

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ATEROSİKLEROZİS'E PROTEOMİK YAKLAŞIMLAR

Çağrı GÜMÜŞTEKİN

**Danışman Öğretim Üyesi
Yrd. Doç. Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP**

ANKARA

2009

ATEROSİKLEROZİS'E PROTEOMİK YAKLAŞIMLAR

ÖZET

Aterosklerosis koroner arteri hastalıklarıyla, yüksek tansiyonla, diyabet ve vaskülit patojeniyle bağlantılı önemli hastalıklardan biridir. Aterosklerotik vasküler yapıda lipit parçacıklarının birikimiyle birlikte ilerleyen enflamatuvar tepki şeklinde kendini gösterir, bu da endotelin aktivasyonunun, adhezyon moleküllerinin, sitokinlerin ve kemokinlerin artmasına neden olur. Aynı zamanda in vitro ortamda yapılan çalışmalar dolaşım sistemindeki monositler ve doku makrofajların da bu oluşum da rol aldığını göstermiştir. Damar duvarındaki endotel hücrelerle vasküler hücre yapısına uygulanan herhangi bir stres sonucu etkin hale geçen ve bağışıklık sisteminin önemli elemanları olan monosit ve makrofajların etkileşimi oldukça önemlidir. Atherosclerosis yaş, genetik ve çevre gibi faktörlerle etkileşimde olan çok fonksiyonlu bir hastalıktır. Çok faktörlü bir hastalık olan Atherosclerosis, henüz gen değişimi ve epigenetik faktörlerle açıklanmamıştır. Bu gün proteomic teknolojileri, proteinlerin global profili ve protein modifikasyonları, bireysel değişiklikleri anlamamıza ve anlatmamıza yardımcı olur.

Bu çalışmada atherosiklerozda önemli olabilecek yeni biyo-belirteçlerin tanımlanması ve yeni tedavilerin belirlenmesinde, kullanılabilir yeni yaklaşımların geliştirilmesini amaçlanmıştır. İnflamatuvar süreçte yer alabilecek yeni moleküller ve mekanizmaların tanımlanması amacıyla kontrol ve lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılarak inflamasyon modellenen endotel (HUVEC) ve THP-1 hücrelerinde öncelikle MTT ile hücre proliferasyonu ve caspase3 ile toksisite testleri yapılmıştır. Yapılan tekli ve ikili ko-kültür örnekleri ile iki boyutlu jel elektroforezinde protein profilleri değerlendirilmiştir. Bu yöntemle tespit edilen protein profil farklılıkları bioinformatik analiz programı ile değerlendirilmiştir. Değerlendirme sonucunda protein profillerinde; 24 saat süre ile LPS uygulanan endotel (HUVEC) ve THP-1 hücrelerinden oluşturulan ikili hücre ko-kültürü uygulamalarında tekli hücre kültürü uygulamalarına göre daha çok artış görülmüştür.

Anahtar Kelimeler:

Atheroskleroz, proteomik analiz, inflamasyon, makrofaj, endotel, lipopolisakkarit, lipoprotein, kokültür, apoptozis, kaspase.

PROTEOMICS APPROCHES TO ATHEROSCLEROSIS

ABSTRACT

Atherosclerosis is one of the most important diseases that is related with coronary artery diseases, high blood pressure, diabetes and most vaskulite patogenesis. Atherosclerotic action can be defined as an progressive enflamatuar period that is characterized by the accumulation of lipid particles in the vascular structure , causing the activation of endotel and increasing the wobulation of the leukocyte adhesion molecules, cytokinins and kemokinins .Also monocytes and tissue macrofage in the ciculatory system taken to the medium are involved in the process. The interaction of endothelial cells in the vessel wall and monocyte/macrofages in vascular circulation , an important component of immune response and which are activated in the case of any stress with the vascular cell structure is very important. Atherosclerosis is a multifactor disease that occurs with the interaction between such factors as age, genetics and environment. Atherosclerosis a multifactor disease, has not been explained through gene changes and the epigenetic factors yet. Today advanced proteomic technologies, global profiles of proteins and protein modifications help us to understand and explain individual differences.

In this study, it is aimed to find out new bio-markers and development of new diagnosis and treatment methods which may play a role in atherosiklerosis. In order to identify new molecules and mechanisms that can be involved in inflammatory process, cell proliferation and toxic test are carried out on Endothel and THP-1 cells which are stimulated by LPS and control and determined with MTT and appoptosis determined with caspase3 levels .The protein profiles have been analyzed by the help of 2D electrophoresis and one and two layered co-culture samples. Protein profiles differences determined by this method are evaluated through the bio informatics analysis program. These analysis show that there is much increase in protein profiles of the two layered co-culture specimen consisting of endotel (HUVEC) and THP-1 cells which are exposed to LPS for 24 hours when compared to one layered co-culture samples.

Keywords:

Atherosklerois, proteomic analysis, inflammation, macrophages, endothelial cells, lipopolysaccaride, lipoprotein, coculture, apoptosis, caspase

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgisini, tecrübesini ve desteğini esirgemediğim yanımda olan ve yol gösteren değerli danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. F. Duygu ÖZEL DEMİRALP'E

Tez çalışmamı destekleyen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne

Tez çalışmamda kullandığım ko-kültür örneklerini ve materyallerini sağladıkları için Sayın Doc. Dr. Nuray YAZIHAN'A ve ekibine

Tez çalışmamı Genç Katılımcı Ödülü ile destekleyen Türk Hematoloji Derneği'ne

Tez yazım aşamasındaki yardımları ve tavsiyeleri için hocam Dr. S.Mitchell HALLORAN'a ve arkadaşlarım Tuba İNANÇ GÖK, Zehra YENİCE, Meral ALTUNER ve Buket GÜLTEKİN'e

Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Öğretim Üyelerine ve Merkez laboratuvarı personeline

Hayatım boyunca beni her konuda destekledikleri ve her zaman yanımda oldukları için çok değerli aileme sonsuz teşekkürler.

Çağrı GÜMÜŞTEKİN

Ekim,2009

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. KURUMSAL TEMELLER	2
2.1.Ateroskleroz Nedir?	2
2.1.1.Lipoprotein	4
2.2. Aterosklerotik Hastalıklar Ve Epidemiyolojisi	5
2.3. Ateroskleroz Etyopatolojisi	10
2.4. Ateroskleroz Ve Epigenetik	13
2.4.1 Proteomiksin Atheroskleroz Patojenezinde Kullanımı	14
2.4.2.Aterosklerozda Sitokin ve Kemokinlerin Görevleri	16
2.4.2.1.Doğuştan Edinilmiş Bağışıklıkta Rol Alan Sitokinler	17
2.4.2.2 Sonradan Edinilmiş Bağışıklıkta Rol Alan Sitokinler	24
2.4.3.Hematopoezde Rol Alan Sitokinler	27
2.4.5. Aterosklerozda Apoptozisin Yeri	30
3.MATERYAL VE YÖNTEM	33
3.1 Materyal	33
3.2 Yöntem	33
3.2.1.Hücre Kültürü	33
3.2.2.Proliferasyon Değerlendirilmesi	34
3.2.3.Apoptosis Değerlendirilmesi	35
3.3.1. Bradford Yöntemleri İle Protein Miktar Tayini	35
3.3.2. Rehidratasyon	35
3.3.3 İzo Elektrik Odaklama (IEF)	36
3.3.4. İki Boyutlu Jel Elektroforezi İle Protein Profillenmesi	37
3.3.4.1. Boyama Ve Görüntüleme	37
3.4.1. İstatistiksel Analiz	37
4. BULGULAR VE SONUÇ	37
4.1.MTTTesti	38

4.2. Caspase-3 Testi	38
4.3. Endotel- Lps Endotel 2D-PAGE Analizi	40
4.4. THP-LPS THP 2D-PAGE Analizi	41
4.5. ENDOTEL-THP-1 ve LPS ENDOTEL-THP-1 2D-PAGE Analizi	43
5.TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Damar içersinde erken lezyon ve ilerlemiş lezyon mekanizması.	4
Şekil 2. 2. Hücre içindeki apoptozis oluşum mekanizmalar.	29
Şekil 3.2.1.1 Ko-kültürde Transwell filtre kullanımı	34
Şekil 4.1.1 Zamana ve hücre sayısına bağlı MTT analizi.	38
Şekil 4.2.1. Kaspaz-3 analizi.	38
Şekil 4.3.1 (A)Endotel hücreleri ve (B) 24 saat LPS uygulanan Endotel hücrelerinin 2D-PAGE analizi.	39
Şekil 4.3.1. Endotel hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan Endotel hücrelerinin 2D-PAGE analizini gösteren grafik görüntüleri.	40
Şekil 4.4.1 (A)Monosit hücreleri ve (B) 24 saat LPS uygulanan monosit hücrelerinin 2D-PAGE analizi.	41
Şekil 4.4.2 Monosit hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan Monosit hücrelerinin 2D-PAGE analizini gösteren grafik görüntüleri.	42
Şekil 4.5.1. (A) Endotel ve Monosit hücreleri ve (B) 24 saat LPS uygulanan Endotel ve Monosit hücrelerinin 2D-PAGE analizi.	42
Şekil 4.5.2 Endotel ve Monosit hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan Endotel ve Monosit hücrelerinin 2D-PAGE analizini gösteren grafik görüntüleri.	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge-2.4.2.1 Doğuştan ve sonradan edinilmiş sitokinler	17
Çizelge-2.4.2.1.1- Doğuştan edinilmiş bağışıklıkta rol alan sitokinler.	17
Çizelge 2.4.2.2.1 Sonradan edinilmiş bağışıklıkta rol alan bazı sitokinler	24
Çizelge 2.4.3.1 Hematopoezde rol alan sitokinler.	27
Çizelge-2.4.5.1 Apoptozisi baskılayan ve indükleyen genler	31
Çizelge 4.3.1 Endotel hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan Endotel hücrelerinin kalitatif analizi.	40
Çizelge 4.4.1 Monosit hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan Monosit hücrelerinin kalitatif analizi	41
Çizelge 4.5.1. Endotel ve Monosit hücreleri ve (B) 24 saat LPS uygulanan Endotel ve Monosit hücrelerinin kalitatif analizi.	44

SİMGELER DİZİNİ

AFP	Alfa Feto Protein
AIF	Apoptozis-İndükleyici Faktör
AMI	Acute Myocardial Infarction
Apaf-1	Apoptotic Protease Activating Factor-1
BKİ	Beden Kitle İndeksi
bFGF	Temel Fibroblast Büyüme Faktörü
CAD	Kaspazla-Aktifleşen Deoksiribonükleaz
CMV	Chlamydia Pneumoniae, Sitomegalovirü
Dnmt	DNA Metiltransferaz
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal Bovin Serumu
ICAD	İnhibitor Of Caspase-Activated Deoxyribonuclease
IL	İnterlökin
Ig	İmmunoglobulin
IFN- α	Interferon alfa
IPG	İmmobilize polyacrylamide gel
HCl	Hidrojen Klorür
KAH	Koroner Arter Hastalığı
KKH	Koroner Kalp Hastalığı
LDL	Low Density lipoprotein
LT	Lenfotoksin
LPS	Lipopolisakkarit
M-CSF	Monosit Koloni Uyarıcı Faktör
MI	Miyokardiyal Enfarktüs
MTT	Mitokondriyel Toksikite Testi
mM	Mili Molar
NaCl	Sodyum klorür
NH ₂ HCO ₃	Ammonyum bikarbonat
NO	Nitrik Oksit
TF	Tissue Factor
THP-1	Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line
TIR	Toll-IL-1 Reseptör
TLR	Toll Like Reseptör
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PG	Prostaglandin
PMA	Phorbol 12 Myristate 13 Acetate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Elektrophoresis
TEMED	Tetramethylethylenediamine
CHAPS	3-[(3-Kholamidopropyl)dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonat
Tris	Tris-[hydroxymethyl]aminomethane
IEF	Isoelektrik odaklama

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklar gerek dünyada gerekse ülkemizde en fazla mortalite ve morbidite görülen hastalık grubudur. Uzun dönem kesintisiz tedavi gerektirmesi, tüm dünya genelinde baktığımızda ciddi bir ekonomik sağlık yükünü oluşturması, çoğu etiyojisi aslında tam olarak aydınlatılamamışına bağlı tedavi modalitelerinin sürekli değişmesi ve tam etkin kalıcı bir tedavinin olmaması bu tür patolojilerin altında yatan mekanizmalara yönelik çalışmaların önemini vurgulamaktadır. Sistem, organ, hücre ve moleküler düzeyde farklı etkenlere bağlı değişimlerin belirlenmesi ile pek çok hastalığın altında yatan mekanizmalar aydınlanabilecek, yeni tanı ve tedavi modaliteleri oluşturulabilecektir. Hızla gelişen protein çalışmaları ile hücre fonksiyonuna etki edebilecek proteinlerde daha net tanımlanmaya başlamıştır. Ateroskleroz oluşumu enflamatuar vasküler hastalıklar koroner arter hastalıkları, hipertansiyon, diabet gibi birçok vaskülit patogenezinde yer almaktadır. Damar duvarında yer alan endotel hücreleri ile vasküler dolaşımda yer alan herhangi bir stres durumunda aktive olan immün cevabın en önemli komponentlerinden olan monosit ve makrofaj fonksiyonlarının vasküler hücre yapısıyla etkileşimi son derece önemlidir. Enflamatuar süreçte yer alabilecek yeni moleküller ve mekanizmaların tanımlanması yeni tedavilere öncülük edecektir. Bu çalışma kapsamında atherogenezinde önemli rolü olan enflamatuar hücre cevabının ortaya konulması amacıyla endotel ve monosit/makrofajdan oluşan kokültür modeli geliştirilmesi ve bu mekanizmada yer alması olası moleküllerden kanser, vaskulogenez ve enflamasyonda önemli rollere sahip proteinlerin olaya katılımının aydınlatılması amaçlanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında elde edilen verilerin ve oluşturulan invitro kokültür modelinde elde edilen verilerle ileri dönemde yapılacak kardiyovasküler alandaki çalışmalara yönerebilecek bilgi üretilmesi ve literature yeni yaklaşımlar ortaya koyarak katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

Enflamatuar süreçte ortama salınan moleküler hastalıkların tanı, takip ve tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Proteinler hücrelerin fonksiyonel elemanlarıdır; yapılarının, yerleşimlerinin ve modifikasyonların beraber fonksiyon değerlendirmeleri hücre, doku ve tüm organizma açısından çok önemli veriler sağlar. mRNA ekspresyon değişimleri her zaman yapılacak protein miktarı ile korele gitmemekte ve fonksiyonel olup olmayacağı konusunda yeterli veri sağlamaması nedeniyle proteomik yöntemlerle büyük çaplı protein

yapım ve sekresyon analizleri sonuca ulaşma açısından oldukça önem taşımaktadır. Özellikle aterosklerozda ve kardiyovasküler patolojilerde proteomik analizlerin kullanım amacı ateroskleroz sürecinde kardiyovasküler sistemde protein profillerinin değişimini gözlemek ve ortaya çıkan moleküler farklılaşmanın incelenmesi sonucu kişiye özgü yeni biyobelirteçlerin tanımlanmasıdır.

Hücre kültürü modelleri fizyopatolojik mekanizmaların tek tek ve diğer sistemlerin etkilerinin ayırt edilmesini sağlayabilmesi nedeniyle çok önemlidir. Ateroskleroz birden fazla hücrenin etkilenerek farklı organ ve sistemlerin olaya katıldığı miyokardial enfarktüs, inme organlarda iskemik hasarlara neden olabilen enflamatuvar bir süreçtir. Bu nedenle bu tez çalışmasında immun cevapta önemli olan monosit/makrofajlar ile endotel arasındaki etkileşim ve buna neden olabilecek proteinlerin değişimleri incelenmiştir. Bu değerlendirmenin normal ve hiperglisemik stres koşullarında ve inflmasyonda adından söz edilmeye başlayan protein moleküllerinin ifadesinde değişim olup olmadığına bakılmıştır.

2. KURUMSAL TEMELLER

2.1. ATEROSİKLEROZ NEDİR?

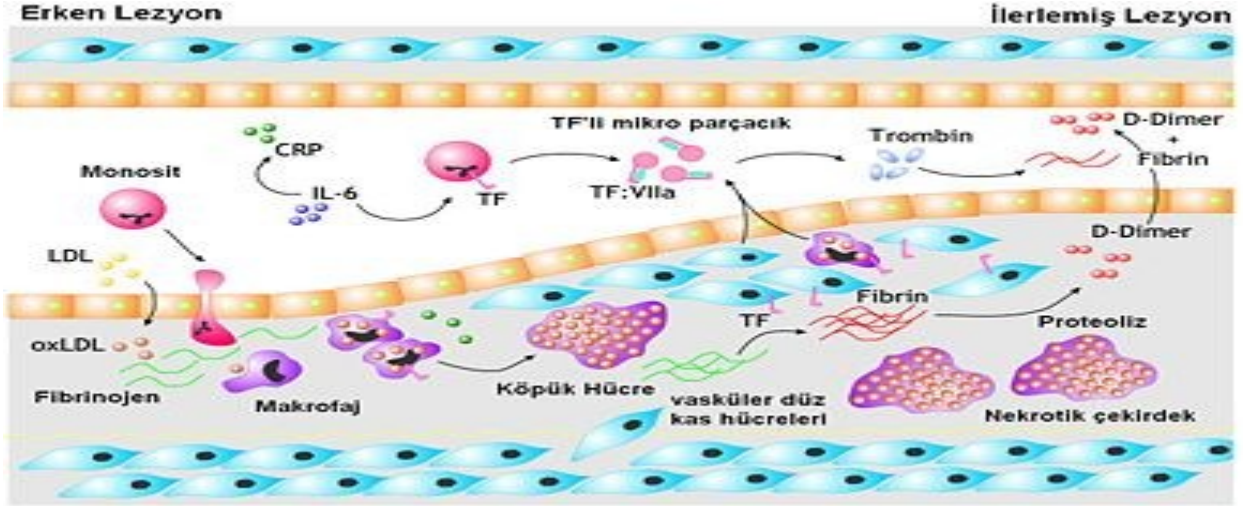
Ateroskleroz batı dünyasında en sık görülen ölüm nedenidir ve ciddi morbiditeye nedenidir (Murray CJ,1997). Ateroskleroz dünya genelinde insanlarda en önde gelen ölüm nedenidir(WHO,1999). Geleneksel olarak gelişmiş ülkelerin bir problemi olarak kabul edilmesine rağmen ülkemizde de erişkinlerde en önde gelen morbidite ve mortalite sebebidir,(TKD 1999). Ülkemizde koroner kalp hastalığının prevalansı hakkındaki bilgiler ‘tekharf’ çalışmasının 1990 kesit taramasında, insidansı da 1998 yılına kadar geçen izlemde araştırılmıştır. 1990 yılındaki taramada sağlanan veriler ülkemizde 1.050.000 koroner kalp hastasının bulunduğunu ortaya çıkarmıştır (TKD Sem. 2004). Yine aynı çalışmadan elde edilen verilere göre yıllık insidans erkeklerde yüzde 840, kadınlarda 620 olarak bulunmuştur. ‘tekharf’ verilerine göre ülke genelinde tüm nedenlere bağlı ölümlerin % 42’si koroner kalp hastalığına (KKH) bağlıdır. KKH yıllık mortalitesi erişkin erkeklerde yüzde 510, kadınlarda 530 bulunmuştur(Onat A. 2000). Bu, yılda (85 bini erkek) 135-140 bin kişinin koroner hastalıklar nedeniyle kaybedildiği anlamına gelmektedir.

Ateroskleroz büyük ve orta boy arterlerin iç tabakasının fokal bir hastalığıdır. Bu hastalık süreci primer olarak arter duvarının intima tabakasıyla sınırlıdır. Bu tabaka lipitler ve enflamatuar hücreler tarafından infiltrat olur ve değişik derecelerde fibrozis gelişir(Ross R 2000). Bu gözlem aterosklerozun kısmen damar tamiri ile ilgili yanıtların aktivasyonuna bağlı olduğu düşüncesine neden olmuştur. Travmaya vasküler yanıt ve ateroskleroz arasındaki benzerliklerin ışığında, Ross ve Glomset 1976 'da, ateroskleroz patogenezi için "hasara yanıt" hipotezini öne sürmüşlerdir (Ross R 1976). Lipoprotein kaynaklı ve özellikle oksidatif olarak modifiye olmuş lipitlerin intimada birikmesinin arteri hasara uğrattığına ve düz kas hücresinebağımlı tamir sürecini başlattığına inanılmaktadır(Steinberg D 1989). Bu durum diğer iyileşme reaksiyonlarında görülen yara dokusuna benzeyen intimal plakların oluşmasına yol açar. İyileşme reaksiyonları sürekli travma ile engellendiği zaman yara dokusu çoğunlukla hipertrofiye uğrar. Bu durum aterosklerotik plakların gerilemek yerine neden büyümeye devam ettiklerini açıklayabilir. Aterosklerotik süreç belirgin olarak intimada lokalize olmasına rağmen arter duvarının diğer tabakaları da hastalıktan etkilenir. Plakların arkasındaki medya tabakasında çoğunlukla düz kas hücresi kaybı ile birlikte atrofi görülür. Mediyal atrofının sonucu olarak arter dilate olur. Böylece lümenin boyutları korunmuş olur. Sonuç olarak arter, ciddi ateroskleroz gelişmiş olmasına rağmen anjiyografik değerlendirmeler de normal görünebilir.

Aterojenez, aterom plaklarının gelişme sürecidir.(Glagov S 1987)(Deepak L 2002) Aterosklerozun mikroskop altında görülebilen ilk aşaması "yağ çizgileri" oluşumudur. Bunlar endotelin altında bulunan, içi lipit dolu hücre topluluklarıdır; yağ çizgileri gelip geçici olabilir. Arter damarlarında hücrelerin (özellikle monosit türevi makrofaj gibi lökositler) ve değişime uğramış lipoprotein birikmesine paralel olarak arter yapısı değişime uğrar. Bunu izleyen yangı (enflamasyon), arterin intima tabakasında aterom plaklarının oluşumuna yol açar. İntima, damarda endotel ile media ve adventitia arasındaki kısımdır. Bu plaklar aşırı yağ, hücreler, kollajen ve elastinden oluşur. Lümen diye adlandırılan arter boşluğunda başlangıçta herhangi bir daralma (stenoz) oluşturmazlar.

Düşük yoğunluktaki lipopolisakkarit (LDL) 'nin damar intima matrisinde oksitlenmiş düşük yoğunluktaki lipopolisakkarit (oxLDL) aterom oluşumunun ilk adımıdır(Şekil 2.1). (Stevens 2002) Endotel hücrelerinin oxLDL tarafından uyarılması kandaki monositlerin uyarılarak damar duvarına girmesine neden olur. Monositlerin makrofajlara değişimi ve kümelenmiş oxLDL'nin Avcı Reseptör (Scavenger receptor') tarafından bu hücrelerin içine

alınması sonucu köpük hücreler meydana gelir. Damar düz kas hücrelerinin uyarılması bunların harekete geçmesine ve çoğalmasına neden olur. Doku Faktörü (Tissue Factor, TF), düz kas hücreleri ve makrofajların yüzeyinde belirir ve birikmiş fibrin'in fibrinojene dönüşmesine neden olur.



Şekil2.1. Damar içersinde ki lezyon mekanizması. (www.wikipedia.com)

2.1.1 Lipoproteinler

Yüksek serum total ve low-density lipoprotein (LDL) kolesterol ile düşük serum yüksek yoğunluktaki lipopolisakkarit (HDL) kolesterol koroner arter hastalığı (KAH) için bağımsız majör risk faktörleridir. Total ve LDL kolesterol düzeyi ne kadar yüksekse aterosklerotik olay görülme riski o kadar yüksek olur. Ortalama kolesterol düzeylerinin göreceli olarak yüksek olduğu toplumlarda düşük HDL kolesterol KAH'ı öngören güçlü bir parametredir. Ancak ortalama serum total (ve LDL) kolesterol düzeylerinin düşük olduğu toplumlarda bir belirteç olmayabilir(Grundy SM 1990). Bu bağlamda düşük HDL kolesterol diğer majör risk faktörlerine (sigara, hipertansiyon, diyabet) benzer etki gösterir. Trigliseritlerin ateroskleroz ile bağlantısı tartışma konusu olmuştur. Trigliseritten zengin lipoproteinlerin hepsi aterojenik değildir. Küçük VLDL ve IDL'lere bağlı daha az şiddetli hipertrigliserideminin aksine büyük VLDL formlarına bağlı[14] hipertrigliseridemi aterojenik değildir. Obezite ve kilo fazlalığı, fizik aktivite azlığı, aşırı alkolahımı, aşırı karbonhidratlı beslenme, diyabet, kronik böbrek yetersizliği, nefrotik sendrom gibi hastalıklar, kortikosteroidler, östrojenler, retinoidler, yüksek doz beta-bloker gibi ilaçlar ve ailevi kombine hiperlipidemi, ailevi hipertrigliseridemi, ailevi disbetalipoproteinemi gibi genetik bozukluklar trigliserit yüksekliğine neden olurlar(Burke AP 1998). Plak içeriği

açısından son ani koroner ölüm çalışmalarında erkeklerde ve menapoz sonrası kadınlarda yüksek total kolesterol ve düşük HDL kolesterolün; ve özellikle yüksek total/HDL kolesterol oranının hassas, yırtılmaya yatkın, tromboz eklenme riski yüksek plak oluşma riskini arttırdığı belirtilmektedir(Celermajer DS 1993). HDL-k düşüklüğü ülkemiz için çok önemli bir risk faktörüdür. HDL-k düşüklüğünün (çoğu insülin direnciyle ilgili) trigliserit yüksekliği, şişmanlık, fizik aktivite azlığı, tip 2 diyabet, sigara kullanımı, aşırı karbonhidrat alımı ve bazı ilaçlar gibi sebepleri vardır.

2.2.Aterosklerotik Hastalıklar Ve Epidemiyolojisi

Ateroskleroz genelde erken ergenlik çağında başlar, çoğu büyük arterde bulunur ancak kendini belli etmez ve genellikle tıbbi tanı yöntemiyle de fark edilemeyebilir. Kalbi besleyen koroner dolaşıma veya beyni besleyen serebral dolaşıma etki ettiği zaman hastalık ciddi anlamda ortaya çıkar. Kalp krizi, akut inme, kalp yetmezliği ve genel olarak çoğu kalp hastalığının altında yatan neden aterosklerozdur. Damarların kas tabakası ateromu tutmaya yetecek büyüklükte küçük anevrizmalar oluştururlar. Aterom plağının varlığını telafi edecek şekilde yapısını değiştirmesine rağmen kas tabakası dayanıklılığını sürdürür. Ancak, damar duvarının içindeki ateromlar yumuşak ve yırtılmaya müsaittir, fazla bir esneklikleri yoktur. Arterler kalp atışlarıyla sürekli genişleyip büzülürler, yani nabız atarlar. Ateromun dış kısmıyla kas duvarı arasındaki kireçlenme olduğunda, aterom ilerledikçe esneklik kaybına ve damarın sertleşmesine yol açar. Hastalık onlarca yıl yavaşça ilerlemesine rağmen, arterin bir aterom tarafından tıkanmasına kadar fark edilmez. Tipik olarak şöyle meydana gelir: Aterom yırtılması, yırtığın üzerinde pıhtılaşma ve fibröz yapılanma ve bundan kaynaklanan stenoz ile meydana gelir. Bu süreç bir kere veya tekrar tekrar olabilir. Stenoz yavaş ilerleyebilir, buna karşılık plak yırtılması ani bir olaydır. Yırtılma, ince ve zayıf fibröz örtülü "hassas" ateromlarda olur. Lümenin tamamen tıkanmasına neden olmayan ama yinelenen plak yırtılmalarının üzerindeki pıhtı örtüsü ve pıhtıyı sabitleştirici fizyolojik tepki, çoğu stenozu meydana getiren süreçtir. Stenozlu bölgeler akış hızı yüksek olmasına rağmen daha sağlam yapıdadır, genelde parçalanmazlar. Kan akışını durduran yırtılma olayları genellikle az daralma yapmış büyük plaklarda meydana gelir.

Kalp hastalıkları için kullanılan anjiyografi ve kardiyak stres testi teknikleri damarlarda ciddi daralma (stenoz) noktalarını belirlemeyi amaçlar. Bu teknikler aterosklerozu

doğrudan farketmeye yaramaz. Oysa klinik çalışmalar, ciddi kardiyak olayların meydana geldiği yapıların büyük plaklı ama az daralmalı olduğunu göstermiştir. Plak yırtılması saniyelerle dakikalar arasında bir sürede arter lümeninin tıkanmasına ve potansiyel olarak hastanın daimi sakatlanmasına veya ölümüne yol açabilir. Bu yüzden 1990'lardan beri tedavinin hedefi olarak daha ölümcül olan "hassas plak"lara odaklanılmıştır.

ABD'de her sene yaklaşık 800 bin kişi akut miyokard enfarktüsü geçirmektedir ve bunların 213 bini ölmektedir. Ölümlerin yaklaşık yarısı hastalığın ilk 1 saatinde hastaneye gelmeden olmaktadır. Bu erken ölümlerin çoğunluğu, hastane öncesi dönemde veya hastanede koroner yoğun bakım ünitesinde uygulanabilecek defibrilasyon ile önlenmesi mümkün olan ventriküler aritmiler sonucu oluşmaktadır. Miyokard enfarktüsünün en önemli sebebi epikardiyal koroner arterlerin aterosklerotik hastalığıdır. Her ne kadar koroner iskeminin semptomlarına hemodinamik bozulma yaratacak düzeyde ciddi darlıklar sebep olsa da miyokard enfarktüslerinin çoğunluğu hemodinamik olarak önemli olmayan (<%60 darlık) lezyonların parçalanması sonucu oluşmaktadır. Arteriyal intimanın yapısal bütünlüğünün bozulması lökositlerden salgılanan maddeler sonucunda matriks proteinlerinin proteolitik degradasyonuna yol açar. Kan ile trombojenik intimanın teması sonunda tıkaçıcı trombus oluşur. Yerel vazospazm da tıkanmaya katkıda bulunur. Miyokardiyal enfarktüs etkilenmiş arter bölgesini içine alan bölgesel bir süreçtir. Azalmış kontraktilite kan akımının kesilmesini takiben birkaç saniye içerisinde olur. Olay genelde endokard ile başlayıp epikarda doğru devam eder. Eğer hücre ölümünden önce kan akımı sağlanabilirse uzamış kontraktilite (stunning) görülebilir. Koroner oklüzyondan önce oluşan iskemik epizotlar miyokard hücrelerinin hayatta kalabilirliğini olumlu yönde etkiler. Bu fenomene iskemik ön koşullanma denir. Oklüzyon en az 15 ila 20 dakika sürdüğünde geri dönüşsüz kardiyak hasar gelişir. Oklüzyon 4 ila 6 saat sürdüğünde kardiyak hasar maksimum düzeye ulaşır. Bu sebepten dolayı miyokartta hasar oluşumu azaltılır. (Delves, 2001) Burada alınacak fayda, normale yakın kan akımının sağlanması (açık arter hipotezi) ile doğrudan ilişkili iken semptomların başlamasıyla kan akımının sağlanmasına kadar geçen süre ile ters ilişkilidir. (Roitt, 1996)

Miyokard enfarktüsü ve semptomatik koroner arter hastalığının genç erişkinlerdeki insidansı oldukça düşüktür. Çoğu çalışma tüm koroner arter hastalığı vakalarının yaklaşık %3'ünün 40 yaş altındaki kişilerde görüldüğünü ortaya koymaktadır (Lichtman, 2005). Genç ve asemptomatik hastaların genellikle koroner arter hastalığını ortaya koyacak

medikal tetkikleri yaptırmamaları nedeniyle hastalığın gerçek prevalansı ortaya konamamaktadır. İnvasküler ultrasound bazlı bir çalışmada hastalığın prevalansı >%50 olarak saptanmış ve her altı gençten birinde koroner lezyonun olduğu ortaya konmuştur (Kuby J. 2002).5127 kişinin incelendiği Framingham Kalp Çalışması'nda 10 yıllık takip boyunca miyokard enfarktüsü insidansı 30-34 yaş arası erkeklerde binde 12.9, 35-44 yaş arası kadınlarda ise binde 5.2 olarak bulunmuştur. Buna karşılık 55-64 yaş arası erkek ve kadınlardaki insidans 8 ila 9 kat fazladır(Goldsby RA, 2002).

Patolojik olaylar sonucu dolaşımda oluşan istenmeyen pıhtılara “tromboz”, pıhtının kendisine de “trombüs” adı verilmektedir. Dengeli bir şekilde işleyen hemostaz sonucu dolaşımda ne istenmeyen kanamalar ne de istenmeyen pıhtılar oluşur. Pıhtılaşma, normalde bir damar hasar gördüğünde kan kaybının önlenmesi ve yaşamın devamının sağlanması açısından önemlidir. Fakat patolojik olaylar sonucu sağlam damar yapısında meydana gelen pıhtılaşma ölümlere kadar gidebilen bir takım komplikasyonlara neden olur. Tromboz temelde meydana geldiği yere göre; arteriyel ve venöz tromboz olmak üzere ikiye ayrılır. Arteriyel trombozun neden olduğu en önemli tablolardan biri inmedir. İnme; oluşan bir pıhtının beyne kan sağlayan bir arteri tıkaması (iskemik inme) ya da beyin damarlarındaki yırtılma nedeniyle meydana gelen kanama (hemorajik inme) sonucu oluşur. Önemli bir nokta; toplam inme vakalarının %83'ünü iskemik yani tromboza bağlı inmelerin oluşturmasıdır. Bu oran inme oluşumunda trombozun önemini vurgulamaktadır. Pediatrik yaş grubunda, inme olguları tüm tromboz olgularının üçte birini teşkil eder ve bu olguların %85'i arteriyel özelliktedir (A.Ü.Tıp Fakültesi An Tıp A.Ş 1997). Normal hemostatik mekanizma, kanın damar içinde sıvı durumunda akışını sağlar. Bu sistemdeki herhangi bir aksaklık, vasküler hasar sonrası kontrolsüz kanamadan damar içinde istenmeyen pıhtılara kadar çeşitli problemlere neden olur (Joseph J. Mazza, 1988).

Geçici ya da uzun süreli çevresel etkiler hemostazın bozulmasında rol oynamakta ve hem arteriyel hem de venöz sistemlerde tromboz oluşumu riskini arttırmaktadır. Çevresel terimi geniş anlamda, doğum, hormonal tedavi, cerrahi müdahale, diyet, sigara kullanımı ile diyabet, hipertansiyon, dislipidemi, hiperhomosisteinemi gibi durumları ve damar duvarındaki lokal değişimler gibi etkenlerin neden olduğu değişimleri kapsar (LANE DAVID A 1995).

Venöz tromboz; yaş, genetik faktörler ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile oluşan multifaktöriyel bir hastalıktır. Hareketsizlik, cerrahi müdahale, travma, oral kontraseptif kullanımı, hormon tedavisi, hamilelik ve malignansiler venöz tromboz oluşumundaki çevresel ya da kazanılmış risk faktörleridir (RAPAPORT SI 1991).

İnme; vasküler tıkanma ya da damar yırtılması ile bunu izleyen kanama ve nörolojik aksaklıklar sonucu ortaya çıkan fokal beyin hasarı olarak tanımlanabilir. Bu yırtılma ya da tıkanma sonucunda, beynin belli bir bölümüne kan ve oksijen sağlanamaz. Etkilenen bölgedeki sinir hücreleri oksijensiz kaldığından çalışamaz ve dakikalar içinde ölür. Sinir hücreleri çalışmayınca, bu hücrelerin kontrol ettiği vücut bölgesi de işlev göremez. İnmelerin yarattığı harabiyet, genelde kalıcıdır çünkü; ölen beyin hücreleri yenilenmez. Vasküler tıkanmaya dayalı iskemik inmeler toplam inme vakalarının %83, kanamaya dayalı hemorajik inmeler ise %17'lik kısmı oluşturmaktadır. Hemorajik inmeler, subaraknoid alana kanama ya da serebral kanama şeklinde ortaya çıkabilir. Subaraknoid kanama, beynin yüzeyindeki bir kan damarının yırtılması ve beyin ile kafatası arasındaki boşluğa kanaması ile ortaya çıkar. Serebral kanama ise, beyindeki kusurlu bir arterin yırtılması ve kan ile birlikte çevredeki dokulara yayılması ile ortaya çıkar. Subaraknoid ya da serebral kanama olduğunda, kan kaybı neticesinde bazı beyin hücreleri daha fazla çalışamayacak demektir, ayrıca yırtılan arterden biriken kan, çevredeki beyin dokusu üzerine baskı yapmaktadır. Vasküler tıkanmaya bağlı inme, beynin venöz drenajında sinovenöz tromboz (SVT) şeklinde ya da beyni besleyen arterlerde arteriyel iskemik inme (AIS) şeklinde ortaya çıkabilir (AKAR N 2002).

İnme, yetişkinler ve pediatrik yaş grubu arasında belirli farklılıklar gösterir. Öncelikle; inme yetişkinlerde kolaylıkla teşhis edilebilir ve erken tedavi uygulanabilir niteliktedir. Erişkinlerde vasküler tıkanmaya bağlı inmeler daha çok ateroskleroza bağlı iken, çocukta pek çok hastalığa sekonderdir.

Diğer bir fark; yenidoğan ve çocukluk dönemi boyunca hemostatik sistemin değişik özelliklerinin olmasıdır. Dolayısıyla, serebrovasküler ve nörolojik sistemdeki gelişimsel farklılıklar bu döneme özgü yaklaşım gerektirir (ANDREW M 2000).

Hipertansiyonu olan ve akut miyokard enfarktüsü geçirenlerde angina pectoris, sessiz iskemik, atriyal fibrilasyon, ventrikül taşikardisi, ventrikül fibrilasyonu, kardiyojenik şok normotansiflere göre daha fazladır. Koroner arter hastalığı olan veya koroner damar

operasyonu yapılan hipertansiflerde 5 yıllık mortalite normotansiflere göre daha fazladır(Kannel WP 1996). Hipertansiyonda koroner kalp hastalığı oluşturan mekanizmalar arasında sistolik ve diyastolik kan basıncının yüksekliği yanında endotel disfonksiyonu, anjiotensin II aktivitesinin artışı, lipoprotein(a) yüksekliği vardır. Yüksek-normal kan basıncı olanlarda da risk yükselmiştir(Wong ND 1989)

Diyabet; toplumumuzda prevalansı kaygı verici biçimde artma eğiliminde olan bir risk faktörüdür. Diyabetik olgularda ateroskleroz daha sık ve erken yaşta görülmektedir. Diyabet özellikle kadınlarda yaş ve menapozdan bağımsız olarak koroner arter hastalığı riskini arttırmaktadır. KAH sıklığı diyabetik erkeklerde 2, kadınlarda 4 kat fazladır. Miyokard enfarktüsü geçirmiş diyabetik olgularda hastane içi mortalitenin diyabeti olmayanlara göre %50 daha fazla ve 2 yıllık mortalitenin 2 kat sık olduğu saptanmıştır. Amerikan Diyabet Derneği'nin kriterlerine göre açlık kan şekerinin >126 mg/dl olması diyabet, 110-126 mg/dl bozulmuş açlık glukozu olarak tanımlanmaktadır(Kannel WB, 1985). Diyabetik olgularda vasküler komplikasyonların gelişiminde hipertansiyon önemli bir risk faktörüdür ve diyabeti olmayanlara göre hipertansiyon 2 kat daha sıktır. Hem makrovasküler hem de mikrovasküler komplikasyonları azaltmada kan basıncının kontrolünün önemi açık olarak gösterilmiştir(Diabetes Care,1999). İyi kontrol altında olmayan diyabette tipik olarak trigliserit 20 yüksekliği ve HDL düşüklüğü bulunur. Trigliserit yüksekliği LDL kolesterol metabolizmasını etkileyerek aterosklerotik olan daha küçük ve yoğun LDL partiküllerinin oluşmasına yol açar. Diyabetik dislipidemide insülin direnci rol oynar (UK Prospective Study Group,1998)

Obezite; morbidite ve mortalite artışı ile ilişkili olan obezite artık bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Obezite ölçütü olarak kullanılan beden kitle indeksi (BKİ) ölçütüyle Dünya Sağlık Örgütü tarafından yapılan sınıflamada 18.8-24.9 normal, 25-29.9 kilo fazlalığı, >30 obezite, >40 ileri derecede obezite olarak tanımlanmaktadır(Study Group, 1998)(Rao SV,2001).

Fiziksel aktivite azlığı (sedanter yaşam tarzı) koroner kalp hastalığı için önemli, bağımsız bir risk faktörüdür (Lee IM, 1995). Egzersiz eksikliğinde harcanan kalori azlığından dolayı şişmanlık gelişmekte, bunun yanı sıra insülin direnci, kan lipid bozuklukları, hipertansiyon gibi risk faktörleri ortaya çıkmakta ve kardiyovasküler fonksiyonel kapasite azalmaktadır. Düzenli fiziksel aktivite ile kilo azalmakta, LDL-K ve trigliserit düzeyleri düşmekte, HDL-

K düzeyleri yükselmekte, insüline duyarlılık artmakta, kan basıncı düşmekte, endotele bağlı vazodilatasyon ve fibrinolitik aktivite artmaktadır. Bu olumlu etkiler koroner kalp hastalığı riskini azaltmaktadır.

Sigara; hem yüksek riskli hem de düşük riskli toplumlarda aterosklerozla ilişkili klinik olaylarda majör ve değiştirilebilen tek risk faktörüdür. Birleşik Devletler’de KAH’na bağlı ölümlerin %30’u sigaraya bağlanmaktadır. Çok yönlü analizle yapılan istatistiksel değerlendirmede sigara diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak KAH riskini artırır. Ancak bu, sigara KAH’nın bağımsız bir nedeni demek değildir. Sigara içme patogenetik olarak kolesterole bağlı bir risk faktörüdür ve diğer risk faktörleriyle sinerjistik yönde etki ederek KAH riskini artırır. Sigara içen sağlıklı genç erişkinlerde endotel bağımlı vazodilatasyonda doza bağlı ve geriye dönebilen bir bozulma saptanmıştır(Celermajer DS, 1993). Sigara koroner arter spazmına da katkıda bulunur(Yoshimura M, 1999).

Koroner arter hastalığı ailesinde erken KAH öyküsü olanlarda endotel fonksiyonlarının bozulmasıyla başlamaktadır. Endotel disfonksiyonu öncelikle erken ateroskleroz gelişen tip 2 DM’lu hastalar ve birinci derece yakın akrabaları ile KAH aile öyküsü olan bireylerde daha sık görülmüştür. Endotel disfonksiyonunun en önemli iki bulgusu damarlarda otonom fonksiyon bozukluğu ve sinir uyarı iletiminin değişmesidir (Makimattila S, 1997). Endotel disfonksiyonuna neden olan en önemli 2 faktör okside LDL ve sigaradır. Lipoprotein(a) sıklıkla ailevi hiperlipidemide, trigliserit yüksekliği ve HDL düşüklüğü ile birlikte veya kombine hiperlipidemide bulunmaktadır. Lp(a) yüksekliğini tanımlamak için özellikle erken KAH aile öyküsü olan bireylerin standart laboratuvar incelemelerine Lp(a) ve apo B ölçümü ilave edilmelidir. Erken KAH gelişenlerin lipid taramalarının % 25’inde Lp(a) yüksekliğine rastlanmaktadır. Lp(a) LDL’nin değişik bağlarla modifiye olmuş bir formudur. Lp(a) plasminojen bağlayan molekül ve hücrelerle yarışarak fibrinolizisi değiştirir Lp(a) reseptörleri ile makrofajlara bağlanarak köpük hücre oluşumuna ve aterosklerotik plakta kolesterol depolanmasına yol açar.

2.3. Ateroskleroz Etyopatolojisi

Enfarkt gelişiminde birçok etmen rol oynar. Olağan perfüzyonun şiddetli arteriyel stenoz, ateroskleroz, bunlarla birlikte tromboz gelişimi gibi nedenlerle oluşan tıkanmalar sonucunda azalmasıyla hemodinamik enfarktlar gelişir. Kalp, alt ekstremiteler gibi

kaynaklardan gelen bir trombüs parçasının ilerde bir kafaici dalı tıkadığı duruma embolizm adı verilir. Lokal ateroskleroz ya da lipohyalinoz sonucunda tıkanma oluyorsa küçük damar hastalığı denebilir. Arter diseksiyonu, birincil ya da ikincil vaskülitler, hiperkoagülabilite durumları, vazospazm, sistemik hipotansiyon, hiperviskozite, moyamoya hastalığı, fibromusküler displazi, venöz sinüs tıkanıklığı ya da bir kitlenin damara basısı gibi durumlar ise iskemik inmenin daha nadir görünen nedenleridir.

Alman patolog Rudolf Virchow 1856'da aterosklerozun, plazma komponentlerinin arter duvarında enflamatuvar bir yanıt ortaya çıkardığı zaman geliştiğini öne sürmüştü. Moleküler tıbbın gelişmesi ile ateroskleroz patogenezi için daha spesifik hipotezler belirtmek olası hale gelmiştir. Ross ve arkadaşları 1974'de arteriyal zararın trombositlerden veya diğer hücrelerden lokal PDGF salınımına neden olduğunu öne sürmüştür(Ross R, 1974). Bu durum düz kas popülasyonunda proliferatif bir yanıtı başlatabilir ve ateroskleroza yol açabilirdi. Brown ve Goldstein 'nın LDL reseptörlerini ve kolesterol metabolizmasını keşfetmesi "kolesterol hipotezi"nin etkin farmakolojik ve genetik araçlarla test edilmesine olanak sağlamıştır. Deneysel modellerde ve insanlarda serum kolesterolü (özellikle LDL kolesterol) ve aterosklerozun derecesi arasında doğrudan bir ilişki olduğu açık bir şekilde gösterilmiştir. Günümüzde kabul gören ateroskleroz indüksiyon hipotezi şöyledir. Hiperkolesterolemi gibi proaterojenik uyarılara maruz kalan deney hayvanlarında ilk saptanan değişiklikler subendotelyal intimada kan kaynaklı lipidlerin ve endotelium yüzeyinde lökosit adezyon moleküllerinin görülmesidir. Plazma LDL düzeyleri yükseldiği zaman çok miktarda LDL endotelde geçerek intimaya girer. Transendotelyal permeabilitenin arttığı arteriyal ağacın dallanma bölgelerinde bu süreç hızlanır. LDL'nin intimadan eliminasyonu bu bölgedeki mikradamarların eksikliğine bağlı olarak sınırlıdır. Matriks proteoglikanlarının LDL'ye afinitesi dolayısıyla LDL matrikse bağlanır ve LDL havuzu oluşur. LDL intimada agregasyon, oksidasyon ve degradasyon içeren bir seri modifikasyona uğrar. Kanda LDL'yi oksidasyondan koruyan antioksidanların intimada aynı süreci neden önleyemediği bilinmemektedir. LDL'nin oksidasyonu lizofosfatidilkolin gibi modifiye lipidlerin salınımına yol açar. Bu lipid türlerinin bazıları endotel hücrelerini aktive eden sinyal molekülleri olarak rol oynar. Bu durum vasküler hücre adezyon molekülü olan VCAM-1'in ekspresyonuna yol açar. VCAM-1 monosit ve T lenfositler için bir reseptördür. VLA-4 adında karşı reseptör taşıyan bu hücrelerin VCAM-1'e bağlanması monosit ve T lenfositlerin lipid birikim ve modifikasyon bölgelerinde endotel yüzeyine yapışmasına neden olur. Makrofaj, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri tarafından

üretilen kemokinler lipid birikimi ve oksidasyonu ile ilişkilidir. Ayrıca okside kolesterol agregatları kompleman aktivasyonu yoluyla kemotaktik sinyallerin oluşmasına neden olur. Her iki uyarı mononükleer hücrelerin endotel tabakasının interselüler yarıklarından subendotelyal intimaya göçünü başlatır. Bunun dışında hücre hasarı esnasında ortaya çıkan ısı şok proteinlerinin de endotelyumu aktive ederek monosit ve T lenfositlerin girişini başlattığı gösterilmiştir. İntimada monositler makrofajlara dönüşür. Bu süreç aktive olmuş damar hücreleri tarafından üretilen monosit koloni uyarıcı faktör (M-CSF) tarafından başlatılır. Makrofaj aterosklerotik lezyonun oluşmasında çok önemli bir rol oynar. Okside lipoproteinleri içine alma kapasitesinden dolayı kolesterolü biriktirir ve lipid dolu köpük hücresine dönüşür. Köpük hücresi aterosklerozun ilk örnek hücresidir. Makrofajlar okside LDL'yi temizleyici reseptörler (ScR) vasıtasıyla alırlar. Okside LDL'nin makrofajlar tarafından alınımı bunun parçalarının antijen spesifik T hücrelerine sunulmasına yol açar. Bu durum proenflamatuar sitokinlerin üretimine yol açan bir immün reaksiyonu başlatır. Bu sitokinler, interferon-gama, tümör nekroz edici faktör-alfa ve interlekin-1'dir. Bunlar endotelyum hücreleri üzerinde etki ederek adhezyon moleküllerinin ekspresyonunu ve 13 prokoagulan aktiviteyi uyarır. Makrofajlar üzerine etki ederek proteazları, endositozu, nitrik oksidi(NO) ve sitokinleri aktive eder. Son olarak düz kas hücreleri üzerine etki ederek NO üretimini uyarır ve büyümeyi, kollojen-aktin ekspresyonunu baskılar. İnsanda T hücrelerinin plaktan izole edilmesi ve klonlanması bunların önemli bir bölümünün okside LDL'yi tanıdığını göstermiştir. LDL oksidasyonla otoantijene dönüşen bir endojen partikül olarak kabul edilir. Ateroskleroz için okside LDL'ye ek olarak diğer bazı aday antijenler öne sürülmüştür. Bunlar ısı şok protein 60, Chlamydia pneumoniae, Sitomegalovirüs (CMV) ve Herpes simpleks tip 1'dir.

Yağlı çizgilenme esas olarak sağlam endotelde köpük hücrelerinin az sayıda T hücresi ve ekstraselüler kolesterolle birlikte birikmesidir. Klinik önemi yoktur. Ancak bazı yağlı çizgilenmeler gerçek aterosklerotik, fibrin ve yağ içeren plaklara dönüşür. Bu durum tipik olarak hemodinamik zorlanma bölgelerinde olur. Düz kas hücreleri subendotelyal aralığa göç ederek bölünürler ve ekstraselüler matriksi sentezlerler. Sonuç olarak lezyonun lipid dolu çekirdeğini endotelyal yüzeyden ayıran fibröz bir şapka oluşur. Bu şapka çevresine kendi matriksinin kalın tabakaları bulunan uzun düz kas hücrelerinden oluşur. Fibröz şapka oluşumunu başlatan uyarılar muhtemelen düz kas aktivasyonunu uyararak etki ederler. Arter duvarındaki lokal faktörlerin düz kas hücresini aktive etmesi olasıdır. Büyüme faktörlerinden temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) ve PDGF bu uyarıyı yapabildikleri

gösterilen ikisidir. Ayrıca PDGF düz kas hücreleri için kemotaktik bir faktör olarak rol oynar.

2.4. Atheroskleroz Ve Epigenetik

Atheroskleroz oluşumu yaş, genetik faktörler ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile oluşan multifaktöriyel bir hastalıktır ve gen değişimleri ile açıklanamayan epigenetik faktörler henüz tam olarak aydınlatılmış değildir. DNA dizisindeki değişimlerle açıklanamayan, mitoz ve/veya mayoz bölünme ile kalıtılabilen, gen fonksiyonundaki değişiklikler olarak tanımlanan epigenetik son on yılda yapılan araştırmalar sonucu özellikle yüksek organizasyonlu canlılarda oldukça önemli etkileri olduğu anlaşılmıştır.

Epigenetik özellikle canlıların embriyodan yetişkin bireye doğru ilerleyen gelişim sürecinde gözlemlenen, hücre farklılaşmaları sırasında ortaya çıkan gen ifadesindeki değişikliklerde önemli rol oynamaktadır. Gen ifadesinde görülen bu değişiklikler, DNA'nın seçici olarak, farklı epigenetik durumlarda bulunan farklı kromatin yapılarına paketlenmesiyle ortaya çıkmaktadır. Epigenetik fenomenin üzerinde en çok çalışma yapılmış olan iki tipi, DNA metillenmesi ve histon modifikasyonları olmuştur (Thomassin H, 2001)(Matthews C, 2006). Histon kuyruğunda görülen post translasyonel modifikasyonlar spesifik proteinler için bağlanma bölgeleri sağlamaktadır. Modifikasyonların kombinasyonu sonucu bir kod (histon kodu) oluşturduğu öne sürülmüştür. Histonların N-terminal kuyruklarında görülen modifikasyonlar kromatin fonksiyonunu değiştirir. Histonlar DNA ve nuklear proteinlerle etkileşimlerini değiştirmek için posttranskripsiyonel modifikasyonlara gider. Histon kuyruklarında görülen modifikasyonların bazıları, metilasyon ve asetilasyondur. Bu değişiklikler proteinlerin kütlelerini, yapılarını ve fonksiyonlarını etkilemektedir.

Gen ifadesinde görülen bu değişiklikler günümüzde yeni teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, kişiye özel tedavi yöntemlerinin oluşturulmasında etkili olmaktadır. Gen ifadesinde görülen bu değişikliklerin klinik proteomiks yardımıyla ortaya çıkarılması sonucunda yeni biyolojik belirteçlerin (biyomarker) tanımlanması, kişiye özgü tedavi yöntemleri geliştirilmesinde kullanılabilir veri kaynağı oluşturacaktır.

2.4.1. Proteomiksin Atheroskleroz Patojenezinde Kullanımı

Hücre doku ve organizmada ifade olan tüm proteinlerin tanımlanması, miktarının belirlenmesi, gerekirse posttranslasyonel modifikasyonların, protein etkileşimlerinin belirlenmesi ve enzimatik aktivasyonlarının analizi gibi çok geniş bir inceleme yöntemini tanımlamaktadır. 1990 larda başlayan bu analiz yöntemi günümüzde geniş databankların oluşturulmuş olması ve ilerleyen biyoinformatik sistemlerin de yardımıyla geniş kapsamlı protein analiz ve tanımlamasını mümkün kılmaktadır.

Atherogenezde rol alan molekülleri tanımlayabilmek amacıyla normal ve atherosklerotik aorta endotelininin protein tayinleri yapılmış ve 454 farklı protein tanımlanmıştır. Bunların çoğu plazma membranı bağımlı ve ekstrasellüler matriks proteinleri olup lipid metabolizmasında yeralan, hücre adhezyonunu kontrol eden ve özellikle immün ve enflamatuar cevapta yer alan proteinlerdir (White MY 2007). Ox-LDL ve LDL nin insan monositik seri THP-1 üzerindeki etkileri MALDI-TOF MS ile değerlendirildiğinde ise 2500 farklı protein tanımlanmış ve bunların 93 ünde değişiklik belirlenmiştir (Fuchs D 2007). Isoflavon kullanan postmenaposal kadınların total kandan elde edilen monositlerinde yapılan bir çalışmada ise adhezyon ve moleküllerinin azaldığı ve enflamatuar biyobeliryeçlerde azalmaya neden olarak atheroskleroz gelişimini engellediği protein analizleri ile gösterilmiştir (Fuchs D, 2007). Bagnato ve ark, atherosklerotik özellik gösteren insan koroner arter örneklerinden 806 farklı protein tespit etmişler ve bunları ekstrasellülermatriks proteinler, lipid bağlanma ve metabolizma ile ilişkili protein, enflamasyonla ilişkili proteinler ve apoptotik hüce ve fagositik ligandlar olarak 4 ayrı gruba ayırmışlar ve çok sayıda proteini de bu sınıflandırmaya dahil edememişlerdir. Makale kapsamında ileri ve tekli çalışmaların gerekliliği vurgulanmıştır (Bagnato C, 2007). Davies vasküler shear strese bağlı endotelial genomik araştırmalar ve bunu takiben yapılan protein analizlerinin listesini bir derlemede toplamıştır. Bu derlemede endotelial gen transkripsiyon analizlerinden elde edilen sonuçların farklı ekiplerce protein değerlendirmelerinin yapıldığı fakat bu alanda geniş çaplı proteom analizinin olmadığı görülmektedir (Davies PF). Knag ve ark (2009) THP-1 monositik hücreleri 'PMA' ise makrofaja dönüştürerek LDL yapısını hipoklorit ile okside etmişler köpük hüce oluşumunda etkin olabilecek mekanizmaları proteomik analizle değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda değişim gösteren hüce içi proteinlerin çoğunun apoptozis ilişkili moleküller olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra hüce metabolizmasında yer alan pek çok

enzimde azalma, hücre içi sinyal iletiminde değişimler ve protein transporter sisteminde de değişim bulunmuştur. Aynı çalışmada membran proteini olan adenine fosforibozil transferazdaki değişim çok yüksek bulunmuş ve ilişkili mekanizmaların haritası da çıkarılmıştır . Han ve ark(2001) ise insan lösemik hücre dizisi THP-1 ile yaptıkları çalışmada hücreleri %2 lik ve cobalt ile hipoksiye sokarak glukoz, nükleotid, protein metabolizmasında yeralan enzimler ve gen transkripsiyonu hücre içi iletim sistemindeki proteinleri değerlendirmişlerdir. Farklı gruptaki protein değişim yüzdeleri karşılaştırmışlardır. En belirgin etki oksidatif hasar ilişkili proteinlerde (% 37) bulunmuş bunu % 26 ile glukoz ve nükleotid metabolizmasında yeralan proteinler izlemiştir. Ekstrasellüler matriks proteinlerinin ekspresyonlarındaki değişim kemoatraktan proteinler, immun sistem modulatörleri de önemlidir.

Lorenzo ve ark(2003) atherotromboz gelişimde yeralan molekülleri araştırmak amacıyla koroner arter hastalığı olan kişilerden izole edilen monositlerin ve atherom plakların proteomiks analizlerini yapmış ve olayda rol alabileceği düşünülen proteinlerini listelemişlerdir. Griffin ve ark ise vasküler endotelin analizinde proteomik ve kitle spektrometresiyle analizlerin kullanımına dair kapsamlı bir derleme hazırlamışlar ve invivo –invitro vasküler çalışmaların ileriye yönelik potansiyelleri vurgulanmıştır.

Bakteriyel lipopolisakkaritlerin (LPS) ateroskleroz sürecine etkisini ortaya koymak amacıyla yapılmış proteomik bir araştırma henüz bulunmamaktadır. Ayrıca üçlü kokültürün vasküler modelde uygulanması da çalışmaya farklı bir yaklaşım ve hücreler arası etkileşimleri farklı koşullarda belirlemede katkı sağlayacaktır. Canlıda metabolik düzenlemeler, toksik ve patojenlere cevapların oluşumuna tüm sistemler katılır. Özellikle vasküler yapı ve kan dolaşımı bundan etkilenen ve sistemler arasında iletişimi ve aracılığı sağlar. Hücre kültürü modelleri fizyopatolojik mekanizmaların tek tek ve diğer sistemlerin etkilerinin ayırt edilmesini sağlayabilmesi nedeniyle çok önemlidir. Ateroskleroz hücre kültürü modellerinde genellikle tekli endotel, düz kas ve makrofaj hücre dizileri kullanılmaktadır. Bu tez kapsamında aterosklerozda enflamatuvar sürecin aktivasyonunda yer alan hücrelerle üçlü kokültür modeli planlanmıştır. Bu tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar sadece ateroskleroz değil enflamatuvar vasküler aktivasyonla ve hiperlipidemi ile giden pek çok hastalığın patogenezinde de katkı sağlandığı düşünülmektedir.

2.4.2 Atherosiklerozda Sitokin ve Kemokinlerin Görevleri

Sitokinler ve kemokinler birçok önemli biyolojik süreçte görev almaktadırlar ve birçok hücre aktivasyonu , inflamasyon , İmmünite , Doku tamiri,morfogenez gibi bir çok biyolojik olayları düzenlerler. Sitokinler düşük molekül ağırlıklı glikoproteinlerdir. Hedef hücre yüzeyindeki spesifik reseptörlerine bağlanır ve hedef hücrede gen ekspresyonunu değiştiren sinyal-transdüksiyon yollarını tetiklerler. Sitokinler doğuştan ya da sonradan kazanılmış bağışıklık sistemine ait hücreler tarafından salınan ve bu hücrelerin fonksiyonlarını yönlendiren proteinlerdir. Mikroplara ya da antijenlere yanıt olarak üretilirler. Farklı immün ya da inflamatör yanıt için farklı sitokinler salınır. Sonradan edinilmiş bağışıklığın aktivasyon fazında, sitokinler lenfositlerin gelişimi ve farklılaşmasını uyarır. Hem doğuştan hem de sonradan edinilmiş bağışıklığın efektör fazlarında mikropları ve diğer antijenik bileşenleri ortadan kaldırmak için farklı efektör hücreleri aktive ederler. Hematopoetik hücrelerin gelişimini uyarır ve klinik tıpta terapötik ajan olarak kullanılır (Delves, 2001). Antijenin makrofajla etkileşimi ve TH hücrelerinin aktivasyonu çeşitli sitokinlerin salınımına neden olur. Bu sitokinler çeşitli immün yanıtlarda rol alırlar. İnterlökin-1 (IL-1) İnflamatör yanıtları ve ateşi arttırır, Aktive makrofajlardan salınan bazı faktörlerden bahsetmek gerekirse, IL-6 ve TNF, Doğuştan edinilmiş bağışıklığı ve patojenlerin eliminasyonunu hızlandırır, Kompleman proteinleri inflammatör yanıtı ve patojenlerin eliminasyonunu arttırırken hidrolitik enzimler ,İnflamatör yanıtı arttırırlar , IFN- α hücrese genleri aktive ederken TNF, tümör hücrelerini öldürür GM-CSF, G-CSF, M-CSF ise hematopoezden sorumludur(Brostoff, Male, 1996).

Doğuştan edinilmiş bağışıklıkta, sitokinler; makrofajlar ve NK hücreleri tarafından üretilir ve mikroplara karşı erken imflamatör yanıtı başlatır (Lichtman, 2005)(Çizelge-2.4.2.1). Sonradan edinilmiş bağışıklıkta ise, sitokinler antijenle uyarılan lenfositlerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır ve makrofajlar gibi özelleşmiş efektör hücreleri aktive eder. Genel olarak doğuştan ve sonradan edinilen immunitenin sitokinleri farklı hücre grupları tarafında üretilir ve farklı hedef hücrelerde etki gösterirler(Kuby J., 2002).

Çizelge-2.4.2.1 Doğuştan ve sonradan edinilmiş sitokinler

Özellik	Doğuştan Bağışıklık	Sonradan Bağışıklık
Örnek	TNF- α , IL-1, IL12, IFN- γ *	IL-2, IL-4, IL-5, IFN- γ *
Major hücre kaynağı	Makrofajlar, NK hücreler	T lenfositler
Temel fonksiyon	Doğuştan bağışıklığın ve inflamasyonundüzenleyicileri	Lenfositlerin gelişme ve farklılaşmasının düzenlenmesi, efektör hücrelerin aktivasyonu (makrofaj, eozinofil, mast h.)
Uyarı	LPS(endotiksin),bakteriyal peptidoglikanlar,viral RNA, T-hücresi kaynaklı sitokinler (IFN- γ)	Protein antijenler

2.4.2.1.Doğuştan Edinilmiş Bağışıklıkta Rol Alan Sitokinler

Virus ve bakterilere karşı erken immun yanıtın en önemli bileşeni sitokinlerdir.(Bokoch GM 1995)(Campbell JD 2002)(Çizelge-2.4.2.1.1), sitokinler doğuştan gelen bağışıklık sisteminde bir çok efektör fonksiyonu düzenler(Bleul CC 2000)

Çizelge-2.4.2.1.1 Doğuştan edinilmiş bağışıklıkta rol alan sitokinler.

Sitokin	Hücre kaynağı	Hedef Hücre ve Biyolojik Etki
TNF	Makrofajlar,Thücreleri	Endotelyal hücreler; aktivasyon (inflamasyon, koagulasyon),Nötrofiller;aktivasyon,Karaciğer; AFP sentezi,Bir çok hücre; apoptozis
IL-1	Makrofajlar, endotelyal hücreler, bazı epitelyal hücreler	Endotelyal hücreler; aktivasyon (inflamasyon, koagulasyon),Karaciğer; AFP sentezi
Kemokinler	Makrofajlar, ndotelyal hücreler, T hücreleri, fibroblastlar,rombositler	Lökositler; kemotaksis, aktivasyon, dokulara göç
IL-12	Makrofajlar, dendritik hücreler	T hücreleri: TH1 farklılaşması,NK ve T hücreleri: IFN- γ sentezi, artan sitolitik aktivite
Tip I IFN lar (IFN-α, IFN-β)	IFN- α ; makrofajlar IFN- β ; fibroblastlar	Tüm hücreler: MHC sınıf I ekspresyonunda artış, anti viral aktivite,NK hücreleri: aktivasyon

IL-10	Makrofajlar, T hücreleri (özellikle TH2)	Makrofajlar, dendritik hücreler: üretiminin inhibisyonu, sınıf II MHC molekülünün ekspresyonunun	IL-12
IL-6	Makrofajlar, endotelial hücreler, T hücreleri	KC: AFP'lerin sentezi, B hücreleri: antikor üreten hücrelere dönüşüm	
IL-15	Makrofajlar, diğer	NK hücreler: T hücrelerinin proliferasyonu (hafıza CD8+ hücreler)	
IL-18	Makrofajlar	NK ve T hücreler: IFN- γ sentezi	

Gram negatif bakterilere ve diğer infeksiyöz mikroplara akut inflamator yanıtın düzenleyicileridir. TNF'ye TNF- α adı da verilir ve böylece TNF- β (lenfotoksin)'den ayrılır.(D'Ambrosio D 2003)(LusterAD 1998) İlk olarak tümörlerin nekrozuna neden olan bakteriyel endotoksin (lipopolisakkaritler-LPS) ile muamele edilmiş hayvanların serumlarında belirlenmiş bir protein olduğu için bu ismi almıştır.

1. Nötrofil ve monositleri uyararak infeksiyon bölgesine toplamak ve aktive ederek mikropların ortadan kaldırılmasını sağlamaktır TNF bu etkilerini damar endoteli ve lökositler üzerinden gerçekleştirir. Örneğin, TNF damar endotel hücrelerinin adezyon molekülleri ekspresyon etmelerini indükleyerek nötrofillerin, monosit ve lenfositlerin buraya bağlanmasını sağlar. Bu adezyon molekülleri, selektinler ve integrin ligandlarıdır.
2. TNF, endotelial hücreleri ve makrofajları kemokin salgılamak üzere uyarır. Kemokinler, lökosit integrinlerinin ligandlarına olan afinitesini artırarak kemotaksisi indükler ve mononükleer fagositlerden IL-1 salınımını uyarır. IL-1'nin, TNF'ye benzer bir rolü vardır.
4. Nötrofillerin ve makrofajların mikrobisidal aktivitesini uyarır
5. Bazı hücre tiplerinde apoptozisi indükler.(Mackay CR)

TNF, hipotalamus üzerine etki ederek ateşe neden olur. Bu nedenle endojen pirojen olarak isimlendirilir (LPS, eksojen pirojen). TNF'ye (ve IL-1'e) yanıt olarak gelişen ateş oluşumu, sitokinle uyarılan hipotalamik hücrelerden salınan prostoglandinlerle (PG) düzenlenir. Aspirin PG sentezini inhibe ederek TNF ve IL-1'in bu etkisini bloke ederek ateşi düşürür, hepatositleri bazı serum proteinlerinin (örn, serum amiloid A ve fibrinojen) sentezi için uyarır, TNF'nin uzamış üretimi kas ve yağ hücrelerinin zayıflamasına (kaşeksi) neden olur.(Murdoch C Nagasawa T 2000)(Murdoch C Nagasawa T 1999) Bu zayıflama,

TNF aracılığı ile iştahsızlıktan ve lipoprotein lipazın azalan sentezinden kaynaklanır (Lipoprotein lipaz: dolanan lipoproteinlerden yağ asitleri koparan enzim) ,TNF miktarı aşırı arttığında (10⁻⁷ M ya da daha fazla) miyokardiyal kasılabilirlik ve damar düz kas tonusu inhibe olur. Bu durumda, kan basıncı düşer (şok) ve Dolaşımda fazla TNF olması kan glukoz düzeyinin azalması gibi metabolik bozukluklara neden olur.

TNF trombomodulin (trombin reseptörü-pıhtılaşma inhibitörü) ekspresyonunu inhibe ederek tromboz oluşumuna neden olur ancak bu farklılık tam değildir çünkü, aynı sitokin doğuştan ve sonradan edinilmiş bağışıklıkta üretilebilir ve farklı sitokinler benzer etki gösterebilir(Ono SJ 2003)

IL-1 ve İnflamasyondaki Rolü

Etkisi TNF'ye benzer. İnfeksiyon ve diğer inflammatör uyarılara yanıt oluşumunu düzenler (Shapiro SD 2003). Düşük oranda sentezlendiğinde lokal inflamasyonda düzenleyici olarak görev yapar. Lökosit adezyonunu yönlendirecek yüzey moleküllerinin (örn. İntegrin ligandları) endotel hücrelerinde ekspresyonlarını düzenler yüksek oranda sentezlendiğinde, kan dolaşımına girer ve endokrin bir etki gösterir ve sistemik IL-1 , TNF ile birlikte ateşe, karaciğerden akut faz proteinlerinin sentezlenmesine ve metabolik zayıflamaya (kaşeksi) neden olur.

IL-12 ve İnflamasyondaki Rolü

Hücre içi mikroplara karşı erken immun yanıt oluşumunun mediatörüdür. Sonradan edinilmiş bağışıklıkta hücre aracılığı ile bağışıklığın indükleyicisidir.Özellikle NK hücrelerinin sitolitik fonksiyonlarını aktive eder ve T hücrelerinden ve NK hücrelerinden IFN- γ üretimini uyarır.

Makrofajlar bir çok mikroba yanıt olarak IL-12 üretir, salınan IL-12, NK hücrelerinden ve T hücrelerinden IFN- γ üretimini uyarırlar, IFN- γ makrofajları aktive ederek mikropların öldürülmesini sağlar ve CD4⁺ TH hücreleri IFN- γ üreten TH1 hücrelerine dönüştürür ve Aktive NK hücrelerin ve CTL'lerin sitolitik fonksiyonlarını arttırırlar.

Tip I İnterferonlar ve İnflamasyondaki Rolü

Viral infeksiyonlara erken bağışıklık yanıt oluşumunu düzenler ve *İnterferon* ifadesi bu sitokinlerin viral infeksiyonlara müdahale etmesinden kaynaklanır (Van Damme J, 1999). Viral infeksiyonlara yanıt oluşturur ve hücre içi mikroplara karşı hücre-aracılığı ile bağışıklık yanıtı başlatır, hücreleri 2',5' oligoadenilat sentetaz gibi enzimler sentezlemek için uyarır. Bu enzimler viral RNA ya da DNA replikasyonuna engel olur. Tip I IFN'lerin anti viral aktivitesi parakrindir. Viral olarak infekte bir hücre IFN salgılayarak henüz infekte olmamış komşu hücreyi korur, Tip I IFN sınıf I MHC moleküllerinin ekspresyonunu artırır ve böylece tip 1 IFN, infekte hücredeki viral antijenlerin tanınmasını arttırarak CD8 hücrelerin aktivitesini arttırırlar ve NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini arttırırlar (Vicari AP 2002)

IL-10 ve Biyolojik rol:

IL-10 Konak immun yanıtı inhibe eden bir sitokindir. Aktive makrofajların ve dendritik hücrelerin inhibitörüdür ve bu nedenle doğuştan edinilmiş bağışıklık reaksiyonlarını ve hücre aracılığı ile olan bağışıklığı kontrol eder.

Aktive makrofajlardan salınırlar (negatif feed back mekanizması) aktive makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından IL-12 üretimini inhibe eder. IL-12, IFN- γ salınımının önemli bir uyarıcı ve hücre içi mikroplara karşı bağışık yanıtın önemli bir indükleyicisidir. IL-10 bu reaksiyonların tümünü bloke eder. Makrofajlarda ve dendritik hücrelerde sınıf II MHC moleküllerinin ekspresyonunu inhibe eder ve böylece T hücresi aktivasyonunu inhibe eder ve hücre aracılığı ile bağışıklık yanıtı sonlandırır. (Vicari AP 2002)

IL-6

Doğuştan edinilen bağışıklık sisteminde, AFP'lerin sentezini ve kemik iliği öncülerinden nötrofil üretimini arttırır. Sonradan edinilen bağışıklıkta B lenfositlerinin antikör üreten plazma hücrelerine dönüşümünü uyarır. (David S 2007)

IL-15

NK hücrelerinin proliferasyonunu ve T hücrelerinin (özellikle de hafıza CD8+ hücrelerin) gelişimini sağlar. (David S 2007)

IL-18

NK hücrelerinden ve T hücrelerinden IFN- γ üretimini uyarır (IL-12 ile sinerjik etki). IL-12 ile kombine olarak hücre-aracılığı ile bağışık yanıtta rol alır. (David S 2007)

Kemokinler

Lökositlerin inflamasyon ve homeostasisin sağlanması aşamalarında hücre hareketleri düzenlemektedirler. Kemokinlerin, homeostatik sirkülasyondaki lökositlerin dokulara yönelimlerinde de görev aldıkları kabul edilmektedir. İnflamasyon boyunca kemokinlerin sekresyonunda dramatik bir şekilde artış gözlenmektedir. İnflamasyonda birçok dokuda (deri, beyin, eklem, meninges, akciğer, kan damarları, böbrek ve gastrointestinal sistem) sitokinlerin ve kemokinlerin varlığı tespit edilmiştir. Tüm hücrelerde olmasa dahi birçoğunda hücreler uygun stimülasyon sonucunda kemokin moleküllerini sentezleyerek ortama salmaktadırlar. Kemokin üretimi için en önemli uyarı erken proinflatuvar sitokinlerdir (interlökin- 1 ve tümör nekroz faktör- α , viral infeksiyon, lipopolisakkarit gibi bakteriyel ürünler). (Zlotnik A 2007) (Beutler, B. 2000)

İnflamasyonla seyreden hastalıklarda kemokinlerin çok önemli görevleri bulunmaktadır. İnflamasyonda kandan kemokinler, lökositlerin dokuya geçişine ve inflamasyonun bulunduğu yerde birikimine ve aktivasyonuna yol açmaktadır. Kemokinler, özellikle de eotaxin ve monocyte chemoattractant proteinler, potent eozinofil kemoattractanları ve histamin releasing faktör türünde mediatörler olarak görev yapmakta ve alerjik inflamasyonda da önemli rolleri bulunmaktadır. Ülseratif kolit ve Crohn hastalığı bulunan hastaların intestinal dokularında bazı kemokinlerin anlamlı artışı gözlenmektedir.

inflatuvar süreçte kemokinlerin sentezi ve salınımindaki belirgin artım lökositlerin inflamasyonlu dokuya geçişlerinde önemli rol oynamaktadır. Uygun uyarılar altında deri, beyin, eklemler, akciğerler, kan damarları, böbrekler ve meninges gibi dokularda kemokinlerin sentezinin arttığı gözlenmiştir (Zlotnik A 2007).

İnflamasyon sonucu kemokinlerin sentezini arttıran en önemli uyarıcılar IL-1, LPS, TNF- α , IFN- α ve IL-4'dir. Kemokinlerin artımı birçok dokuda lökositlerin inflamasyon bölgesine gelmesine ve birikimine neden olmaktadır. Alerjik veya otoimmün

inflamasyonlarda immün sistem ve inflamatuvar yanıttan sorumlu hücrelerin inflamasyon alanında birikimi kemokinlerin etkisi sonucu oluşmaktadır. Mukozalara nötrofillerin, monositlerin ve makrofajların gelmesi, yerleşmesi ve inflamatuvar sürece katılımları da yine büyük oranda kemokinlerin katkısına bağlıdır. Damar içinde “steady-state” homeostaz durumunda dolaşımına devam eden lökositlerin inflamasyon sürecini başlatan sinyallerin, özellikle kemokinlerin etkisi altında önce endotel hücreleri ve daha sonra da matriks proteinleri ile etkileşimleri gerekmektedir. Dokulardan ve hücrelerden açığa çıkan başta CXC tipteki kemokinler olmak üzere büyüme faktörleri, adezyon molekülleri ve sitokinlerin yaratmış olduğu ortam inflamasyon, anjiogenez, doku tamiri ve yeni doku yapımında önemli görevler üstlenmektedir. İnflamatuvar süreci damar dışındaki dokuda başlatan uyarıdan (bakteri, cerrahi, ag-ab kompleksi, v.b.) sonra trombositlerden salınan PDGF, VEGF-A gibi maddeler, CXC türünde CXCL1, CXCL5, CXCL7, CXCL4 gibi kemokinler ilk aşamada invazyon yapmakta olan mikroorganizmalara karşı bir bariyer oluşturmakta etkin olurlar. Damar duvarında ifade edilen CXCL1 nötrofil diapedezini kolaylaştırır ve CXCL1 ile CXCL8’in birlikte ko-ekspresyonları yara/veya infeksiyon bölgesine nötrofil migrasyonunu sağlar. Bölgeye gelen nötrofiller reaktif oksijen türevleri ve değişken sayılarda proteinazlar sentezleyerek fagositozu kolaylaştırırlar. Böylece hücre artıkları, degradasyon ürünleri ve diğer mikrobiyal artıklar inflamasyon sahasından temizlenmeye çalışılır. Neovaskülerizasyon sürecinde bulunan endotel hücrelerinde CXCR2 reseptör ekspresyonu olur ve 1.ci ile 4.cü günler arasındaki yoğun anjiogenez sırasında yeni damarlar belirirken CXCL8 ekspresyonu da giderek artış gösterir. Yara bölgesinde böylece granülasyon oluşumu ve fazla sayıda kapiller damar ortaya çıkar. Nötrofil birikimini takiben CCL2 ile CCR2A reseptör ilişkisi sonucunda bölgeye monosit ve makrofajların geldiği izlenir. IL-1 ile TNF- a'nın inhibitör etkisi altında 6.cı güne kadar fibroblastlar ve keratinositlerden sentezlenen CXCL12 yapımı gittikçe azalır. Daha sonra, 14.cü günden itibaren bölgeye CXCL9 ve CXCL10'un etkileri altında fazla sayıda lenfosit birikimi olur. Ayrıca, HEV-endotel hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen CXCL11'in etkisi ile lenfosit kemotaksisi artabilir. Aktive lenfositlerin de CXCR3-A ekspresyonlarında artışı olur. Yara bölgelerinde gelişen inflamasyonlarda keratinositlerin migrasyonu ve proliferasyonu dermal fibroblastların da yara alanına ilerlemesine kolaylık sağlar. Bu hücreler kontraktıl bir fenotipe dönüşerek miyofibroblastlar şekline transforme olabilirler. Artan keratinosit proliferasyonu sonucunda CXCL8 epitelizasyonu uyarır ve sonuçta bölgede CXCL10 ve CXCL11'den gelen sinyallerin etkisi altında kollajen sentezi hızla artarak yara iyileşmesi skarlaşma ile sonuçlanır. Sonuç olarak, inflamasyon sürecinde

damar içinden, endotel hücre duvarına, transendotelial migrasyon ve inflamasyon bölgesine kadar olan hücre trafiği değişik tür ve sayıda kemokin ve kemokin reseptörlerinin etkisi altında gerçekleşmektedir. Özellikle CXCKemokinler hem inflamasyon hem de anjiogenezde koordinasyon halinde süreci etkilemektedirler. Bu sürecin düzenlenmesindeki bozukluklar kronik inflamasyonun başlamasına hatta immün sistem hücrelerini de etkileyerek hücrelerin neoplastik transformasyonuna yol açabilmektedir. Günümüzde, CXC kemokinler ve/veya CXC-reseptörlerini hedefleyen endotel hücreleri, perivasküler hücreler ve inflamatuvar hücreleri içeren yeni terapötik yaklaşımlar üzerinde çalışılmaktadır. Birçok infeksiyon hastalığında kemokinlerin ve kemokin reseptörlerinin görevleri olduğu tespit edilmiştir. Kemokin reseptörleri, çok önemli iki insan patojeni olan *Plasmodium* ve AIDS etkeni *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) için koreseptör görevi yapmaktadır. Kemokinler ve kemokin reseptörleri ayrıca anjiyogenezin, tümör büyümesinin ve stem hücre proliferasyonunun modülasyonunda da önemli rol oynamaktadırlar. Kemokinler, anjiyogenezin ve tümör büyümesini modüle etmekte ve stem hücre proliferasyonunu da inhibe etmektedirler. Platelet faktör- 4 ve IP-10 neovaskülarizasyon, tümör büyümesi ve metastazı inhibe etmektedir. Buna karşılık interlökin-8, anjiyogenezi ve tümör metastazının oluşumuna yardımcı olmaktadır. Anjiyogenezin inhibisyonuyla ilgilimekanizmanın altında yatan neden olarak, ilişkili bulunan kemokinlerin, diğer büyüme faktörleriyle (basic fibroblast growth faktör ve transforming growth faktör- a) yer değiştirmesi şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Kemokinlerin lökosit hareketlerini kontrol etme kapasiteleri bulunmaktadır. Yapılan birçok hayvan deneylerinde kemokin aktivitelerinin nötralizasyonu terapötik değer taşımaktadır. Kemokin veya kemokin reseptörlerinin antagonistleri otoimmün, allerjik ve septik olayların oluşumunu inhibe etmektedir. Bunlara ek olarak kemokinler infeksiyon, tümör ve aşılarla karşı konakçı cevabını da güçlendirmektedir. Kemokinlerin diğer sitokinlerle kombinasyonu daha etkin olup antitümör terapinin oluşumunu sağlamaktadır. Kemokinler ve analogları,HIV-1 infeksiyonunda ve hastalığın gelişiminde inhibitörler olarak klinik açıdan çok kullanışlı olabilecekleri konusunda görüşler ileri sürülmektedir.

2.4.2.2.Sonradan Edinilmiş Bağışıklıkta Rol Alan Sitokinler

Çizelge 2.4.2.2.1 Sonradan edinilmiş bağışıklıkta rol alan bazı sitokinler

Sitokin	Hücre kaynağı	Hedef Hücre ve Biyolojik Etki
IL-2	T hücresi	T hücreleri: sitokin sentezini arttırır, Fas-aracılığı ile

			apoptosisi artırır	B hücreleri: proliferasyon, antikor sentezi (in vitro)
IL-4	CD4+	T	B hücreleri: IgE 'ye izotip switching	T hücreleri: TH2'ye hücreleri, mast dönüşüm, proliferasyon
			hücreleri	Makrofajlar: IFN- γ aracılığı ile aktivasyonun inhibisyonu
				Mast hücreleri: proliferasyon (in vitro)
IL-5	CD4+	Thücreleri	Eozinofiller: aktivasyon	B hücreleri: proliferasyon, IgA üretimi
IFN- γ	CD8+	Thücreleri,	Makrofajlar: aktivasyon	B hücreleri: IgG'ye izotip switching
		NK hücreleri	T hücreleri: TH1 farklılaşması	Çeşitli hücreler: sınıf I ve sınıf II MHC molekül ekspresyonu artışı
TGF- β	Thücreleri,		T hücreleri: proliferasyon ve	efektör fonksiyonların inhibisyonu
	makrofajlar,			
	diğer h. tipleri		B hücreleri: proliferasyonun	inhibisyonu, IgA üretimi
Lenfotoksin (LT)	T hücreleri		Makrofajlar: inhibisyon	Nötrofillerin çağırılması ve lenfoid organogenez
IL-13	CD4+	T hücreleri	B hücreleri: IgE 'ye izotip switching	Epitelyal hücreler: mukus üretiminin artışı
			Makrofajlar: inhibisyon	

IL-2 ve Biyolojik Rolü

Antijenle uyarılan T lenfositler için bir büyüme faktörüdür ve antijenle etkileştikten sonra T hücrelerinin çoğalmasından (klonal ekspansiyon) sorumludur. Üretildiği hücre üzerine etkindir (otokrin büyüme faktörü). (Shapiro SD2003) (Çizelge-3-)

Antijenle etkileşen T hücrelerinden salınır ve bu hücreleri proliferere eder. Ayrıca, T hücrelerinde IFN- γ ve IL-4 gibi sitokinlerin salınımını uyarır, NK hücrelerinin gelişimini ve sitotoksik etki göstermelerini sağlar. Bu hücreleri lenfokin-aktif hücreler haline dönüştürerek sitolitik fonksiyonlarını artırır, B hücrelerini gelişim ve antikor salmaları için uyarır ve aktif T hücrelerinin Fas yolu ile apoptozisini hızlandırır.(Shapiro SD2003) (Çizelge-3-)

IL- 4 ve Biyolojik Rolü

IgE antikorlarının oluşumundaki en önemli uyarandır. CD4+ hücrelerden TH2 hücrelerin gelişimini sağlar.

B hücrelerini IgE izotip switching için uyarır. IgE allerjik reaksiyonların en önemli meadiatörüdür. Bu nedenler IL-4 üretimi allerjinin gelişimi açısından CD4+ hücrelerden TH2 hücrelerin gelişimini uyarılmak için otokrin büyüme faktörü olarak görev yapar ve IFN- γ 'nın makrofaj aktivite edici etkisine antagonist bir etki yaparak hücre aracılığı ile bağışıklık yanıtları inhibe eder(David S 2007).

IL- 5 ve Biyolojik Rolü

Eozinofillerin aktivatörüdür ve T hücresi aktivasyonu ile eozinofilik inflamasyon arasında bağlantı oluşturur. Olgun eozinofillerin aktivasyonu (aktif eozinofiller helmintleri öldürme yeteneğine sahiptir),eozinofillerin gelişim ve farklılaşmasını uyarılmak ve B hücrelerinin proliferasyonunu ve IgA salınımını uyarılmak(David S 2007).

IFN- γ ve Biyolojik Rolü

NK hücreleri, CD4+ TH1 hücreler ve CD8+ T hücreler tarafında üretilir, primer makrofaj aktive edici sitokindir ve hem doğuştan hem de sonradan edinilmiş bağışıklıkta önemli fonksiyonları vardır . IFN- γ aynı zamanda immun ya da tip II IFN olarak da adlandırılır ve kısmen antiviral aktiviteye sahiptir. Genel olarak immun yanıtta efektör sitokin olarak görev yapar(David S 2007).

Nitrik oksit ve reaktif oksijen ara ürünlerinin sentezini uyarılmak makrofajların mikrobiyal fonksiyonlarını artırılmak, APC'ler üzerinde sınıf I ve sınıf II MHC moleküllerinin ekspresyonunu uyarılmak ,vaskular endotelial hücrelerin aktivatörüdür , TNF'nin endotelial hücreler üzerine birçok etkisini artırılmak, böylece T lenfositlerin adezyonu ve infeksiyon sitesine göçü kolaylaşır, CD4+ T hücrelerin TH1 alt gruplarına farklılaşmasını indüklerken TH2 hücrelerine farklılaşmasını engeller , B hücrelerini bazı IgG alt sınıflarının oluşumu için indükler. IFN- γ ile indüklenen IgG altgrupları fagositlerin üzerindeki Fc γ reseptörlerine bağlanılmak ve kompleman aktivasyonuna neden olur. Bu mekanizmalar opsonize mikropların fagositozunu hızlandırılmak ve Nötrofilleri aktive eder ve NK hücrelerinin sitolitik aktivitesini artırılmak(David S 2007).

Transforming Büyüme Faktörü- β (TGF- β) ve Biyolojik Rolü

Lenfositlerin ve diğer lökositlerin proliferasyonunu ve aktivasyonunu inhibe eder.

T hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşmasını ve makrofajların aktivasyonunu inhibe eder. TGF- β aynı zamanda nötrofi ve endotelial hücreler üzerinde de etkilidir. Bu aktiviteleriyle TGF- β inflammatör ve immun yanıtları inhibe eder ve B hücrelerini IgA salmalarını için uyarır.

Lenfotoksin (LT)

T lenfositlerinden ve diğer hücrelerden üretilir. %30 oranında makrofaj kaynaklı TNF ile homoloji gösterir ve benzer fonksiyon gösterir. Bu nedenle LT , TNF- β olarak adlandırılır. LT endotel hücreleri ve nötrofilleri aktive eder, bu nedenle akut inflammatör yanıtın bir mediatörü olarak görev yapar ve bu biyolojik etkiler TNF'ninkine benzer.

IL-13 ve Biyolojik Rolü

Yapısal olarak TH2 CD4+ T hücreleri tarafından salınan IL-4'e benzer. Bu nedenle IL-13, makrofajlar gibi lenfoid olmayan hücreler üzerine etki eder, ancak T ve B lenfositlere etkisi IL-4 kadar değildir. IL-13'ün major etkisi makrofajların aktivitesini inhibe etmektir ve IFN- γ 'ya antagonisttir. Akciğer epitelyal hücrelerde mukus üretimini artırır ve IL-13'den yoksun knockout farelerde IgE üretiminin azaldığı ve allerjik reaksiyonlar geliştiği belirlenmiştir(David S 2007).

2.4.3.Hematopoezde Rol Alan Sitokinler

Çizelge 2.4.3.1 Hematopoezde rol alan sitokinler. (Rossi D 2000)

Sitokin	Hücre kaynağı	Hedef Hücre	İndüklediği Hücre grubu
Kök hücre faktör (c-kit)	Kemik iliği stromal hücreler	Pluripotent kök hücresi	Tüm hücreler
IL-7	Fibroblastlar, kemik iliği stromal hücreler	İmmatür lenfoid öncü hücreler	B ve T lenfositler
IL-3	T hücreleri	İmmatür öncü hücreler	Tüm hücreler

GM-CSF	T hücreleri, makrofajlar, endotelial hücreler, fibroblastlar	İmmatür öncü hücreler Makrofajlar	Granülosit, monosit, makrofaj ailisi
M-CSF	Makrofajlar, endotelial hücreler, kemik iliği hücreleri, fibroblastlar	Öncü hücreler	Monosit
G-CSF	Makrofajlar, endotelial hücreler, fibroblastlar	Öncü hücreler	Granülosit

2.4.4.Toll Benzeri Reseptörleri(TLR) ve Biyolojik Rolü

TLRler, kalıp tanıma reseptörlerinin (PRR) bir çeşididir ve patojenlerle geniş ölçüde paylaşılmış fakat ev sahibi moleküllerinden ayırt edilebilen molekülleri, yani tamamiyle; patojenlerle ilişkilendirilmiş molekül kalıpları (PAMPlar) olarak adlandırılan molekülleri tanırlar. Bir reseptör üst ailesi olan interlökin-1 reseptörleri ile yaygın olarak Toll-IL-1 reseptör(TIR) diye adlandırılan alanı oluştururlar.

TIR alanının 3 alt grubu bulunmaktadır:

Alt grup TIR 1 bölgelerini içeren proteinler; makrofajlar, monositler, [dendritik hücreler](#) tarafından üretilen interlökin için reseptörlerdir ve hepsi ekstraselüler [immüoglobulin](#) sahaları bulundururlar. Proteinin alt grup TIR 2 bölgesini içerenleri klasik TLRlerdir, ve mikrobiyal kökenli molekülleri direkt ya da indirekt olarak bağlarlar.

TIR 3 bölgelerini içeren proteinlerin 3. bir alt grubu; proteinlerin 1 ve 2. alt grupları arasında sinyalleme aracılık eden ve sadece sitosolik adaptör proteinlerden oluşur.

TLR'ler, omurgasızlarda da, omurgalılarda buldukları gibi bulunurlar. TLR'lerin bakteriler ve bitkilerde ve bitkiler aleminde enfeksiyon karşısında ev sahibinin savunmasında gerekli olarak bilinmektedirler. TLR'ler, bu suretle eski zamanlardan beri bağışıklık sisteminin korunmuş bileşenleri gibi görünmektedir.

Çoğu memeli türünde on ila on beş arasında Toll benzeri reseptör tipinin bulunduğu tahmin edilmektedir (Du, X 2000). Onüçüncü TLR (basitçe TLR1'den TLR13'e

isimlendirilmişlerdir) fareler ve insanlarda birlikte tanımlanmışlardır, bunların bazı eşit formları diğer memeli türlerinde de bulunmuştur ([Ulevitch,R.J. 2000](#))(Tabeta,K. 2004)

Bununla beraber, TLR'lerin insanlarda bulunan belirli eşit formları memelilerin hepsinde bulunmaz. Örneğin insanlarda TLR10'un benzeri (analoğu) olan bir protein için gen kodlama farelerde de sunulur, fakat bazı noktaları retrovirüsler tarafından geçmişte hasara uğratılmış gibi görünmektedir. Diğer taraftan, insanlarda bulunmayan TLR11, 12 ve 13 farelerde (ifade) eksprese edilir. Diğer memeliler insanlarda bulunmayan TLR'leri ifade edebilirler. Bu, insanlardaki doğuştan gelen bağışıklıkta, model canlı olarak kullanılan deney hayvanları kullanımını karmaşıklştırabilir.

Toll benzeri reseptörler (ve diğer doğuştan gelen bağışıklık reseptörleri) özgüllüklerinden dolayı evrim sürecinde kolayca değişmezler, bu reseptörler tehditlerle (patojenler ya da hücre stresi gibi) ilişkilendirilen molekülleri daima tanırlar ve bu unsurlara yüksek özgüllük gösterirler (kendi molekülleriyle karşılaştıklarında yanılmazlar). Bu gerekliliğe uyan patojenle ilişkili moleküller genellikle patojenin işleviyle tehlikelidirler ve mutasyonlarla silinemez ya da değiştirilemezler, bu özellikleriyle "evrimsel olarak korunmuş" sayılırlar. Patojenlerde korunan özellikler; bakterilerde hücre yüzeyi lipopolisakkaritleri (LPS), lipoproteinler, lipopeptidler, ve lipoarabinomannan; bakteriyal kamçıdan flagellin gibi proteinler; virüslerin çift zincirli RNA'sı veya bakteriyal ve viral DNA'nın metillenmemiş CpG adaları ve diğer RNA ve DNA'lardır.

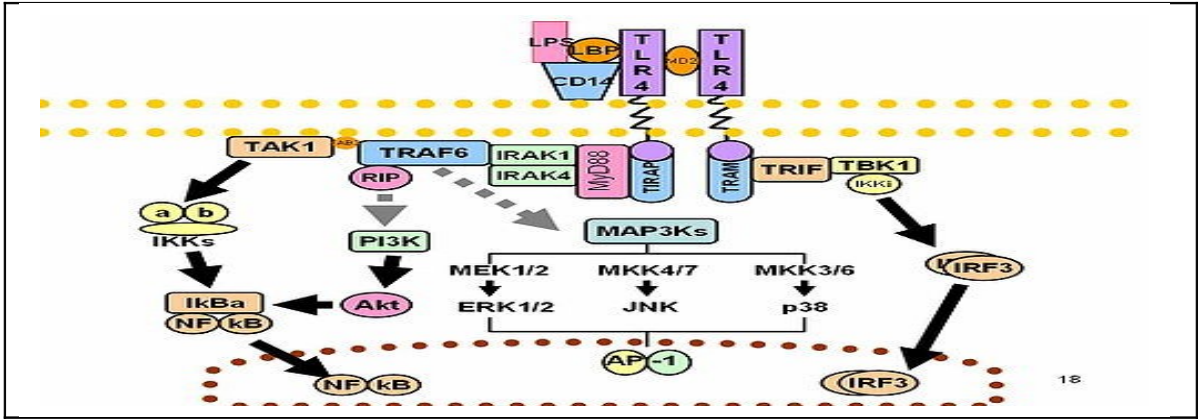
TLR'lerin çoğu için bağlayıcı tanıma özgüllüğü, günümüzde gen-hedeflenmesi (ya da "gen değiş-tokuşu") olarak bilinen bir teknikle, farelerde yalnızca seçilen genlerin silinmesiyle saptanmıştır (Hoebe,K 2003)(Hemmi,H 2000).

TLR etkinliğince uyarılan stereotipik yangı yanıtı, TLRlerin endojen aktivatörlerinin kendine bağışık hastalıklarda payı olduğu kurgularını beraberinde getirmiştir.TLRlerin ev sahibinin, (kan pıhtılaşmasıyla ilişkili) fibrojen ve ısı şoku proteinleri (HSPler) ve konak DNAsını da kapsayan moleküllerine bağlandığından şüphelenilmektedir.

TLRlerin dimerler olarak işlevleri olduğuna inanılmaktadır. Çoğu TLR homodimer olarak fonksiyon gösterse de, TLR2, TLR1 ya da TLR6 ile heterodimerleri oluşturur, her dimer farklı bir bağlayıcı (ligand) özgüllüdedir. TLRler ayrıca, tam bağlanma duyarlılığı için,

TLR4'ün LPS'yi tanıması durumunda MD-2'ye ihtiyaç duyması durumunda olduğu gibi, diğer yardımcı-reseptörlere bağlı olabilirler.(Şekil 2.2)

CD14 ve LPS Bağlayıcı Protein (LBP) LPS'nin MD-2'ye sunumu kolaylaştırmakla bilinmektedir.



Şekil2.2. Hücre içindeki apoptozis oluşum mekanizmaları.

Toll-benzeri reseptörlerin işleyiş mekanizması. Kesikli gri çizgiler bilinmeyen ilişkileri göstermektedir. TLR sinyallemede aracılık yapan aracı proteinler ve kinazlar ayrıca hedeflenirler. Ek olarak; Bruce Beutler'in laboratuvarında ENU ile birlikte rastgele eşey hücre öncülü mutagenesi, TLR sinyalleme yollarını çözmek için kullanılmıştır.

TLRler etkinleştirildiklerinde bir sinyali başlatmak için aracı molekülleri hücrelerin sitoplazmaları içersinden çağırırlar. Sinyallemeyle ilişkili olarak dört aracı molekül bilinmektedir. Bu proteinler MyD88, Tirap (Mal diye de bilinir), Trif, ve Tram'dır. Bu aracılar hücre içindeki diğer molekülleri, sinyali yükselten belli protein kinazlarla (IRAK1, IRAK4, TBK1 ve IKK α) etkinleştiriler ve nihayetinde yangı yanıtını planlayan genlerin baskılanmasına ya da göreve getirilmesine öncülük ederler. Sonuç olarak, TLR sinyallemesiyle binlerce gen etkinleştirilir; TLRler, gen düzenlenmesi için en güçlü ve önemli kapılardan birini oluşturmaktadırlar.

2.4.5. Atherosiklerozda Apoptozisin Önemi

Sıklıkla programlı hücre ölümüne eşdeğer olarak kabul edilen apoptozis, çok hücreli organizmaların genetik şifrelerinde bulunan “hücre intiharı” programlarının gelişimsel ve/veya çevresel uyarımlarla etkinleşmesi sonucu ortaya çıkan, gelişim ve farklılaşma sırasında organ yapısı ve işlevlerinin aktif değişimini sağlayan fizyolojik hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (Cohen JJ, 1998). Bir başka deyişle, hücrelerin, popülasyonun geri kalanının iyiliği gerektirdiğinde herediter olarak kendilerinde varolan intihar programını devreye sokarak programlı bir şekilde, çevreye hiç zarar vermeden yaşamlarını yitirmelerine denir. Yunanca’da “ağaçların yapraklarını dökmesi” anlamına gelen apoptozis, ilk kez biyomedikal literatürde 1972 yılında Kerr tarafından “mitozun karşıt anlamı” olarak kullanılmıştır (Narula J 1997). Apoptozis, bugüne dek bildiğimiz tek tip hücre ölümü olan nekroza oldukça farklıdır. Nekroza, akut hücre hasarını takiben hücre ve organellerinin şişip lizise uğradığı pasif ve patolojik bir hücre ölümü söz konusudur. Nekroz, eksternal güçlerin etkisi ile koruyucu mekanizmaların devreye girmesine fırsat vermeyecek şekilde gelişir. Nekroza zarar gören esas hedef organel, hücrenin enerji kaynağı olan mitokondriumdur. Nekroz sırasında hücrenin su ile şişirilerek patlaması sonucunda ortama hücre içeriğindeki moleküllerin çıkması ile inflamatuvar yanıt oluşur. Apoptozis ise nekroza farklı olarak aktif işlev gerektiren genetik kontrollü bir süreçtir. Apoptozis sırasında hücre büzülür ve 1 saatten kısa bir sürede hacminin %30’nu kaybeder. Mitokondrium morfolojik olarak sağlamdır, ancak burada esas hasarlanan hedef organel, hücre çekirdeğidir. Nükleusta kromatin yoğunlaşarak DNA parçalanır. Bu DNA parçaları hücre zarı ile kaplıdır (apoptotik cisimcikler) ve ortamdan çevredeki hücreler tarafından fagositozla uzaklaştırılırlar. Apoptozis sırasında hücre içeriği ortama çıkmadığından inflamatuvar bir yanıt gelişmez. Apoptozun aşırı olduğu durumlarda ortamdaki makrofajlar apoptotik cisimcikleri yeterli fagositozla temizleyemezlerse bunlar degrade olarak sekonder nekroza uğrayabilirler ve inflamasyona yol açabilirler (Gavrieli Y 1992). Programlanmış hücre ölümü, embriyogenezis, organ involüsyonu (örn: timus), immünolojik reaksiyonlar ve diferansiye hücrelerin yaşam sürelerinin sonlanması gibi birçok fizyolojik olayda yer almaktadır (Hoebe,K 2003). Ayrıca değişik hücre tiplerinde farklı çevresel uyarılar apoptozisi başlatabilir. Hemen hemen tüm hücrelerde iyonizan radyasyon, inflamatuvar sitokinler, immunoregülatuvar sitokinler, oksidatif stres, redoks potansiyelinde değişiklikler, büyüme faktörleri veya trofik faktörlerin ortamdaki kaybolması, mekanik stres apoptozisi başlatabilmektedir(Gavrieli Y 1997)(Wyllie AH 1986). Apoptozis reaktif oksijen radikalleri ile uyarılabilir. Antioksidan enzimlerin azalması, apoptozisin uyarılmasından sorumlu hücreler reaktif oksijen radikallerinin artışına

neden olabilir. Apoptozis fetusta normal doku gelişiminin temel özelliğidir. Normal erişkin dokularında ise hücre büyümesi ve apoptozis bir denge içindedir. Bu dengenin biri lehine bozulması çeşitli patolojilere yol açmaktadır. Genetik hücre ölüm programının hatalı ekspresyonu veya apoptotik hücre ölüm programının eksik uygulanması çeşitli karsinom, otoimmün hastalıkların ve viral infeksiyonların patogeneğinde rol oynamaktadır(Çizelge-2.4.5.1).

Çizelge-2.4.5.1 Apoptozisi baskılayan ve indükleyen genler.

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
<ul style="list-style-type: none"> • Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1 1 • c-abl geni 2 • ras onkogeni 3 • çözünebilir fas 4 • p35 5 • A20 	<ul style="list-style-type: none"> • Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk1 1 • c-myc 2 • p53, p21 3 • fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST 1 • interlökin dönüştürücü

Sitokrom C

Mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması apoptozis yoluna girmiş bir hücrede irreversibl bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom c, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör ("AIF,apoptosis-inducing factor") ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom c sitoplazmik protein olan Apaf-1 ("apoptotic protease activating factor-1")'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü ("ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease") inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz ("CAD, caspase-activated deoxyribonuclease")

serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur

Apoptozisde Mitokondrinin Rolü

Apoptozisi başlatan yolların kesiştiği kavşak noktanın mitokondri olduğu görülmüştür. Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte irreversibl (geri dönülemez) noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması gerçekleşir (apoptozisin başlaması) veya sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması baskılanır (apoptozisin inhibisyonu).

2.4.5.2.1.Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri pro-apoptotik, apoptozisi indükleyici, etkiye sahiptir. Diğeri ise anti-apoptotik, apoptozisi baskılayıcı, etkiye sahiptir. Pro-apoptotik olanlar, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınmasını indüklerler. Anti-apoptotikler ise sitokrom c salınmasını baskırlar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik a-heliks) bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2, ve BH3 bölgeleri hidrofobik cep'i oluşturur. Amfipatik a-heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğeri bcl-2 ailesi üyesinin BH3 bölgesine bağlanırlar. Pro-apoptotik üyeler kendi içinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt gruplardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (örn, Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğeri hücrel yollarla "pathway" ilişkisini kurduğu düşünülmektedir. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak "intrinsic" sitokrom c'nin salınmasını baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom c salınması gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir. Anti-apoptotik bcl-2 ailesi

üyelerinin en iyi bilinenleri :bcl-2, bcl-Xl, Mcl-1 iken, pro-apoptotik olanları ise: bax, bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid'dir.

3.MATERYAL VE YÖNTEM:

3.1. MATERYAL

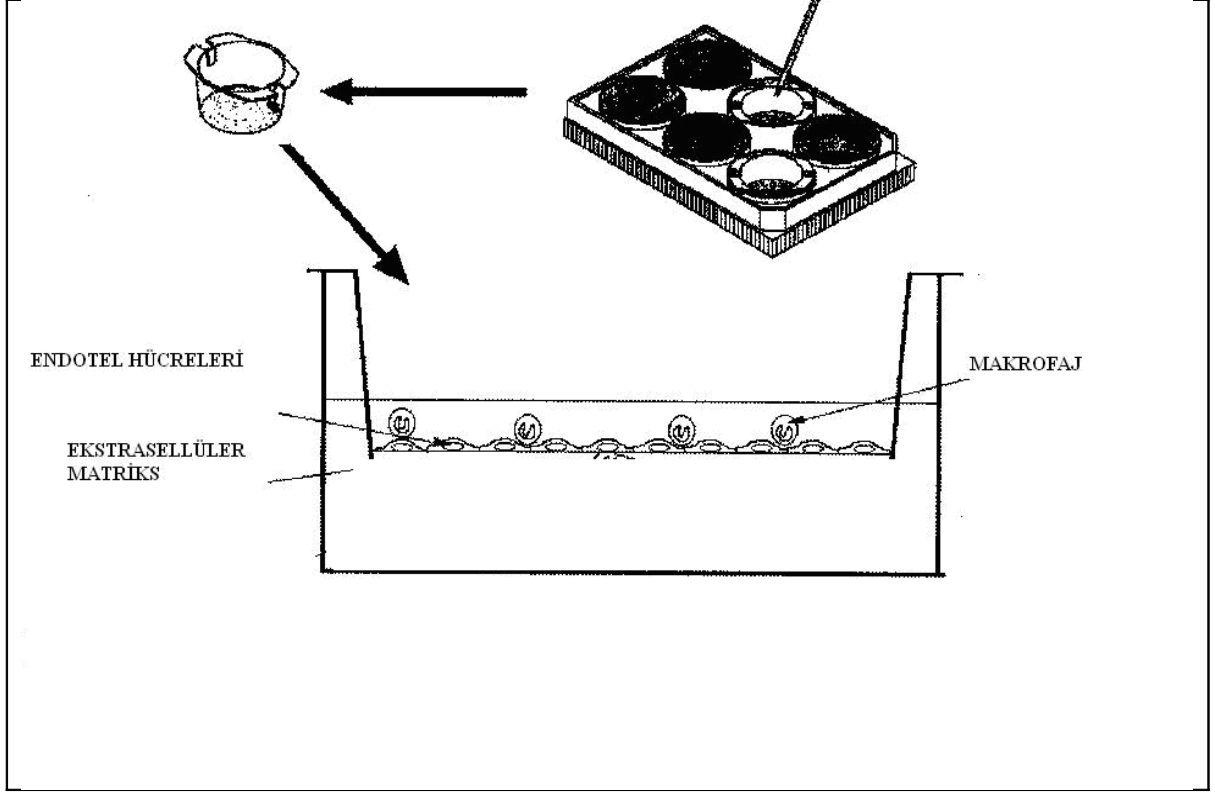
Tez kapsamında damar içerisinde oluşan inflamasyona damar iç yapısında bulunan endotel ve monosit hücrelerin nasıl cevap verdiğini incelemek amacıyla iki farklı hücrenin kokültürünün yapılmış ve bu amaçla insan THP-1 Myelositik lösemi hücreleri (ATCC) ve insan koroner arter endotel hücreleri (PH30005A HCAEC, BioCat) kullanılmıştır. Hücre kültür ortamında inflamasyon bakteriyel ürün olan LPS'e ile sağlanmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1.Hücre Kültürü

THP-1 hücreleri %10 Fetal Bovin Serumu (FBS), 100 ug/ml streptomisin, 100 U/ml penisilin ve 2 mM L-Glutamik asit içeren RPMI 1640 besi yeri içinde kültüre edilmiştir. Koroner arter hücreleri için özel endotel besi yeri M199 kullanılmıştır. Kültür; steril koşullar altında 37°C de, % 5 CO₂ ihtiva eden etüvlerde gerçekleştirilmiştir. Hücre proliferasyonlarının değerlendirilmesi için hücrelerin 96 kuyulu plaklarda kültüre edilerek, kokültürlerin ise 6 lı veya 24 kuyulu plaklarda tekli, ikili, üçlü hücre kültürü yapılarak gerçekleştirildi (Şekil 3).

1. THP-1 insan monositleri (lösemi kökenli hücre dizisi) doğrudan ve 100 ng/ml phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA) ile makrofaja dönüştürüldükten sonra hücre kültürü ortamına eklenmiştir.
2. Monosit ve makofajlar bakteriyel ürün olan lipopolisakkarit (E. Coli ,0111, LPS) ile uyarılarak aktive edilecek ve endotel ve makrofaj hücre protein cevapları değerlendirilmiştir. (2li kokültürde bu 2 hücrenin protein cevapları değerlendirilmiştir)
3. LPS (1 µg/ml) iki hücre tipinde hücre çoğalmasına ve apoptosise etkileri değerlendirilmiştir. (Schaub R 2007)



Şekil 3.2.1.1 Ko-kültürde Transwell filtre kullanımı

3.2.2.Proliferasyon Değerlendirilmesi

Hücre çoğalmasının saptanması için tetrazolium tabanlı kolorimetrik bir yöntem olan MTT yöntemi kullanılmıştır. Zamana ve doza bağlı olarak çeşitli etken maddeler ile inkübasyona bırakılmış hücreler MTT ile muamele edilerek formazan kristalleri oluşturması sağlanmış ve oluşan bu kristaller belli bir çözücü ile çözüldükten sonra spektrofotometrede değerlendirilmiştir. Hücrelere deney protokollerine uygun olarak LPS uygulandıktan sonra 24 ve 48. saatlerde MTT uygulanmıştır.

3.2.3.Apoptosis Değerlendirilmesi:

Hücre dizilerinde apoptosisin değerlendirilmesi için normal koşullarda ve LPS uygulaması sonrasında kaspaz-3 düzeyi ölçümü yapılmıştır. Apoptosis ölçümleri MTT değerlendirmelerinin yapıldığı gruplarda her grupta 8 li tekrar olmak üzere aynı düzenleme ile yapılmıştır. Kaspaz -3 düzeyleri deney protokollerine uygun olarak LPS uygulandıktan sonra 2. ve 24. saatlerde değerlendirilmiştir. Apoptosis ölçümü için 200.000 hücre/ml, uygun tampon ile lizise uğratılmıştır (50 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, % 0.1

CHAPS, 10 mM DTT, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, %0.1Triton X-100). Florimetrik substratlarla (R110 Ac-DEVD-pNA, Ac-YVAD-pNA, IETD-pNA, or LEHD-pNA.) 25° C'de inkübe edilerek florimetrede ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.3.1. Bradford Yöntemleri İle Protein Miktar Tayini

Bovine serum albumin (BSA) ile çeşitli oranlarda standartlarımız hazırlanır (250, 500, 750, 1000 µg/ml).5X 'lik Bio Rad (USA) protein assay dye reagent concentrate boyadan 1X hazırlanır (örnek sayısına göre miktar belirlenir). Çeşitli dilusyonlarda stok örnekler hazırlanır (1:5 ,1:10 ,1:20 ,1:30 ,1:40)Kör (blank) lizis tamponu veya suyla hazırlanır. Stok örneklerden 10 ' ar µl alınarak üzeri etiketlenen temiz ependorflara alınır. Ardından hazırlanan boyadan 490 'ar µl üzerine eklenir. Yaklaşık 5 dakika örneğin boya ile etkileşmesi beklenildikten sonra Bio Rad (USA) Smart Spec spektrofotometrede tek kullanımlık plastik küvetlerle 595 nm 'de abzorbanlarına göre protein miktarları ölçülür(White MY 2007).

3.3.2 Rehidratasyon

2D (ikinci boyut) jel elektroforezi için 3-10 pH aralıklı Immobilize pH Gradient (IPG) şeritler (stripler) kullanılmıştır (Bio Rad, ABD). Protein miktar tayininden ardından miktarla orantili olarak rehidrasyon tamponu ile örnek karıştırılır. Ardından bu karışım ve hemen arkasından IPG şerit (Bio Rad,ABD) tablasına konur. Evaporasyonu önlemek amacıyla mineral yağ tablaya şerit üzerine konur. IPG şeritin rehidrasyonu 18 ile 24 saat arasında sürmektedir. Rehidrasyon tamponu(Ure 7 M ,ThioUre 2M ,Amfolit %0.2, CHAPS % 4 ,HED %1 ,DTT %1) ile aynı zamanda içindeki maddelerden dolayı disülfür bağları parçalanmaktadır (White MY 2007).

3.3.3 İzo Elektrik Odaklama (IEF)

IPG şeritlere örnek emdirildikten sonra (rehidrasyon aşaması) temiz bir tablaya konur. Ancak bu tabla rehidrasyonda kullanılan farklı olarak elektrik akımının geçmesini sağlayan elektrotları içermektedir. İzo elektrik odaklama belirli bir akımda şeritlerdeki proteinlerin pH ' larına göre ayrılmasını sağlar. Bu akımın geçebilmesi için bu tablalarda sağında ve solunda olmak üzere (akımı sağlamak amacıyla anot ve katot olan iki tel) boyuna iki adet paslanmaz tel geçmektedir. Bu tellerin şeritler üzerindeki jeli yakmaması için wicks adı verilen küçük kağıtlar ıslatılarak konur.

Ardından yeniden IPG şeritler yerleştirilir. Yine evaporasyonu önlemek amacıyla mineral yağ konur. Yaklaşık 15 ile 17 saat arasında ayırım gerçekleşir(Kang JH 2006).

3.3.4. İki Boyutlu Jel Elektrofrezisi İle Protein Profillenmesi

İzoelektrik noktalarına göre ayrılan proteinlerimize ikinci aşama olarak SDS-PAGE de yani ikinci boyutta ayrılma işlemi uygulanır.SDS-PAGE jeli % 12.5 lik yürütme (running) (1,5M Tris-HCl pH 8.8 , akrilamid-bisakrilamid %40 ,%10 SDS , ultra saf su ,%10 amonyum persulfat, TEMED) ve % 4 'lük yükleme (stacking) (0.5 M Tris-HCl pH 6.8, akrilamid-bisakrilamid %40 ,%10 SDS , ultra saf su ,%10 amonyum persulfat , TEMED) olmak üzere iki farklı kısımdan oluşur. Şeritlerimiz, yine proteinlerin konformasyonlarını bozacak ve SDS-PAGE de daha düzgün bir şekilde yürümesini sağlayacak kimyasallar içeren iki farklı dengeleme tamponu ile yıkanır. Dengeleme Tamponu I (6M Üre, 1.5 M pH:8.8 Tris-HCl, % 2 SDS, % 20 Gliserol , % 2 DTT). Dengeleme Tamponu II (6M Üre , 1.5 M pH:8.8 Tris-HCl, % 2 SDS, % 20 Gliserol , % 2 Iodoasetamid, BBF). Ardından IPG şeritler izleme boyası bulunan %0.5 lik agar ile birlikte yükleme kısmına kadar itilerek yerleştirilir. Protein belirleyicisi olarak hazır protein bio belirteci (10-225 kDA Fermentas ,ABD) yüklenir. Yükleme kısmında jelin por çapı daha küçüktür. IPG şeritler gelen proteinlerin düzenli bir şekilde yürümesini sağlar. Ardından esas yürüme aşaması running kısmında başlar. pI'larına göre ayrılan proteinlerimiz artık moleküler ağırlıklarına göre ayrılmaya başlar. Jelimizin 1X 'lik SDS tamponu ile belirli bir akımda ikinci boyut jel elektrofrezisi gerçekleşir (Kang JH 2006).

3.3.4.1. Boyama Ve Görüntüleme

Proteinlerin ayırımını sağlayan 2D-PAGE analizi sonrasında protein ayırımının görüntülemek amacıyla boyama işlemi gerçekleştirilir. Protein yoğunluğu ve hassasiyetine göre Floresan olan ve olmayan boyama tipleri kullanılır. Floresan boyalar Sypro, Comassie, Blue Bandit, Flamingo, Deep Purple v.b. boyalardır. Floresan olmayan boyaya gümüş boyama örnek verilebilir. Bu çalışmamızda en hassas boya olan Sypro-Ruby (Bio-Rad ABD) ile boyama tercih edilir.

Proteinlerin jele daha iyi tutunması ve jelin daha iyi boyanması amacıyla, jelimiz 3 saat ile

bir gece arasında sabitleme (%10 metanol,%7 asetik asit ,ultra saf su) tamponunda bekletildi. Sabitleme aşaması biten jel tekrar 3 saat ile bir gece arasında Sypro boyasında bekletilir. Boyama aşaması bittikten sonra fazla boyayı almak ve boyayı sabitlemek amacıyla tekrardan sabitleme tamponu uygulanır. Bu sabitleme aşamasında sabitleme solusyonunda 30 dakikadan daha fazla bekletilmemelidir. Bu aşamadan sonra ultra saf su ile 10 dakika yıkanır ve uzun süreli saklamak amacıyla içine bir damla asetik asit damlatılmış yenilenmiş ultra saf suya konur. Görüntüleme işleminde Versadoc (Bio Rad , USA) cihazı ve analizler için PD Quest 8.0(Bio-Rad) yazılımından yararlanılır (Kang JH 2006).

3.4 İstatistiksel Analiz

Bu tez kapsamında yer alan MTT ve Kaspas-3 deneylerindeki çoklu değerlendirmelerde gruplar arası fark ANOVA ve TUKEY istatistiksel analiz yöntemleri ile incelendi.

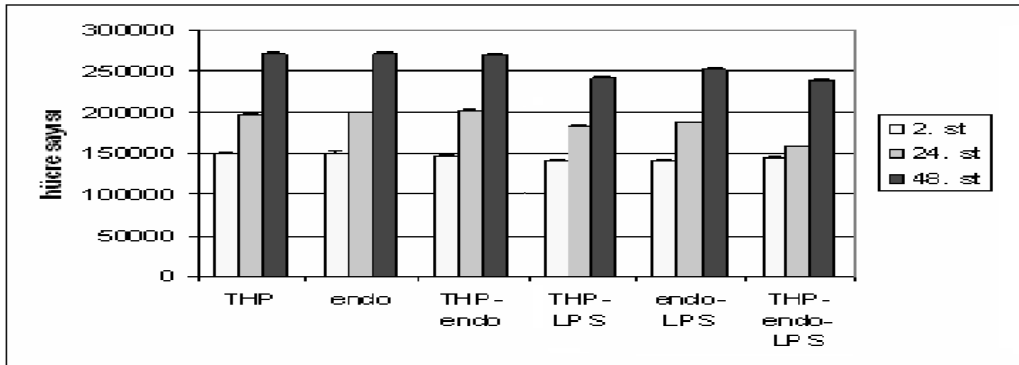
4. Bulgular ve Sonuç

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsünde Proteom Birimin'de gerçekleştirilen bu yüksek lisans tez çalışmasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ,Fizyopatoloji A.B.D. Moleküler Biyoloji Biriminde yapılan damar iç yapısı model alınarak invitro koşullarda hücre kültürü ortamında endotel (HUVEC)-monosit (THP-1) ikili hücre kültürü modeli yapılmış ve daha sonra bu model LPS ile uyarılmıştır. Hücre cevapları tekli ve ikili kültür ortamlarında değerlendirilmiştir ve anlamlı olabilecek hedef protein değişimleri açısından araştırılmıştır.

4.1.MTT Testi

Bu tez kapsamında damar iç yapısı model alınarak invitro koşullarda hücre kültürü ortamında endotel (HUVEC)-monosit (THP-1) ikili hücre kültürü modeli yapılmış ve daha sonra bu model LPS ile uyarılmıştır. Hücre cevapları tekli ve ikili kültür ortamlarında değerlendirilmiştir. Hücre proliferasyonu hücre canlılığının değerlendirildiği MTT testi ile ölçülmüştür. Sonuclar spektrofotometreden elde edilen optik densite sonucları olarak

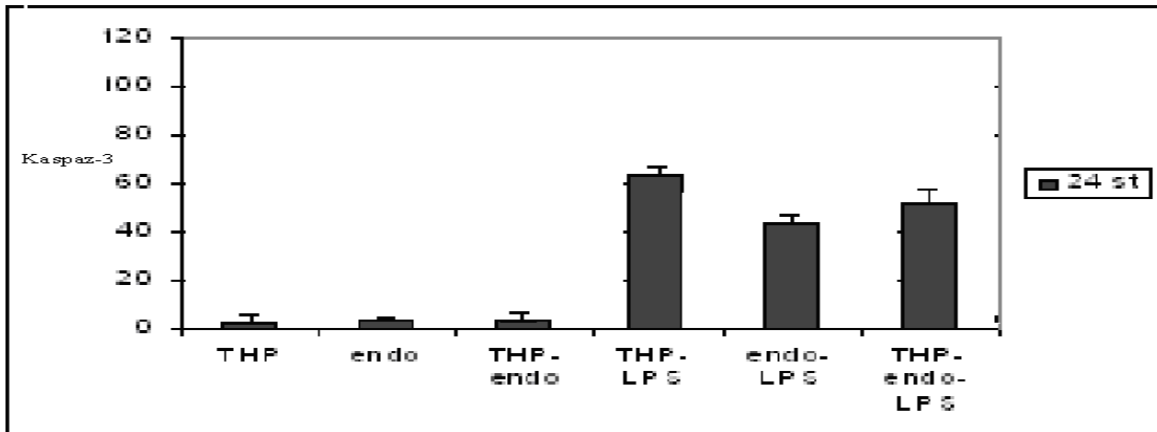
verilmiştir. LPS uygulaması 24 ve 48. saatlerde daha belirgin olmak üzere ($p<0.001$) HUVEC ve THP-1 hücre sayılarında azalmaya neden olmuştur. (Şekil 4.1.1)



Şekil 4.1.1 Zamana ve hücre sayısına bağlı MTT analizi.

4.2. Caspase-3 Testi

Hücrelerde apoptosise olan etkiler caspase-3 aktivitesinin florimetrik değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sonuçları birim dokuda zamana bağlı olarak aktivite değişimi olarak verilmiştir. LPS uygulaması hücrelerde 24. saatte belirgin apoptotik aktiviteye neden olmuştur. LPS ($p<0.001$) uygulaması her iki hücre tipinde de belirgin apoptosise neden olmuştur. Endotel hücreleri monositer hücrelere göre LPS uygulamasına daha duyarlıdır. (Şekil 4.2.1)

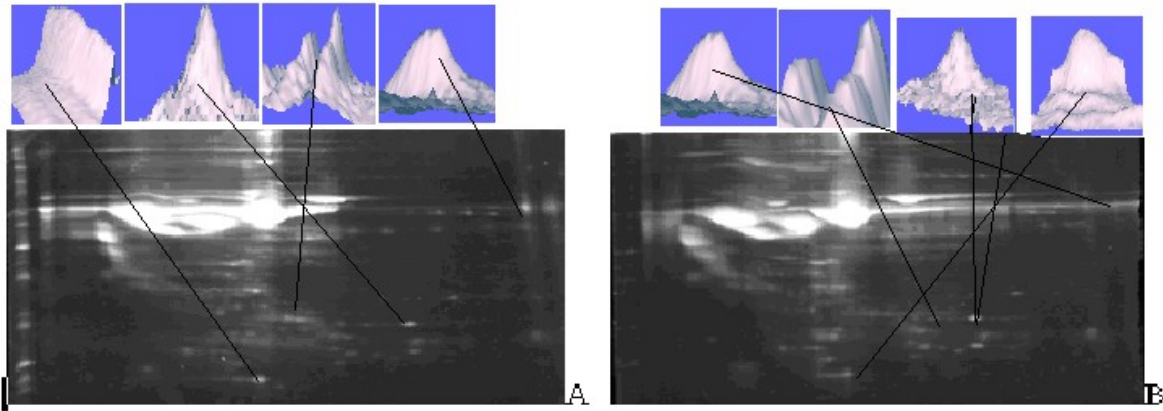


Şekil 4.2.1. Kaspaz-3 analizi.

Bu ikili kokültür çalışması sayesinde damar içi yapının enflamatuar süreçten etkilendiklerini moleküler düzeyde görülmüş olundu. Hücre kültürü ortamında özel bir membran kullanarak hücrelerin birbirleri ile etkileşimini temasla sağlayarak birbirlerine karışmadan endotel ve THP-1 hücreler damar içi yapının bir modeli olacak şekilde yetiştirildi. Bu kültür ortamında yetiştirilen hücrelerde enflamasyon sağlamak için Lps ile uyarıldı. Lps ile uyarılan hücre kültürü örneği ve kontrol grubu olarak kullanılan

enflamasyon olmayan kültürlerden protein eldesi yapıldı. Protein miktar tayinlerini Bradford yöntemi ile ölçüldü ve her örnekten 200 ug protein olacak şekilde, proteinlerin pI ayırımını sağlamak üzere pH 3-10 striplere yüklenilerek ilk boyut ayırımı gerçekleştirildi. İkinci boyut ayırımı için % 12 lik SDS PAGE yapıldı ve PI ayırımı sağlanan örneklerimizi PAGE elektroforez jelinde yürütüldü. Yürütülen lipopolisakkarit (LPS) ile uyarılan hücrelerin ve kontrol hücrelerinin tek tek ve kombine cevapları ileri görüntüleme sistemi olan Versadoc 2000 (Bio-rad, USA) cihazı kullanılarak incelendi. İki boyutlu jel elektroforez analizinde proteinlerin kütlelerini ve jeldeki dağılımlarını kıyaslaya bilmek için 10kb -200kb'lık protein standartı (Bio-rad USA) kullanıldı. Bu tez kapsamında endotel hücreleri ve THP-1 hücrelerinin LPS ile uyarımı sonucunda değişen protein noktaları (spot) görünmektedir. Bu çalışmada önemli olan Endotel ve THP-1 hücrelerinin ikili hücre ko-kültürü çalışmalarında LPS uyarımına tekli kültür örneklerine göre daha farklı bir cevap vermesidir.

4.3. Endotel- LPS Endotel 2D-PAGE Analizi



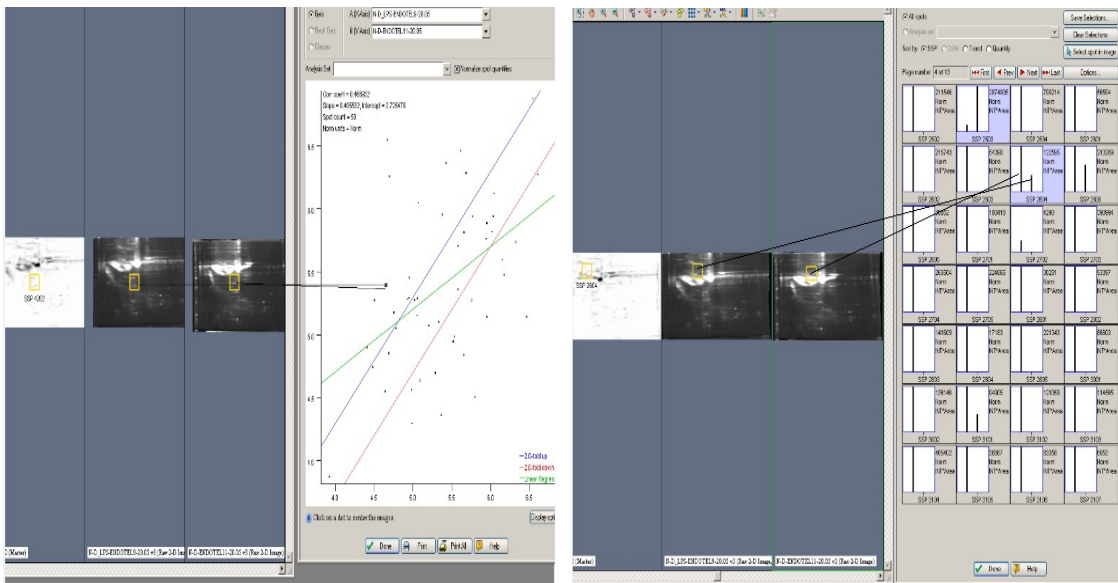
Şekil 4.3.1 (A)Endotel hücreleri ve (B) 24 saat LPS uygulanan Endotel hücrelerinin 2D-PAGE analizi.

Kontrollü olarak endotel hücrelerinin ve LPS ile uyarılan endotel hücrelerinin kültürü yapıldı. Hücre kültürü yapılan bu örneklerden protein izolasyonu yapıldı. Proteinleri elde edilen örneklere 2D PAGE analizi yapılarak protein ayrımları sağlandı. (Şekil 4.3.1). Bu analiz sonucu endotel hücreleri ile LPS ile uyarılan endotel hücreleri arasında protein farklılıkları gözlemlendi. Endotel hücrelerinde yokken LPS ile uyarılan endotel hücre kültürü örneklerinde ifadelenen proteinler olduğu görüldü. Versadoc 2000 Pd QUEST 8.0

programı kullanılarak karşılaştırmalı analiz yapıldı. Bu analiz sonucu endotel hücrelerinin kültürü sonucu 334 protein spotu bulunurken LPS ile muamele edilen endotel hücrelerinde 424 protein spotu bulundu.(Çizelge 4.3.1)

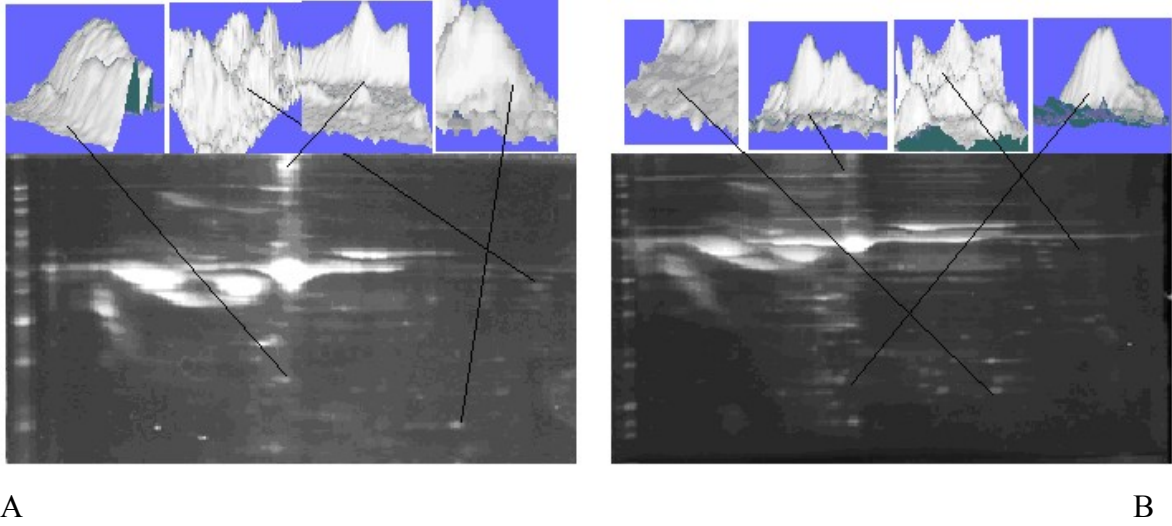
Çizelge 4.3.1 Endotel hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan Endotel hücrelerinin kalitatif ve kantitatif analizi.

KALİTATİF ANALİZ			KANTİTATİF ANALİZ	
Endotel Kontrol	Endotel LPS spot	Eşleşen spot sayısı	2 kat artan spot sayısı	2 kat azalan spot sayısı
toplam spot sayısı	sayısı			
334	424	176	57	36



Şekil 4.3.1. Endotel hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan Endotel hücrelerinin 2D-PAGE analizini yansıtan grafik görüntüleri.

4.4. THP-LPS THP 2D-PAGE Analizi



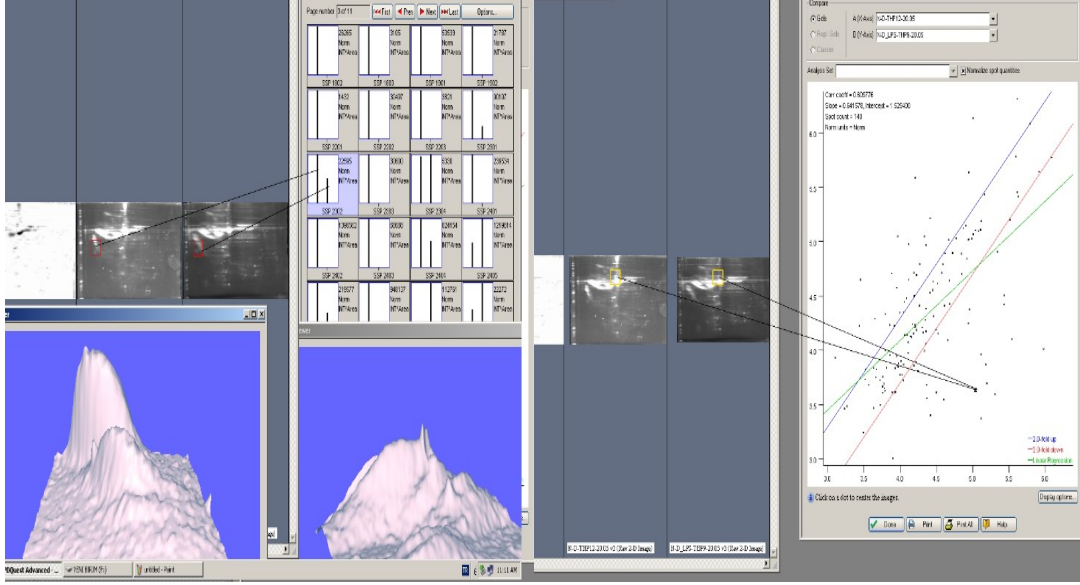
Şekil 4.4.1 (A) THP-1 hücreleri ve (B) 24 saat LPS uygulanan THP-1 hücrelerinin 2D-PAGE analizi.

Kontrollü olarak endotel hücrelerinin ve LPS ile uyarılan THP hücrelerinin kültürü yapıldı. Hücre kültürü yapılan örneklerden protein izolasyonu yapıldı. Proteinleri elde edilen örneklere 2D PAGE analizi yapılarak protein ayrımları sağlandı.(Şekil 4.4.1) Bu analiz sonucu THP hücreleri ile LPS ile uyarılan THP hücreleri arasında protein farklılıkları gözlemlendi. THP hücrelerinde yokken LPS ile uyarılan THP hücre kültürü örneklerinde ifadelenen proteinler olduğu görüldü. Versadoc 2000 Pd QUEST 8.0 programı kullanılarak karşılaştırmalı analiz yapıldı.

Çizelge 4.4.1 THP-1 hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan THP-1 hücrelerinin kalitatif ve kantitatif analizi.

KALİTATİF ANALİZ			KANTİTATİF ANALİZ	
<i>THP-Kontrol toplam spot sayısı</i>	<i>THP-LPS spot sayısı</i>	<i>Eşleşen spot sayısı</i>	<i>2 kat artan spot sayısı</i>	<i>2 kat azalan spot sayısı</i>
193	281	87	23	13

Bu analiz sonucu THP hücrelerinin kültürü sonucu 193 protein spotu bulunurken LPS ile muamele edilen THP hücrelerinde 281 protein spotu bulundu.(Çizelge-4.4.1)(Şekil 4.4.2)

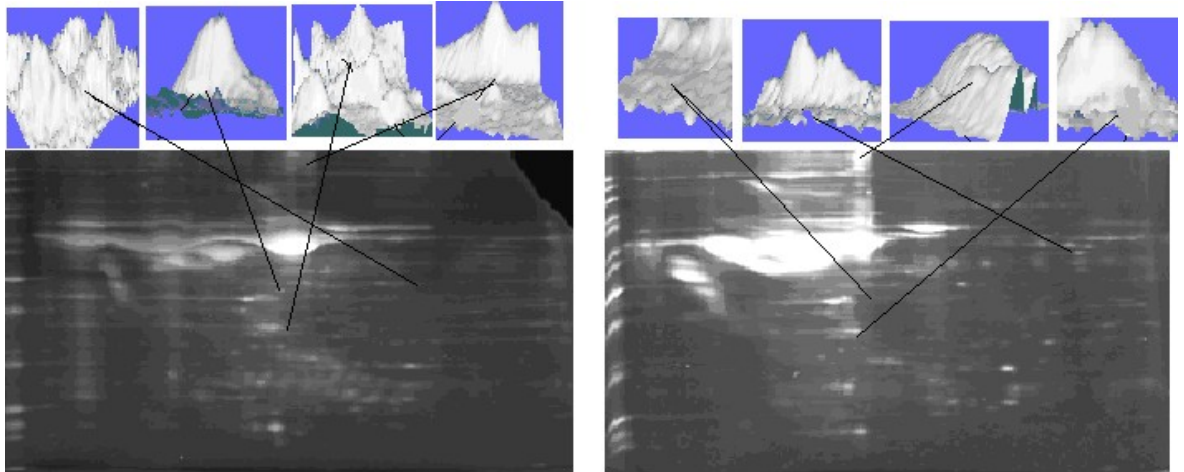


Şekil 4.4.2 THP-1 hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan THP-1 hücrelerinin 2D-PAGE analizini gösteren grafik görüntüleri.

4.5. ENDOTEL-THP-1 ve LPS ENDOTEL-THP-1 2D-PAGE Analizi

A

B



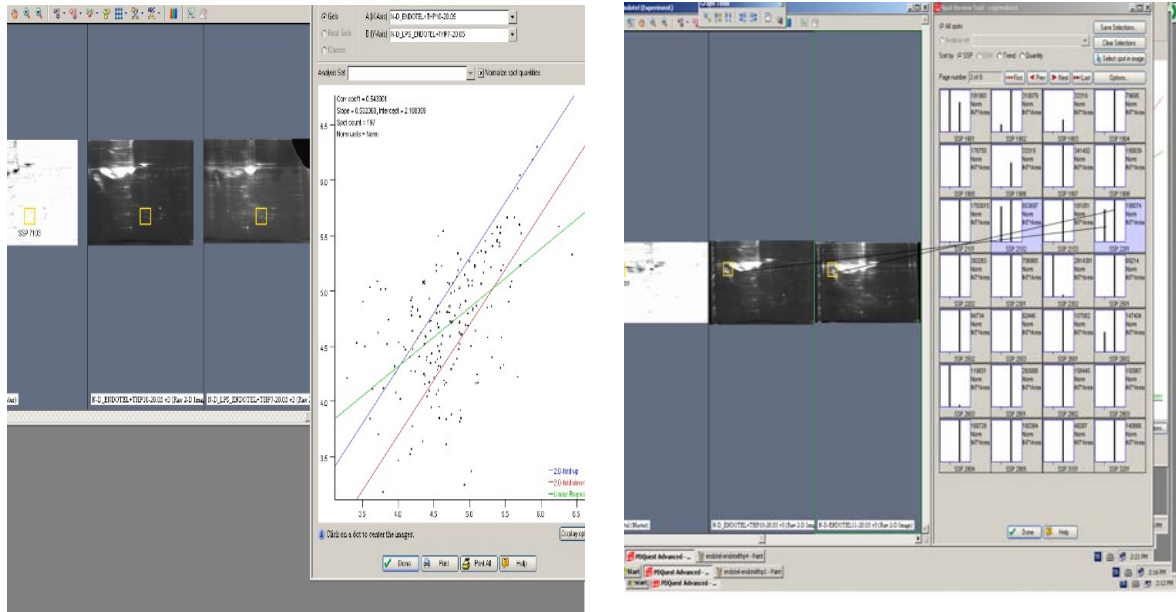
Şekil 4.5.1. (A) Endotel ve THP-1 hücreleri ve (B) 24 saat LPS uygulanan Endotel ve THP-1 hücrelerinin 2D-PAGE analizi.

Bir ileri boyut olan ikili kokültür kullanılarak damar iç yapısına model olabilecek THP-Endotel hücrelerinin ekimi gerçekleştirildi. Bu çalışmada kontrol olarak Endotel –THP-1 hücrelerinin ve LPS ile uyarılan Endotel –THP-1 hücrelerinin kültürü yapıldı. Hücre kültürü yapılan bu örneklerden protein izolasyonu yapıldı. Proteinleri elde edilen örnekler 2D PAGE analizi yapılarak protein ayrımları sağlandı. (Şekil 4.5.1). Bu analiz sonucu endotel-THP-1 hücreleri ile LPS ile uyarılan endotel-THP-1 hücreleri arasında protein farklılıkları gözlemlendi. Endotel –THP-1 hücrelerinde yokken LPS ile uyarılan Endotel –THP-1 hücre kültürü örneklerinde ifadelenen proteinler olduğu görüldü. Versadoc 2000 Pd QUEST 8.0 programı kullanılarak karşılaştırmalı analiz yapıldı. Versadoc 2000 Pd QUEST 8.0 programı kullanılarak karşılaştırmalı analiz yapıldı.(Çizelge 4.5.1.)

Çizelge 4.5.1. Endotel ve Monosit hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan Endotel ve Monosit hücrelerinin Kalitatif ve kantitatif analizi.

KALİTATİF ANALİZ			KANTİTATİF ANALİZ	
<i>Endotel-THP</i>	<i>Endotel-THPLPS</i>	<i>Eşleşen spot sayısı</i>	<i>2 kat artan spot sayısı</i>	<i>2 kat azalan spot sayısı</i>
<i>Kontrol toplam spot sayısı</i>	<i>spot sayısı</i>			
264	339	111	28	25

Bu analiz sonucu Endotel-THP-1 hücrelerinin kültürü sonucu 264 protein spotu bulunurken LPS ile uyarılan edilen Endotel-THP-1 hücrelerinde 339 protein spotu bulunmuştur. (Şekil 4.5.2)



Şekil 4.5.2 Endotel ve Monosit hücreleri ve 24 saat LPS uygulanan Endotel ve Monosit hücrelerinin 2D-PAGE analizini gösteren grafik görüntüleri.

5. Tartışma

Günümüzde yeni teşhis ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde, kişiye özel tedavi yöntemlerinin oluşturulmasında proteomik çalışmalar önemli veri kaynakları olarak kullanılmaktadır. Klinik proteomiksin temel amacı erken teşhis için biyolojik belirteçler (biyomarker) bulmak ve tedaviye müdahale edebilmek için potansiyel hedefler belirlemektir. Biyolojik belirteç iki ya da birden fazla biyolojik durum için (örneğin; hastalık durumuna karşı sağlıklı durum) miktara bağlı olarak değişebilen madde veya molekül (örneğin; peptid veya protein) olarak tanımlanabilir. Klinik proteomiksin diğer hedefleri arasında hastalık yinelenmesinin erken dönemde saptanmasını sağlayacak biyolojik belirteçlerin belirlenmesi ve bunların diagnostik görüntüleme ile nasıl birlikte kullanılacağına anlaşılması sayılabilir. Bunlara ek olarak klinik proteomiks hastanın tedaviye beklenen yanıtı açısından kişiye özel tedavi yöntemlerinin uyarlanmasına yardımcı olabilir.

Biyolojik belirteç araştırma çalışmalarında; klinik soruyu tanımlama ve kontrol - hasta gruplarının seçimi gibi araştırmanın tasarlanması, hasta ve kontrol gruplarında farklı ifadelenen proteinleri ve aday belirteçlerin belirlenmesi, biyolojik belirteç proteinin eldesi, purifikasyonu ve validasyonu yapılmış biyolojik belirteçler ile kantitatif testlerin geliştirilmesi gibi bir çok aşama bulunmaktadır. Yüksek verimli ve otomatize proteomik teknolojilerinin gelişmesi, proteomiksin standart klinik uygulamalarda gerçekleştirilmesi zorunlu olan çok sayıda klinik örneğin eş zamanlı olarak çalışılmasına da imkân vermektedir.

Klinik soruların başında gelen ateroskleroz oluşumu enflamatuvar vasküler hastalıklar koroner arter hastalıkları, hipertansiyon, diabet ve pek çok vaskülit patogeneğinde yer almaktadır. Damar duvarında yer alan endotel hücreleri ile vasküler dolaşımda yer alan herhangi bir stres durumunda aktive olan immun cevabın en önemli komponentlerinden olan monosit ve makrofaj fonksiyonlarının vasküler hücre yapısıyla etkileşimi son derece

önemlidir. Enflamatuar süreçte yer alabilecek yeni moleküller ve mekanizmaların tanımlanması yeni tedavilere öncülük edecektir. Bu çalışma kapsamında atherojenezde önemli rolü olan inflamatuvar hücre cevabının ortaya konulması amacıyla endotel ve monosit/makrofajdan (THP) oluşan kokültür modeli geliştirilmiştir.

Atherosikleroza proteomik açıdan baktığımız bu çalışma uluslararası literatürde yer alabilecek verilerin eldesine yöneliktir. Ayrıca vasküler modelin uygulanması moleküler değişiklikler yapılarak protein yapımlarına etkisinin incelenmesinin nedeniyle tez sonucunda sadece atheroskleroz mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik molekülerdeki değişimlerin belirlenmesi değil atheroskleroz oluşumu ileride uygulanması planlanan tedavilerin sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılabilecek parametrelerin belirlenmesine de katkıda bulunacaktır.

Bu çalışmada LPS ile uyarılan ve ayrıca kontrol grubu bulunan endotel (HUVEC) ve monosit/makrofaj (THP) hücrelerinden oluşan tekli kültür ve ikili ko-kültür deney gruplarından elde edilen proteinlerin ileri proteomik analiz yöntemleri kullanılarak, hücrelerinin atherosikleroz sonucundaki inflamasyona cevap olarak verilen protein paternlerindeki değişimlere bakılmıştır.

Atherosikleroza veya herhangi bir hastalık patogenezine klasik yaklaşım, mekanizmaya katılan aday gen ve proteinlerin belirlenerek tanı veya tedavi amacıyla kullanımı yönündedir. Farklı durumlarda yapılan transkriptomik ve proteomik incelemeler ile farklı deneysel koşullarda (patofizyolojik ve normal koşullar) karşılaştırmalar yapılarak kandidatif ve kalitatif sonuçlara ulaşma yoluna gidilir. Atherosiklerotik süreç modelini invitro ortamda invivo oluşturmak amacıyla yapılan endotel (HUVEC) ve monosit/makrofaj (THP) hücrelerinden oluşan tekli kültür ve ikili ko-kültür analizleri bizi hedefe yönelik doğru moleküllerin belirlenmesinde ve yeni hedef belirteçler bulmamızda yardımcı olabilecek veriye ulaşmamızı sağlamıştır.

Atherosikleroz sonucu hücrede oluşan inflamasyona verilen cevabı izleyebilmemiz için yapmış olduğumuz endotel (HUVEC) ve monosit/makrofaj (THP) hücrelerinden oluşan tekli kültür ve ikili ko-kültür çalışması ile bu iki hücrenin teması sağlanarak, hücrelerin sekresyon cevapları incelenmiştir. Bu incelemenin yapılabilmesi için ko-kültür çalışmasından alınan örneklerin çöktürülerek süpernatanta bulunan sekretüel maddelerin

analizi yapılmıştır. Sekretüel cevabın incelenebilmesi amacıyla serumsuz besiyerinde yaşayamayan endotel (HUVEC) ve monosit/makrofaj (THP) hücrelerinden oluşan tekli kültür ve ikili ko-kültür çalışmasında serumlu besiyeri kullanılmıştır. Serumlu besiyeri kullanımının en büyük dezavantajı serum proteinlerinin varlığı nedeniyle inflamasyon sonucu hücrelerden sekrete olan proteinlerin tam olarak incelenememiş olmasıdır. Ancak çalışmamızın dinamik bir hücre kültürü sisteminde, sekretüel cevap sonucundaki değişen proteinlerin tanımlanmasına yönelik olması bizim için değişmeyen serum proteinlerini göz ardı ederek besiyerinin etkisini ortadan kaldırmıştır.

İnsan deneysel klinik çalışmaları bireysel farklılıklar nedeniyle bazen yanıltıcı sonuçlara götürebilmektedir. Tüm organizmanın beraber devreye girdiği hayvan modellerinde de insana uyumluluk ve sistemi tek tek analiz etmenin bütünsel sistematığe uyarlanamaması nedeniyle elde edilen veriler tekrarlanabilirlikleri zor ve güvenilirlikleri tartışmalı hal almaktadır. Her ne kadar hücre kültürü modelleri sistemik cevaptan farklı olsa da lokal düzenlemeler, etkileşimlerin ve doku düzeyinde doğru moleküllerin ve proteinlerin tanımı açısından önemlidir. Ayrıca hücre modelleri farklı koşulları uygulama ve analiz açısından da kolaylık sağlamaktadır. Ko-kültür ve hücre kültürü çalışmasında hücre çoğalmasının saptanması için tetrazolium tabanlı kolorimetrik bir yöntem olan MTT yöntemi kullanılmıştır. Zamana ve doza bağlı olarak çeşitli etken maddeler ile inkübasyona bırakılmış hücreler MTT ile muamele edilerek formazan kristalleri oluşturması sağlanmış ve oluşan bu kristaller belli bir çözücü ile çözüldükten sonra spektrofotometrede değerlendirilmiştir. Hücrelere deney protokollerine uygun olarak LPS uygulandıktan sonra 24 ve 48. saatlerde MTT uygulanmıştır. LPS nin endotel ve monosit hücre serisindeki etkileri MTT testi ile de tekli kültür ve ikili kokültür modelinde değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda LPS ile muamele yapılan tekli kültür ve ikili kokültür kontrol gruplarına göre hücre çoğalmasında belirgin düşüşler görülmüştür. 250.000 üzerinde hücre sayısına sahip olan THP-1 örnekleri 48 saat lik LPS uyarım sonucunda hücre sayısı 250.000'nin altına düşerken endotel hücrelerinde 48 saatlik LPS ile uyarımında hücre sayısını 250.000 seviyesinde korumaktadır. THP hücreleri LPS uygulamasına endotel hücrelerinden daha duyarlıdır. Endotel hücrelerindeki hasar THP hücreleri ile beraber ko-kültürü yapıldığında aynı stres koşullarında THP varlığında artmaktadır.

Damar sisteminde embriyonel ve postnatal dönemde düz kas hücrelerinde fizyolojik apoptozis olmaktadır. Gelişme dönemi dışında akut arter hasarı(balon) ve tamir sürecinde,

aterosklerotik plaklarda, restenotik lezyonlarda, dejenere safen ven greftlerinde, transplant vaskülopatisinde ve anevrizmatik arter duvarında düz kas hücrelerinde apoptozis gösterilmiştir. Bu kapsamda hücre dizilerinde apoptozisin değerlendirilmesi için endotel ve monosit/makrofaj(THP) hücrelerinden oluşan tekli ve ikili ko-kültür örneklerinin normal koşullarda ve LPS uygulaması sonrasında caspaz-3 düzeyi ölçümü yapılmıştır. Apoptosis ölçümleri MTT değerlendirmelerinin yapıldığı gruplarda her grupta 8 li tekrar olmak üzere aynı düzenleme ile yapılmıştır. Kaspaz -3 düzeyleri deney protokollerine uygun olarak LPS uygulandıktan sonra 2. ve 24. saatlerde değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda LPS uygulanan hücre kültürü örneklerinde Kaspaz -3 düzeylerinde belirgin artışlar görülmüştür.

Teorik olarak da primer aterosklerotik plak ve restenotik lezyonlarda apoptozis induksiyonu regresyona yol açmaktadır (Gavrieli Y 1992). Ancak, artış apoptozis plak stabilizasyonunu bozmaktadır. Apoptozis ile plak içindeki düz kas hücreleri sayıca azalmakta, kollagen sentezi düşmekte ve sonuçta fibröz kapsülü incelmış olan plak, stabilitesini kaybetmektedir. Yüksek kolesterolle beslenerek deneysel ateroskleroz geliştirilen tavşanlarda erken dönem yağ oluşum lezyonlarında (“fatty streak”) morfolojik olarak lezyon gelişmeden önce apoptozisin başladığı ve aterosklerotik plağa doğru ilerleme sırasında düz kas hücrelerinde apoptozisin giderek arttığı saptanmıştır. Ancak burada da artmış apoptozisin patolojik sürecin bir nedeni mi yoksa sonucu mu olduğu bilinmemektedir (Hoebe,K 2003). Damar sisteminin diğer bir önemli hücresi olan endotel hücrelerinde inflamasyon sonucu apoptotik ölüme yol açmaktadır. Tez kapsamında yaptığımız kaspaz-3 değerlendirmesinde LPS uygulaması hücrelerde 24. saatte belirgin apoptotik aktiviteye neden olmuştur. LPS ($p<0.001$) uygulaması her iki hücre tipinde de belirgin apoptosise neden olmuştur. Endotel hücreleri monositer hücrelere göre LPS uygulamasına daha duyarlıdır. (Şekil 4.2.1)

Normal koşullarda ve LPS ile uyarım sonrasında damar iç yapısında bulunan endotel hücrelerinin ileri proteomik analizleri yapıldı. Bu analiz sonucu endotel hücrelerinin kültürü sonucu 334 protein bulunurken LPS ile muamele edilen endotel hücrelerinde 424 protein bulunmuştur. Bu analiz sonucunda 176 proteinin LPS ile uyarılma sonucunda oluşan inflamasyona verilen hücresel cevabı oluşturmaktadır.

Bu deney grubunu takiben oluşturduğumuz normal koşullarda ve LPS uygulaması sonrasında damar iç yapısında bulunan monosit hücrelerinin ileri proteomik analizleri yapıldı. Monosit/makrofaj (THP) hücreleri ve hücre kültüründe LPS ile uyarılan monosit/makrofaj (THP) hücrelerinin ileri proteomik analizleri yapıldı. Bu analiz sonucunda THP hücrelerinde yokken LPS ile muamele edilen hücre kültürü örneklerinde ifadelenen proteinlerin olduğu ve aynı zamanda var olan bazı proteinlerin ifadelerinde değişiklik olduğu görülmektedir. Bu analiz sonucu THP hücrelerinin kültürü sonucu 193 protein bulunurken LPS ile muamele edilen THP hücrelerinde 281 protein spotu bulunmuştur. Eşleşmeyen 88 proteinin inflamasyon sonrası ifadelenebilir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz bir ileri boyut olan ikili kokültür kullanılarak damar iç yapısına model olabilecek THP-Endotel hücrelerinin ekimi gerçekleştirildi. Bu çalışmada kontrol olarak Endotel –THP-1 hücrelerinin ve LPS ile muamele edilen Endotel –THP-1 hücrelerinin kültürü örneklerinin de ileri proteomik analizleri yapıldı. Bu analiz sonucunda THP-Endotel hücrelerinde yokken LPS ile muamele edilen hücre kültürü örneklerinde ifadelenen proteinlerin olduğu ve aynı zamanda var olan bazı proteinlerin ifadelerinde değişiklik olduğu görüldü. Bu analiz sonucu THP-Endotel hücrelerinin kültürü sonucu 264 protein bulunurken LPS ile muamele edilen THP hücrelerinde 339 protein bulunmuştur. Eşleşmeyen 75 proteinin inflamasyon sonucunda hücreden salınan bir cevap niteliğinde olduğunu düşündürmektedir. İnflamasyondan sorumlu olduğu düşünülen proteinlerin ilerdeki bir çalışmada kimliklendirilmesi sonucunda, damar yapısında oluşan ve şuan için erken teşhisi mümkün olmayan ateroskleroz sonucu meydana gelen inflamasyona karşı hücrelerin verdiği proteomik cevabın incelenerek ateroskleroz oluşumunun erken safhalarında anlaşılması sağlanılabilecektir.

KAYNAKLAR

- 1-Murray CJ , Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study.Lancet 1997 ;349:1436-42
- 2-Ross R.Atherosclerosis-an inflammatory disease . N Engl J Med 1999;340:115-26
- 3-Ross R,Glomset ,JA.The pathogenesis of atherosclerosis.N Engl J Med 1976;295:420-5
- 4-Steinberg D,Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL.Beyond cholesterol.Modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity.N Engl J Med 1989 ;320:915-20
- the moon.N Engl J Med 1997 ;336:1014-6
- 5-World Health Organization .The world health report 1999:Making a difference.Geneva:WHO,1999.
- 6-Koroner kalp hastalığından korunma ve tedaviye ilişkin ulusal klavuz.1999 Türk Kardiyoloji Derneği
- 7-Aterotromboz Epidemiyolojisi ve Kardiyovasküler Devamlılık Kavramı.Türk Kardiyoloji Seminerleri 2004 Nisan Cilt 4 Sayı 2 183-184.
- 8-Onat A.Erişkinlerimizde kalp hastalıkları prevalansı , yeni koroner olaylar ve kalpten ölümsıklığı.Onat A,TEKHARF,Ohan matbaacılık,İstanbul,TR,2000;16-23
- 9- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:131-1375. PMID 3574413
- 10-Deepak L. Bhatt, MD; Eric J. Topol, MD *Need to Test the Arterial Inflammation Hypothesis*, 2002, referenced on 4/1/06
- 11- Stevens, Karen M.J. Douglas, Athanasios N. Saratzis and George D. Kitas Inflammation and atherosclerosis in rheumatoid arthritis Robert J. Expert Rev. Mol. Med. Vol. 7, Issue 7
- 12-Grundy SM ,Wilhelmsen L,Rose G,et al.Coronary heart disease in high-risk

- populations:Lessons from Finland. *Eur Heart J* 1990;11:462-471
- 13-Burke AP, Farb A, Malcom GT, et al. Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women. *Circulation* 1998;97:2110-2116
- 14-Celermajer DS, Sorensen KE, Geogakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993;88:2149-2155
- 15-Essential Immunology , Roitt, Delves, 2001
- 16-Immunology, Roitt, Brostoff, Male, 1996
- 17-Cellular and Molecular Immunology, Abbas, Lichtman, 2005
- 18- Immunology 5th ed. Goldsby RA, Kindt, TJ, Osborne BA, Kuby J. 2002
- 19-Hematoloji. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi An Tıp A.Ş. Yayınları, Ankara 1997
- 20-JOSEPH J. MAZZA. Manual of Clinical Hematology. 1998.
- 21- LANE DAVID A., GRANT PETER J. Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood*. 2000; 95 (5): 1517-1530.
- 23- AKAR N. Molecular Approach to Turkish Pediatric Stroke Patients. *Tur J Haematol*. 2002; 19 (2): 245-253.
- 26- ANDREW M., MONAGLE PT., BROOKER L. Thromboembolic complications during infancy and childhood. BC Decker Inf, London, 2000
- 27-Kannel WP:Blood pressure as a cardiovascular risk factor:prevention and treatment .*JAMA* 1996;275:1571-76
- 28-Wong ND,Cupples LA,Ostfeld AM,Levy D, Kannel WB:Risk factors for long-term coronary prognosis after initial myocardial infarction:Framingham Study .*Am J Epidemiol* 1989;130:469-80
- 29-Kannel WB : Lipids,diabetes and coronary heart disease :insight from the Framingham Study . *Am Heart J* 1985;110:1100-7
- 30-The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus .*Diabetes Care* 1999;22(suppl I):S5-19
- 31-UK Prospective Study Group. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complication in type 2 diabetes.UKPDS 38. *Br Med J* 1998;317:703-13
- 32-National Institutes of Health.Clinical guidelines on the identification ,evaluation nad the treatment of overweight and obesity in adults:the evidence report.*Obes Res* 1998;6(supp2):s51-209 61
- 33-Rao SV,Donahue M,Pi-Sunyer X,Fuster V:Obesity as arisk factor in coronary artery disease.*Am Heart J* 2001;142:1102-7

- 34-Lee IM, Hsieh CC, Paffenbarger RS Jr: Exercise intensity and longevity in man :the Harvard Alumni Health Study . JAMA 1995;273:1179-84
- 35-Celermajer DS, Sorensen KE, Geogakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. Circulation 1993;88:2149-2155
- 36-Yoshimura M, Yasue H, Nakayama M, et al. Genetic risk factors for coronary artery spasm: Significance of endothelial nitric oxide synthase gene T786-C and Glu298-Asp variants (abstr) Circulation 1999;100(suppl I):I-819
- 37-Makimattila S, Mantysaari M, Groop PH, et al. Hyperreactivity to nitrovasodilators in forearm vasculature is related to autonomic dysfunction in insulin-dependent diabetes mellitus. Circulation 1997;95:618.
- 38-Ross R, Glomset JA, Kariya B, Harker LA. A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 1974;71:1207-11
- 38-Thomassin H, Flavin M, Espinas ML, et al. Glucocorticoid induced DNA demethylation and gene memory during development. EMBO J 2001;20:1974–1983.
- 39-Matthews C, Gorenne I, Scott S, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. Circ Res 2006; 99:156–164.
- 39- White MY, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: past, present, and future. Mol Diagn Ther. 2007;11(2):83-95
- 40- Wu J, Liu W, Sousa E, Qiu Y, Pittman DD, Maganti V, Feldman J, Gill D, Lu Z, Dorner AJ, Schaub R, Tan XY. Proteomic identification of endothelial proteins isolated in situ from atherosclerotic aorta via systemic perfusion. J Proteome Res. 2007 Dec;6(12):4728-36.
- 41- Kang JH, Kim HT, Choi MS, Lee WH, Huh TL, Park YB, Moon BJ, Kwon OS. Proteome analysis of human monocytic THP-1 cells primed with oxidized low-density lipoproteins. Proteomics. 2006 Feb;6(4):1261-73.
- 42- Fuchs D, Vafeiadou K, Hall WL, Daniel H, Williams CM, Schroot JH, Wenzel U. Proteomic biomarkers of peripheral blood mononuclear cells obtained from postmenopausal women undergoing an intervention with soy isoflavones. Am J Clin Nutr. 2007 Nov;86(5):1369-75.

- 43- Bagnato C, Thumar J, Mayya V, Hwang SI, Zebroski H, Claffey KP, Haudenschild C, Eng JK, Lundgren DH, Han DK. Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Jun;6(6):1088-102
- 44- Davies PF. Endothelial transcriptome profiles in vivo in complex arterial flow fields. *Ann Biomed Eng*. 2008 Apr;36(4):563-70.
- 45- *Essential Immunology*, Roitt, Delves, 2001
- 46- *Immunology*, Roitt, Brostoff, Male, 1996
- 47- *Cellular and Molecular Immunology*, Abbas, Lichtman, 2005
- 48- *Immunology* 5th ed. Goldsby RA, Kindt, TJ, Osborne BA, Kuby J. 2002
- 49- Bleul CC, Boehm T: Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus, *Eur J Immunol* 2000;30:3371-9.
- 50- Bokoch GM: Chemoattractant signalling and leukocyte activation, *Blood* 1995;86:1649-60.
- 51- Campbell JD, Stinson MJ, Simons FE, HayGlass KT: Systemic chemokine and chemokine receptor responses are divergent in allergic versus nonallergic humans, *Int Immunol* 2002;14:1255-62.
- 52- D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F: Chemokine receptors in inflammation: an overview, *J Immunol Methods* 2003;273:3-13.
- 53- Luster AD: Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation, *N Engl J Med* 1998;338:436-45.
- 54- Mackay CR: Chemokines: immunology's high impact factors, *Nature Immunol* 2001;2:95-101.
- 55- Murdoch C, Finlay A: Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases, *Blood* 2000;95:3032-43.
- 56- Nagasawa T, Tachibana K, Kawabata K: A CXC chemokine SDF-1 /PBSF: A ligand for a HIV coreceptor, CXCR4, *Adv Immunol* 1999;71:211-25.
- 57- Ono SJ, Nakamura T, Miyazaki D, Ohbayashi M, Dawson M, Toda M: Chemokines. Roles in leukocyte development, trafficking and effector function, *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:1185-99.
- 58- Rossi D, Zlotnik A: The biology of chemokines and their receptors, *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-42.
- 59- Shapiro SD: Immunology: mobilizing the army, *Nature* 2003;421:223-4.

- 60- Van Damme J, Probst P, Lenaerts J-P, Opdenakker G: Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic protein (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family, *J Exp Med* 1992;176:59-65.
- 61- Vicari AP, Caux C: Chemokines in cancer: Cytokine growth factor, *Rev* 2002;13:143-54.
- 62- Wong MM, Fish EN: Chemokines: attractive mediators of the immune response, *Sem Immunol* 2003;15:5-14.
- 63- Yoshie O, Imai T, Nomiyama H: Chemokines in immunity, *Adv Immunol* 2001;78:57-110.
- 64- Zlotnik A, Yoshie O: Chemokines. A new classification system and their role in immunity, *Immunity* 2000;12:121-7.
- 65- Noosheen Alaverdi & David Sehy 2007 "Cytokines - Master Regulators of the Immune System". eBioscience. Retrieved 2008-02-28.
- 66- Du, X., Poltorak, A., Wei, Y., and Beutler, B. 2000. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Netw.* 11:362-371.
- 67- Chuang, T.H., and Ulevitch, R.J. 2000. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur. Cytokine Netw.* 11:372-378.
- 68- Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J. et al 2004. Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 101:3516-3521.
- 69- Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S.O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S. et al 2003. Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signaling. *Nature* 424:743-748.
- 70- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K. et al 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408:740-745.
- 71- Cohen JJ. Apoptosis. To be or not to be. *Postgraduate Syllabus (AAAA-I)* 1998;1:1-19.
- 72- Narula J, Kharbanda S, Khaw BA. Apoptosis and the Heart. *Chest* 1997;112:1358-62.
- 73- Gavrieli Y, Sherman Y, Sasson SAB. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 1992;119:493-501.
- 74- Wyllie AH. What is apoptosis? *Histopathology.* 1986; 10: 995-8.

ÖZGEÇMİŞ

1984 Ankara doğumlu olan Çağrı GÜMÜŞTEKİN İlk öğrenimini 1989-1995 yılları arasında Gazi Osman Paşa ilk okulunda ve lise eğitimini Alparslan Süper Lisesinde 2001 yılında tamamladıktan sonra Yüksek Öğretimine 2002 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladı. 2007 yılında mezun oldu. 2008 yılında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Proteom Biriminde yüksek lisansa başladı. Halen çalışmalarına Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü bünyesinde devam etmektedir.

