinden olup olmadığını araştırmak için 1. gruptaki tavşanları normal pelet yem ile, 2. gruptaki tavşanları kolesterolden zengin yem ile, 3. gruptaki tavşanları kolesterolden zengin yem ile besledik ve i.m. E vitamini enjeksiyonları yaptık. Deney süresinin sonunda tavşanları feda ederek aortalarını çıkardık, serum ve mikroskopik inceleme için örnekler aldık.

Mikroskopik incelemelerde 1. grupta normal arter duvarı bulunduğunu, 2. grupta çok belirgin bir intimal proliferasyon olduğunu, endotel yüzeyinin bozulduğunu ve hücrelerin kontraktıl filamanlarını kaybederek sentetik organellerden zenginleştiğini, 3. grupta ise, intimal proliferasyonun hemen hiç olmadığını, endotel yüzeyinin daha düzgün olduğunu ve hücrelerin daha fazla miyofilaman , daha az sentetik organel içerdiğini gördük.

Kolesterol ile beslenen gruplardaki tavşanların total, sitozolik ve membran PKC

aktivitelerinin arttığını gördük. Membrandaki PKC aktiviteleri totalin %'si olarak belirtilip karşılaştırıldığı zaman üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını, daha önce ölçülen aktivite farklarının PKC'nin translokasyonunu yansıtmadığını gördük. Kolesterol ile beslenen gruplarda PKC ekspresyonunun arttığı ve bu artışın PKC'ye spesifik olduğunu gördük. E vitamini verilmesi ile PKC aktivite ve ekspresyonunun kısmen baskılanma eğilimi gösterdiğini gözledik.

Bu sonuçlar bize aterosklerozda risk faktörlerinden birisi olan hiperkolesteroleminin damar düz kas proliferasyonunu artırdığını ve proliferasyonda görülen biyokimyasal değişikliklerden birisinin PKC ekspresyonu ve aktivitesindeki artış olduğunu ilk kez *ex-vivo* olarak kanıtlamaktadır. E vitamininin düz kas hücre proliferasyonunda hücre içi sinyal iletilisinde kısmen etkili olduğunu göstermekle birlikte bu konu ile ilgili çalışmalarımız devam etmektedir.



## 7. SUMMARY

Atherosclerosis can be triggered by a multiplicity of risk factors, but its common feature is intimal thickening caused by the proliferation of smooth muscle cells which have migrated from the media. Hypercholesterolemia is one of the most important risk factors of the disease.

Protein kinase C is a pivotal enzyme which relays signals of proliferation and differentiation in smooth muscle cells. Activation of PKC causes phosphorylation and activation of various enzymes and transcription factors such as MAP kinase, AP-1 and NF- $\kappa$ B.

The protective role of vitamin E as an antioxidant in cardiovascular disease has long been recognized. Recently, d- $\alpha$ -tocopherol was shown to inhibit the PKC activity and proliferation of cultured smooth muscle cells independently of its antioxidant properties.

Our aim was to see if we could observe a parallel relation between PKC activity, smooth muscle cell proliferation and vitamin E in an in vivo model of atherosclerosis. For this purpose, three groups of rabbits were fed with regular chow, regular chow supplemented with cholesterol, and regular chow supplemented with cholesterol + i.m. injections of vitamin E. After 60 days, the rabbits were sacrificed, their aortas were removed, and blood samples were taken.

In microscopical examinations, we found that the control group had a normal artery wall, the cholesterol group had a very prominent intimal thickening, an irregular endothelial surface, and the cells had lost their contractile filaments and had increased numbers of synthetic organelles. The cholesterol + vitamin E group had minimal intimal thickening, an even endothelial surface and had less synthetic organelles and more contractile filaments.

We observed that the cytosolic, membrane and total PKC activities were increased in the cholesterol fed groups. When the membrane activities were expressed as percents of total activity, no statistical difference was observed among groups, indicating that

the observed differences of PKC activity between groups was not due to the translocation of the enzyme in the cell. We also observed that the expression of the enzyme was also increased in the cholesterol fed groups. Since there was no difference in their cytosolic  $\alpha$ -actin content, we concluded that PKC expression was specifically increased. We observed that vitamin E supplementation had only partially inhibited PKC activity and expression.

We conclude that hypercholesterolemia had induced arterial smooth muscle cell proliferation and had increased PKC activity and expression in our ex vivo model of atherosclerosis. Vitamin E was shown to partially effect the signal transduction cascade of smooth muscle cell proliferation, and further studies are carried on the subject.





## 8. KAYNAKLAR

1. Ross MH, Reith EJ, Romrell LJ. Histology: a text and atlas, 2. edition. Williams and Wilkins 283-288, 1989.
2. Sary HC. Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*, 64: 91-108, 1987.
3. Sary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull W, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of the intima of human arteries and its atherosclerosis prone regions. *Circulation*, 85: 391-405, 1992.
4. Sary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J*, 11 (Suppl E): 3-19, 1990.
5. Sary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. *Circulation*, 89: 2462-2478, 1994.
6. Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis*. 9 (suppl I): I-19 - I-32, 1989
7. Steinberg D. Antioxidants and atherosclerosis. A current assessment. *Circulation* 84: 1420-1425, 1991.
8. Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G, Cuccurullo F. Aortic antioxidant defence mechanisms: time related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 81: 127-135, 1990.
9. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 88: 1785-1792, 1991.
10. Gey KF. "Vitamin E and other essential antioxidants regarding coronary heart disease: Risk assessment studies" in *Vitamin E in Health and Disease*. Eds Packer L. Fuchs J. Marcel Dekker Inc. 589-633, 1992.
11. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis- an update. *N Eng J Med*, 314: 488-500, 1986.

12. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 362: 801-809, 1993.
13. Nilsson J. Growth factors and the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 62: 185-199, 1986.
14. Mora R, Lupu F, Simionescu N. Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis*, 67: 143-154, 1987.
15. Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M. Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol*, 123: 109-125, 1986.
16. Simionescu M, Simionescu N. Proatherosclerotic events: pathobiochemical changes occurring in the arterial wall before monocyte migration. *FASEB J*, 7: 1359-1366, 1993.
17. Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R. Fatty streak initiation in the Watanabe Heritable Hyperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis*, 7: 9-23, 1987.
18. Hajjar DP, Pomerantz KB. Signal transduction in atherosclerosis: integration of cytokines and the eicosanoid network. *FASEB J*. 6: 2933-2941, 1992.
19. Tsubamoto Y, Yamada N, Watanabe Y, Inaba T, Shiomi M, Shimano H, Gotoda T, Herada K, Shimada M, Ohsuga J, Kawamura M, Yazaki Y. Dextran sulfate, a competitive inhibitor for scavenger receptor, prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe Heritable Hyperlipidemic rabbits. *Atherosclerosis*, 106: 43-50, 1994.
20. Campbell GR, Campbell JH. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: Implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*, 42: 139-162, 1985.

21. Campbell JH, Reardon MF, Campbell GR, Nestel PJ. Metabolism of atherogenic lipoproteins by smooth muscle cells of different phenotype in culture. *Arteriosclerosis*, 5: 318-328, 1985.
22. Penn MS, Chisolm GM. Oxidized lipoproteins, altered cell function and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 108 (Suppl): S21-S29, 1994.
23. Özer NK, Palozza P, Boscoboinik D, Azzi A. d- $\alpha$ -Tocopherol inhibits low density lipoprotein induced proliferation and protein kinase C activity in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 322: 307-310, 1993.
24. Parthasarathy S, Young SG, Witztum JL, Pittman RC, Steinberg D. Probucol inhibits oxidative modification of low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 77: 641-644, 1986.
25. Hoff HF, Wagner WD. Plasma low density lipoprotein accumulation in aortas of hypercholesterolemic swine correlates with modifications in aortic glycosaminoglycan composition. *Atherosclerosis*, 61: 231-236, 1986.
26. Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 59: 1-61, 1979.
27. Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem*, 180: 487-502, 1989.
28. Dessouky DA. Electron microscopic studies of the myometrium of the guinea pig. The smooth muscle cells of the myometrium before and during pregnancy. *Amer J Obstet Gynecol*, 100: 30-41, 1968.
29. Chamley JH, Campbell GR. Mitosis of contractile smooth muscle cells in tissue culture. *Exp Cell Res*, 84: 105-110, 1974.
30. Dilley RJ, McGeachie JK, Prendergast FJ. A review of the proliferative behaviour, morphology and phenotypes of vascular smooth muscle. *Atherosclerosis*, 63: 99-107, 1987.
31. Seifert RA, Schwartz SM, Bowen-Pope DF. Developmentally regulated production of platelet-derived growth factor-like molecules. *Nature*, 311: 669-675,

1984.

32. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab. Invest.* 49: 208-215, 1983.

33. Gabbiani G, Kocher O, Bloom WS, Vanderkerckhove J, Weber K. Actin expression in smooth muscle cells of rat aortic intimal thickening, human atheromatous plaque and cultured rat aortic media. *J Clin Invest*, 73: 148-152, 1984.

34. Libby P, Warner SCJ, Friedman GB. Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *J Clin Invest*, 81:487-498, 1988.

35. Ferns GAA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*, 253: 1129-1132, 1991.

36. Raines EW, Dower SK, Ross R. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science*, 243: 393- 396, 1989.

37. Rutherford RB, Ross R. Platelet factors stimulate fibroblasts and smooth muscle cells quiescent in plasma serum to proliferate. *J Cell Biol*, 69: 196-203, 1976.

38. Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. The biology of platelet-derived growth factor. *Cell*, 46: 155-169, 1986.

39. Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN, Francke U ve ark. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature*, 323: 226-232, 1986.

40. Heldin CH, Backstrom G, Ostman A, Hammacher A, Ronnstrand L, Rubin K, Nister M, Westermark B. Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two receptor types. *EMBO J*, 7: 1387-1393, 1988.

41. Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*, 233: 305-312, 1986.

Science, 243: 1564-1570, 1989.

43. Whitman M, Cantley L. Phosphoinositide metabolism and the control of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta*, 948: 327-344, 1988.

44. Grinstein S, Rotin D, Mason MJ.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim Biophys Acta*, 988: 73-97, 1989.

45. Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eucaryotic cells. *Free Radic Res Commun*, 17: 221-237, 1992.

46. Thyberg J, Hedin U, Sjölund M, Palmberg L, Bottger BA. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, 10: 966-990, 1990.

47. Raines EW, Ross R. Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J*, 69(Suppl.): S 30-S 37, 1993.

48. Andrea JE, Walsh MP. Protein kinase C of smooth muscle. *Hypertension* 20: 585-595, 1992.

49. Clemens MJ, Trayner I, Menaya J. The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J Cell Sci*, 103: 881-887, 1992.

50. Azzi A, Boscoboinik D, Hensey C. The protein kinase C family. *Eur J Biochem*, 208: 547-557, 1992.

51. Kikkawa U, Kishimoto A, Nishizuka Y. The protein kinase C family: Heterogeneity and its implications. *Ann Rev Biochem*. 58: 31-44, 1989.

52. Assender JW, Kontny E, Fredholm BB. Expression of protein kinase C isoforms in smooth muscle cells in various states of differentiation. *FEBS Lett*, 342: 76-80, 1994.

53. Coussens L, Parker PJ, Rhee L, Yang-Feng TL, Chen E, Waterfield MD, Francke U, Ullrich A. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest cellular signaling pathways. *Science* 233: 859-866, 1986

54. Berg JM. Zinc fingers and other metal-binding domains. *J Biol Chem.* 265: 6513-6516, 1990.
55. House C, Kemp BE. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science.* 238: 1726-1728, 1987.
56. Cazaubon S, Webster C, Camoin L, Strosberg AD, Parker PJ. Effector dependent conformational changes in protein kinase C through epitope mapping with inhibitory monoclonal antibodies. *Eur J Biochem.* 194: 799-804, 1990.
57. Ferris CD, Huganir RL, Supattapone S, Snyder SH. Purified inositol 1,4,5-triphosphate receptor mediates  $Ca^{2+}$  flux in reconstituted lipid vesicles. *Nature,* 342: 87-89, 1989.
58. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature,* 334: 661-665, 1988.
59. Kariya K, Kawahara Y, Tsuda T, Fukuzaki H, Takai Y. Possible involvement of protein kinase C in platelet-derived growth factor-stimulated DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis,* 63: 251-255, 1987.
60. Matsumoto H, Sasaki Y. Staurosporine, a protein kinase C inhibitor interferes with proliferation of arterial smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun,* 158: 105-109, 1989.
61. Chatelain E, Boscoboinik DO, Bartoli GM, Kagan VE, Gey FK, Packer L, Azzi A. Inhibition of smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity by tocopherols and tocotrienols. *Biochim Biophys Acta,* 1176: 83-89, 1993.
62. Adams PD, Parker PJ. TPA induced activation of MAP kinase. *FEBS Lett,* 290: 77-82, 1991.
63. Morley SJ, Dever TE, Etchison D, Traugh JA. Phosphorylation of eIF-4F by protein kinase C or multipotential S6 kinase stimulates protein synthesis at initiation. *J Biol Chem,* 266: 4669-4672, 1991.
64. Azzi A, Boscoboinik D, Marilley D, Özer NK, Stauble B, Tasinato A. Vitamin E, a sensor and information transducer of the cell oxidation state. *J Nutr (baskıda).*

65. Jackson RL, Ku G, Thomas CE. Antioxidants: A biological defense mechanism for the prevention of atherosclerosis. *Med Res Rev* 13 (2): 161-182, 1993.
66. Gey KF, Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am J Clin Nutr*, 53: 326S-334S, 1991.
67. Verlangieri AJ, Bush M. Prevention and regression of primate atherosclerosis by d- $\alpha$ -tokoferol. *Free Rad Biol Med*, 9 (suppl. 1): 73-81, 1990.
68. Van Hinsbergh VWM, Scheffer M, Havekes L, Kempen HJM. Role of endothelial cells and their products on the modification of low-density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*, 878: 49-64, 1986.
69. Evensen SA, Galdal KS, Nilsen E. LDL-induced cytotoxicity and its inhibition by antioxidant treatment in cultured human endothelial cells and fibroblasts. *Atherosclerosis*, 49: 23-30, 1983.
70. Boscoboinik D, Szewczyk A, Azzi A.  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity. *Arch Biochem Biophys*, 286: 264-269, 1991.
71. Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A. Inhibition of cell proliferation by  $\alpha$ -tocopherol. Role of protein kinase C. *J Biol Chem*, 266: 6188-6194, 1991.
72. Azzi A, Boscoboinik D, Özer NK. "Vascular smooth muscle cells: regulation and deregulation by reactive oxygen species" in *Exercise and oxygen toxicity*. Eds Sen CK, Packer L, Hanninen O. Elsevier Science Publishers B.V. North Holland, 423-445, 1994.
73. Mahoney CW, Azzi A. Vitamin E inhibits protein kinase C activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 154: 694-697, 1988.
74. Stauble B, Boscoboinik D, Tasinato A, Azzi A. Modulation of activator protein-1 (AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and d- $\alpha$ -tocopherol in vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem*, 226: 393-402, 1994
75. Watson F, Robinson J, Edwards SW. Protein kinase C dependent and independent



activation of the NADPH oxidase of human neutrophils. *J Biol Chem* 266: 7432-7439, 1991.

76. Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma samples. *Am J Clin Nutr*, 56: 417-426, 1992.

77. Watson N.L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol*, 4: 475-478, 1958.

78. Reynolds E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain for electron microscopy. *J Cell Biol*, 7: 208-212, 1963.

79. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-271, 1951.

80. Inagaki M, Gonda Y, Nishizawa K, Kitamura S, Sato C, Ando S, Tanabe K, Kikuchi K, Tsuiki S, Nishi Y. Phosphorylation sites linked to glial filament disassembly in vitro locate in a non- $\alpha$ -helical head domain. *J Biol Chem*, 265: 4722-4729, 1990.

81. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227; 680-685, 1970

82. Webster WS, Bishop SP, Geer JC. Experimental aortic thickening, Part 1 (Morphology and source of intimal cells) *Amer J Path* 76 : 245- 1974.

83. Bocan TMA, Mueller SB, Mazur MJ, Uhlendorf PD, Brown EQ, Kieft KA. The relationship between the degree of dietary-induced hypercholesterolemia in the rabbit and atherosclerotic lesion formation. *Atherosclerosis*, 102: 9-22, 1993.

84. Gey KF, Puska P. Plasma vitamins E and A inversely related to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Ann N Y Acad Sci*, 570: 268-282, 1989.

85. Cazzolato G, Avogaro P, Bittolo-Bon. Characterization of a more electronegatively charged LDL subfraction by ion exchange HPLC. *Free Rad Biol Med*, 11:247-253, 1991.

86. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, Colditz GA, Rosner B, Willet WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *N Engl J Med*, 328: 1444-1449, 1993.
87. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, Giovannucci E, Colditz GA, Willet WC. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med*, 328: 1450-1456, 1993.
88. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, 1072: 129-157, 1991.
89. Sando JJ, Maurer MC, Bolen EJ, Grisham CM. Role of cofactors in protein kinase C activation. *Cell Sign*, 4: 595-609, 1992.

