T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TNF-ALFA İLE İNDÜKLENMİŞ İNSAN UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE (HUVEC) AMENTOFLAVONUN ANTİİNFLAMATUAR ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

DR. FATİH CAN TÜRK

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. SİBEL ÖZYAZGAN

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2020

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)

BEYAN

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

Dr. Fatih Can Türk

İTHAF

Bugüne kadar benden desteklerini hiç esirgemeyen sevgili annem Hamide Türk'e ve babam Latif Türk'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Anabilim Dalı Başkanımız, kıymetli hocam Prof. Dr. Öner Süzer'e,

Doktora eğitimim boyunca beni yönlendiren ve tezim konusunda sürekli destek olan kıymetli hocam Prof. Dr. Ahmet Gökhan Akkan'a,

Eğitim ve tez sürecimde bana sürekli destek olan değerli hocam ve danışmanım Prof. Dr. Sibel Özyazgan'a,

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'ne adım atmama vesile olan değerli hocam Prof. Dr. Zeliha Yazıcı'ya,

Çalışma sırasında benden desteklerini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Burak Önal'a ve eğitimim süresince bana katkıda bulunan Anabilim Dalımızın tüm öğretim üyeleri, asistanları ve personeline;

Beni büyütüp, yetiştirip bugünlere gelmemi sağlayan, her zaman yanımda olan, doktoraya başlamak ve bitirmek konusunda beni sürekli motive eden, hayattaki en kıymetli varlıklarım annem Hamide Türk, babam Latif Türk ve kardeşim Ediz Cem Türk'e;

Tez çalışmam sırasında laboratuvarlarını bana açan ve deneyler sırasında destek olan Atlas Biyoteknoloji ekibine;

En içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2019-33971

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ii
BEYAN iii
İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ xii
ŞEKİLLER LİSTESİ xiii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ xii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. İNFLAMASYON, ANTİİNFLAMATUAR VE ANTİOKSİDAN ETKİ 4
2.2. KORONER ARTER HASTALIĞININ EPİDEMİYOLOJİSİ 5
2.3. ATEROSKLEROZ PATOGENEZİ 6
2.3.1. ATEROSKLEROTİK LEZYONLARIN GELİŞİMİ 8
2.3.2. ATEROSKLEROZDA HÜCRELERİN ROLÜ 9
2.3.2.1. ENDOTEL HÜCRELERİ 10
2.3.2.2. VASKLER DÜZ KAS HÜCRELERİ 11
2.3.2.3. LÖKOSİTLER 12
2.3.2.4. TROMBOSİTLER 13
2.4. İNFLAMASYON SÜREÇLERİ VE ATEROSKLEROZ 13
2.5.ATEROSKLEROZ PATOGENEZİNDE İNFLAMASYON TETİKLEYİCİLERİ 18
2.6.ATEROSKLEROZ VE İNFLAMATUAR SÜREÇTE ETKİLİ MEDYATÖRLER 19
2.6.1. ICAM-1 19
2.6.2. VCAM-1 22

2.6.3. NF-KB 24
2.6.4. TNF- A.....26
2.6.5. İNTERLÖKİN -6 (IL-6) 28
2.6.6. İNTERLÖKİN -8 (IL-8) 28
2.7. FLAVİNOİDLER 29
2.8. AMENTOFLAVON 31
2.8.1. AMENTOFLAVON KAYNAKLARI 32
2.8.2. AMENTOFLAVONUN ANTİİNFLAMATUAR VE ANTİOKSİDAN ETKİLERİ 32
2.8.3. AMENTOFLAVONUN KARDİYOVASKÜLER SİSTEM ÜZERİNE ETKİLERİ 33
2.8.4. AMENTOFLAVONUN ANTİTÜMÖR ETKİLERİ 33
2.8.5. AMENTOFLAVONUN ANTİSENESENS ETKİLERİ 34
2.8.6. AMENTOFLAVONUN ANTİDİYABETİK ETKİLERİ 34
2.8.7. AMENTOFLAVONUN ANTİVİRAL ETKİLERİ.....34
2.8.8. AMENTOFLAVONUN ANTİFUNGAL ETKİLERİ.....34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....36
3.1. UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜR VE MTT DENEY HAZIRLIKLARI 36
3.1.1. HÜCRELERİN AÇILMASI VE EKİLMESİ.....36
3.1.2. BESİYERİNİN HAZIRLANMASI.....37
3.1.3. HÜCRELERİN PASAJLANMASI 37
3.1.4. CANLI HÜCRELERİN MİKROSKOPTA SAYILMASI 39
3.2. MTT DENEY PROTOKOLÜ 40
3.2.1. AMENTAFLAVON VE TNF-A ÇÖZELTİLERİNİN HAZIRLANMASI.....41
3.3. UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜRÜ DENEY AŞAMALARI ... 44
3.4. MRNA QRTPCR ÇALIŞMASI 45
3.4.1. MRNA İZOLASYONU.....45
3.4.2. CDNA SENTEZİ.....46

3.4.3. REAL-TİME QPCR 47
3.4.4. RELATİF KANTİTASYON HESAPLANMASI 48
3.5. ELISA TESTİ ÇALIŞMASI.....49
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....50
4. BULGULAR.....51
4.2. QRTPCR İSTATİSTİK SONUÇLARI 52
4.2.1. QRTPCR TEK YÖNLÜ VARYANS ANALİZİ - ICAM-1 53
4.2.2. QRTPCR TEK YÖNLÜ VARYANS ANALİZİ – IL-6 55
4.2.3. QRTPCR TEK YÖNLÜ VARYANS ANALİZİ – IL-8 58
4.2.4. QRTPCR TEK YÖNLÜ VARYANS ANALİZİ - NF-KB 60
4.2.5. QRTPCR TEK YÖNLÜ VARYANS ANALİZİ - VCAM-1.....62
4.3. ELISA İSTATİSTİK SONUÇLARI.....65
4.3.1. ELISA TEK YÖNLÜ VARYANS ANALİZİ – ICAM-1.....66
4.3.2. ELISA TEK YÖNLÜ VARYANS ANALİZİ – IL-6.....68
4.3.3. ELISA TEK YÖNLÜ VARYANS ANALİZİ – IL-8.....70
4.3.4. ELISA TEK YÖNLÜ VARYANS ANALİZİ - NF-KB 73
4.3.5. ELISA TEK YÖNLÜ VARYANS ANALİZİ – VCAM-1 75
5. TARTIŞMA.....79
KAYNAKLAR.....85
HAM VERİLER 96
ETİK KURUL KARARI 104
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....106
ÖZGEÇMİŞ.....107

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Farklı iskelet yapılarına göre flavinoidler 30
Tablo 2: Amentoflavon ve TNF-α Çözelti hazırlama hesaplamaları.....41
Tablo 3: MTT Plate Dizaynı.....42
Tablo 4: mRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyal Bilgileri 45
Tablo 5: cDNA Sentezi İçin Kullanılan Mastermix Bilgileri 46
Tablo 6: cDNA Mastermix Üzerine Eklenen Bileşenler 47
Tablo 7: cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları 47
Tablo 8: Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri 48
Tablo 9: Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları.....48
Tablo 10: ELISA Çalışması Kit Bilgileri 49
Tablo 11: 24 ve 48 Saatlik MTT değerlendirme sonuçları.....51
Tablo 12: AMF MTT dozları 48 saat sonuçları ve IC50 Doz Hesaplaması 51
Tablo 13: qRTPCR İstatistik Sonuçları Özet Tablo 52
Tablo 14: qRTPCR ICAM-1 ANOVA Testi Sonuçları.....53
Tablo 15: ICAM-1 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Sonuçları 53
Tablo 16: IL-6 qRTPCR ANOVA Testi Sonuçları 55
Tablo 17: IL-6 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Sonuçları 56
Tablo 18: IL-8 qRTPCR ANOVA Testi Sonuçları 58
Tablo 19: IL-8 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Sonuçları 58
Tablo 20: NF-κB qRTPCR ANOVA Testi Sonuçları 60
Tablo 21: NF-κB qRTPCR Tukey-Kramer Testi Sonuçları 61
Tablo 22: VCAM-1 qRTPCR ANOVA Testi Sonuçları 63
Tablo 23: VCAM-1 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Sonuçları.....63
Tablo 24: ELISA İstatistik Sonuçları Özet Tablo.....65
Tablo 25: ICAM-1 ELISA ANOVA Testi Sonuçları 66
Tablo 26: ICAM-1 ELISA Tukey-Kramer Testi Sonuçları.....66
Tablo 27: IL-6 ELISA ANOVA Testi Sonuçları.....68
Tablo 28: IL-6 ELISA Tukey-Kramer Testi Sonuçları 69
Tablo 29: IL-8 ELISA ANOVA Testi Sonuçları.....71
Tablo 30: IL-8 ELISA Tukey-Kramer Testi Sonuçları 71

Tablo 31: NF-κB ELISA ANOVA Testi Sonuçları....73
Tablo 32: NF-κB ELISA Tukey-Kramer Testi Sonuçları....74
Tablo 33: VCAM-1 ELISA ANOVA Testi Sonuçları....76
Tablo 34: VCAM-1 ELISA Tukey-Kramer Testi Sonuçları....76
Tablo 35: Tüm ELISA Sonuçları Ham Veriler....96
Tablo 36: ICAM-1 ELISA Sonuçları Ham Veriler....97
Tablo 37: IL-6 ELISA Sonuçları Ham Veriler....98
Tablo 38: IL-8 ELISA Sonuçları Ham Veriler....99
Tablo 39: NF-KB ELISA Sonuçları Ham Veriler....100
Tablo 40: VCAM-1 ELISA Sonuçları Ham Veriler....101
Tablo 41: ICAM-1 qRTPCR Sonuçları Ham Veriler....102
Tablo 42: IL-6 qRTPCR Sonuçları Ham Veriler....102
Tablo 43: IL-8 qRTPCR Sonuçları Ham Veriler....102
Tablo 44: NF-KB qRTPCR Sonuçları Ham Veriler....103
Tablo 45: VCAM-1 qRTPCR Sonuçları Ham Veriler....103

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Aterosklerozda hücrelerin rolü 10
Şekil 2: Shear stres ve Ateroskleroz mekanizmalarında rol oynayan inflamatuar medyatörlerin birbirleriyle etkileşimi. 20
Şekil 3: Kemokin reseptör fonksiyonları 23
Şekil 4: NF-κB sinyal yolağında etkili inflamatuar medyatörler.....24
Şekil 5: TNF-α Sinyal yolağında etkili medyatörler ve ilişkileri 27
Şekil 6: 24 saatlik MTT plate görünümü 43
Şekil 7: 48 saatlik MTT plate görünümü 43
Şekil 8: ICAM-1 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği.....54
Şekil 9: IL-6 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği 56
Şekil 10: IL-8 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği 59
Şekil 11: NF-κB qRTPCR Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği 61
Şekil 12: VCAM-1 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği 64
Şekil 13: ICAM-1 ELISA Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği.....67
Şekil 14: IL-6 ELISA Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği.....69
Şekil 15: IL-8 ELISA Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği.....72
Şekil 16: NF-κB ELISA Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği.....74
Şekil 17: VCAM-1 ELISA Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği 77

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AHA : Amerikan Kalp Birliği
AKS : Akut Koroner Sendrom
AMF : Amentoflavon
APO-E : Apoprotein-E
APC : Antijen Sunan Hücreler
ARB : Anjiyotensin Reseptör Blokeri
Blank : Boş Kuyucuk
CRP : C Reaktif Protein
DM : Diyabetes Mellitus
DMSO : Dimetil Sülfoksit
eNOS : Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz
FBS : Fetal Bovine Serum
GMCSF : Granülosit Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
HDL : Yüksek Dansiteli Lipoprotein
HMG-KoA : 3-Hidroksi-3-Metil-Glutaril-Koa
HUVEC : İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücreleri
hs-CRP : Yüksek Duyarlılıklı C-Reaktif Protein
ICAM-1 : Hücrelerarası Adezyon Molekülü-1
IFN-γ : İnterferon Gamma
IKB : İnhibitör KB
IKK : İnhibitör KK
IL : İnterlökin
IL-1β : İnterlökin- 1Beta
INF-γ : İnterferon gamma
KABG : Koroner Arter By-pass Greft
KAH : Koroner Arter Hastalığı
LDH : Laktak Dehidrogenaz
LDL : Düşük Dansiteli Lipoprotein
MCP-1 : Monosit Kemoatraktan Protein -1
MCSF-1 : Monosit Koloni Sitimüle Edici Faktör-1

MHC : Majör Histokomplabilite Kompleksi
MI : Miyokard İnfarktüsü
MMP : Matriks Metallo Proteinaz
MTT : Metiltiazol difenil tetrazolyum testi
NF-κB : Nükleer Faktör Kappa B
NO : Nitrik Oksit
NON-STEMI : Non ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü
NOS : Nitrik Oksit Sentaz
OATP : Organik Anyon Taşıyıcı Protein
oxLDL : Okside LDL
PAİ-1 : Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1
PDFG : Platalet Kaynaklı Büyüme Faktörü
PI3K : Fosfatidilinositol 3-Kinaz
PPAR : Peroksizom Proliferatörle Aktive Olan Reseptör
qRT-PCR : Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SR : Schavenger Reseptör
STEMI : ST Elevasyonlu Miyokard İnfarktüsü
TEKHARF : Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri
TCR : T Hücre Reseptörü
TGF : Transforme Edici Büyüme Faktörü
TLR : Toll Benzeri Reseptörler
TNF-α : Tümör Nekrozis Faktör-alfa
t-PA : Doku Plazminojen Aktivatörü
VCAM-1 : Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1
VLDL : Çok Düşük Yoğunluklu Protein

ÖZET

Türk, F.C. (2020). TNF-α ile indüklenmiş insan umbilikal ven endotel hücre kültüründe (HUVEC) amentoflavonun antiinflamatuar etkinliğinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Amaç: TNF-α ile indüklenip inflamasyon ve ateroskleroz modeli oluşturulan insan umbilikal ven endotelyal hücre kültüründe (HUVEC), amentoflavonun antiinflamatuar ve anti aterosklerotik etkinliğinin göstergesi olarak ICAM-1, VCAM-1, NF-κB, IL-6 ve IL-8 üzerine etkilerinin araştırmak.

Materyal ve Metod: TNF-α ile indüklenip inflamasyon ve ateroskleroz modeli oluşturulan insan umbilikal ven endotelyal hücre kültüründe, 10 ng/ml dozunda TNF-α uygulamasının 6 saat öncesinde, 10 ng/ml TNF-α uygulaması ile eş zamanlı ve 10 ng/ml TNF-α uygulamasından 6 saat sonra olmak üzere her gruba 20'şer mikromolar amentoflavon uygulandı. Toplamda 24 saat inkübasyondan sonra endotel hücrelerindeki ICAM-1, VCAM-1, NF-κB, IL-6 ve IL-8 göreceli mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ve ELISA metodları kullanılarak ölçümlendi. İstatistik testi olarak ANOVA ve Tukey-Kramer testleri uygulandı.

Bulgular: TNF-α uygulanan grupta; ICAM-1, VCAM-1, NF-κB, IL-6 ve IL-8 göreceli mRNA ve protein ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. TNF-α uygulanan gruba kıyasla, amentoflavon uygulanan her üç grupta da bu parametreler açısından istatistiksel olarak anlamlı düşüş gözlemlendi ($p<0.05$)

Sonuçlar: Kontrol grubuna kıyasla, TNF-α uygulanan grupta tüm inflamatuar mediatörlerin artışı, HUVEC kültüründe inflamasyon gelişimi ve ateroskleroz modelinin başarı ile oluşumu lehine yorumlandı. Amentoflavon uygulanan üç grupta da bu parametrelerin TNF-α grubuna kıyasla anlamlı olarak düşüşü amentoflavonun inflamasyon ve ateroskleroz gelişimi üzerine hem profilakside hem hastalık başladığında progresyonunu önlemede hem de tedaviye yönelik olumlu etkileri olabileceği yönünde değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Amentoflavon, HUVEC, İnflamasyon, NF-κB, Adezyon Molekülleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2019-33971

ABSTRACT

Türk, F.C. (2020). Investigation of antiinflammatory activity of amentoflavone in TNF-α-induced human umbilical vein endothelial cell culture (HUVEC). İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Pharmacology. PhD Thesis. İstanbul.

Objective: To investigate the antiinflammatory and anti atherosclerotic effects of amentoflavone on ICAM-1, VCAM-1, NF-κB, IL-6 and IL-8 in TNF-α induced human umbilical vein endothelial cell culture (HUVEC) atherosclerosis and inflammation model.

Material and Method: Human umbilical vein endothelial cell culture was induced with 10 ng/ml TNF-α. 20 micromolar amentoflavone was applied to each group; 6 hours before TNF-α administration / simultaneously with TNF-α administration / 6 hours after TNF-α administration. The relative mRNA and protein expression levels of ICAM-1, VCAM-1, NF-κB, IL-6 and IL-8 in endothelial cells after 24 hours of incubation were measured using the qRT-PCR and ELISA methods. ANOVA and Tukey-Kramer tests were used as statistical tests.

Results: The relative mRNA and protein expression levels of ICAM-1, VCAM-1, NF-κB, IL-6 and IL-8 were significantly higher in the TNF-α treated group compared to the control group. Compared to the group treated with TNF-α, there was a statistically significant decrease in these parameters at the groups which amentoflavone was applied ($p < 0.05$)

Results: Compared to the control group, the increase of all inflammatory mediators in the TNF-α treated group was interpreted in favor of the development of inflammation and atherosclerosis model in HUVEC culture. Compared to the TNF-α group, all three groups administered with amentoflavone showed significant decrease in the relative mRNA and protein expression levels of ICAM-1, VCAM-1, NF-κB, IL-6 and IL-8. Amentoflavone seemed to have positive effects to prevent the development of inflammation and atherosclerosis, preventing its progression when the disease started and at the treatment of atherosclerosis and vascular injury.

Key Words: Amentoflavone, HUVEC, Inflammation, TNF-α, Adhesion molecules

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: TDK-2019-33971

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ateroskleroz, orta ve büyük boyutlardaki arter duvarlarında plak oluşumu ile karakterize olan ve arterlerde gözlenen kalınlaşma ve sertleşme ile ilerleyen, hücresel ve hümoral immün yanıtların da sürece katılması ile damar lümenini daraltan, kronik ve ilerleyici inflamatuar bir hastalık olarak tanımlanmaktadır. Ateroskleroz, başta koroner arterler olmak üzere arteryal sistemin hemen hemen tüm komponentlerini tutabilmekte ve tutulum gösteren bölgeye göre; koroner arter hastalığı, aort anevrizması, karotis stenozu gibi geniş bir klinik çeşitlilikte patolojilere sebep olabilmektedir. Özellikle ilerleyen ateroskleroz ile gelişen koroner arter hastalığı, ülkemizde ve dünyada önemli bir sağlık sorunu olup halen en önemli morbidite ve mortalite sebeplerindendir. Bu yüzden aterosklerozun patogenezinin daha iyi aydınlatılarak koroner arter hastalğının mümkünse önlenmesi ve geliştiğinde en uygun tedavinin yapılması öncelikli hedeflerdendir. Bu sebeple aterosklerozu önlemek ve tedavi etmek üzere yeni ilaçların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır [1,2].

Ross ve arkadaşlarının hipotezine göre [3], endotel hasarı sonrasında görülen lokal inflamasyon, aterosklerozun başlangıcıdır ve sadece başlangıçta değil, hastalığın her aşamasında inflamasyon önemli bir role sahiptir. Endotel hücresinin aktive olmasının ardından sitokinler, kemokinler ve adezyon molekülleri salgılanmaya başlamaktadır. Bunun sonucunda da monosit ve lenfositler subendotelyuma infiltre olarak erken yağlı çizgilerin oluşumuna sebebiyet vermektedir. Bu durum, inflamasyonun ateroskleroz gelişiminde önemli bir rolü olduğuna işaret etmektedir. Aterosklerotik süreçte yer alan hücreler, hem sitokin salgılarlar hem de sitokinlerce aktive de edilebilirler. Lökositler, sağlıklı endotele bağlanamazlar ancak aterosklerotik sürecin tetiklenmesiyle birlikte, endotel hücresi üzerinde lökositlerin bağlanmasına olanak tanıyan çeşitli adezyon molekülleri, sitokin ve kemokinlerin (MCP-1, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, E-selektin ve P-selektin vb.) eksprese olduğu gözlemlenmiştir. Bu sitokin ve kemokinlerin ekspresyonuyla monosit ve/veya lenfositlerin subendotelyuma infiltrasyonu başlamaktadır [3].

Flavinoidler; meyve, sebze, çay gibi gıdalarda doğal olarak bulunan değişken fenolik gruplara sahip moleküllerdir. Flavinoidlerin; antiinflamatuar, antioksidan ve anti aterojenik etkinlikleri sayesinde insan sağlığına olumlu etkileri bildirilmiştir [4,5].

Flavinoidler, hücre adezyon molekülleri ve matriks proteazlarını inhibe etmektedirler. Bu etkilerin mekanizması halen tam olarak çözülememiş olup, inflamatuar medyatörler aracılığı ile endotelyal hücre aktivasyonunda ICAM-1 ve VCAM-1 gibi moleküllerin rolü bulunduğundan, flavinoidlerin endotel hücreler üzerinde hücre koruyucu ve antiinflamatuar etkinliğinin araştırılmasında bu moleküllerin ekspresyon düzeyinin ölçümlenmesinin önemli bir yeri vardır. Çeşitli flavinoidler ile monosit adezyonunu ve hücre hasarını azaltmak üzerine yapılan çalışmalarda; ICAM-1, VCAM-1, NF-κB gibi moleküllerin ekspresyon düzeylerinde azalma olabileceği gösterilmiştir [6,7].

Amentoflavon, bioflavinoid yapıda bir molekül olup, flavinoid ailesi içerisinde yer almaktadır. Çeşitli hastalık modellerinde amentoflavonun neoanjiogenezi önlediği ve antiinflamatuar etkinliğinin bulunduğu gösterilmiş olmakla birlikte [8], endotel hasarı üzerine etkilerini araştıran pek az çalışma mevcuttur. Çalışmamızda, insan umbilikal ven endotelyal hücre kültürü (HUVEC) ortamında endotel hücreleri 10 ng/ml TNF-α ile uyarılarak inflamatuar ateroskleroz modeli oluşturulacak ve TNF-α uygulaması öncesinde (amentoflavonun profilaksideki antiinflamatuar etkisini inceleme amacıyla), TNF-α uygulaması ile eş zamanlı ve TNF-α uygulamasından sonra (tedavi edici etkileri gözlemleme amaçlı) 20 mikromolar amentoflavon uygulanarak, TNF-α aracılığı ile oluşturulan inflamasyon ve ateroskleroz modeli üzerine amentoflavonun etkileri araştırılacaktır.

İnsan umbilikal ven endotelyal hücrelerini (HUVEC) TNF-α ile indüklemek iyi bir koroner arter hastalığı modeli oluşturmaktadır. Amentoflavonun antiinflamatuar, antioksidan ve anti aterojenik etkinlikleri sayesinde insan sağlığına olumlu etkileri olabileceği öngörülmektedir. İnflamasyon modeli oluşturulduktan sonra endotelyal hücrelerdeki IL-6, IL-8, VCAM-1, ICAM-1 ve NF-κB genlerinin mRNA düzeyindeki değişiklikler qRT-PCR metodu kullanılarak ölçümlenecek ve bu moleküllerin protein düzeyindeki değişiklikler ise ELISA yöntemi ile ölçümlenerek kontrol grupları ile anlamlılık düzeyleri karşılaştırılacaktır.

Amentoflavonun antiinflamatuar etki yolağının daha iyi anlaşılması ve etkin tedavi yaklaşımlarının oluşturulması için ön çalışma niteliğindeki bu projeyle, amentoflavonun damar hasarı üzerindeki inflamatuar yolaklardan hangilerini etkilediği ve damar hasarı üzerinde olumlu veya olumsuz herhangi bir etkinliğinin olup olmadığı araştırılarak moleküler mekanizmaları aydınlatılacaktır.

Bu amaçla hipotezlerimiz:

1) Amentoflavon, TNF-α ile indüklenen HUVEC hücrelerinde antiinflamatuar etki göstererek protektif etki gösterecektir.

2) Vasküler hasarlanma mekanizmasında ICAM-1, VCAM-1, NF-κβ, IL-6, IL-8 gibi yolakların olumsuz etkileri bulunmaktadır ve amentoflavon uygulaması sayesinde bu yolaklarda hem mRNA düzeyinde hem de protein ekspresyonu düzeyinde azalmalar olacaktır.

Amentoflavonun vasküler hasar üzerindeki olası etkinliklerinin değerlendirilmesi flavinoidler ile ilgili ileri çalışmalara ışık tutacak, HUVEC'te oluşturulan inflamasyon ve ateroskleroz modelinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve daha sonraki çalışmalarda antioksidan ve antiinflamatuar alt yolakların çalışılmasına zemin hazırlayacaktır. Bu sayede damar harabiyetini önleme potansiyeli açısından molekülü değerlendirerek gelecekteki kullanım ihtimali için bir altyapı oluşturulmuş olacaktır. Bu çalışma sonucunda olumlu veriler elde edildiği takdirde ilerleyen dönemde amentoflavonun antiinflamatuar ve antiaterosklerotik amaçlarla tedavide kullanılabilmesi için yapılacak klinik çalışmalara öncülük edecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnflamasyon, antiinflamatuar ve antioksidan etki

İnflamasyon temel olarak, doku hasarlanmasına vücudun verdiği fizyolojik yanıttır. İnflamatuar yanıt, lokal veya sistemik olabilir. Doku hasarından kısa bir süre sonra gözlenen vazodilatasyon sonucu, kan hacimde artış ve kan akım hızında yavaşlamadan dolayı lokal kızarıklık ve ısı artışı meydana gelir. Damar permeabilitesinin artması sonucu, damar dışına sıvı göçü gözlenir ve bu süreç sonunda da ödem oluşumu gözlenir. Damar dışına sıvı çıkışı ile ödem ile primer bağlantısı bilinen kinin sistemi ile birlikte, koagülasyon kaskadı ve fibrinolitik süreçler de aktifleşir. Damar değişiklikleri ile gözlenen sürecin başlangıcından sonraki birkaç saat içerisinde, adezyon molekülleri aracılı olarak nötrofiller, endotelyal hücrelere yapışarak, damar dışına çıkarlar ve kemokinlerin de etkisiyle inflamatuar yanıtın gerçekleşmekte olduğu bölgeye göç ederler. [9,10].

İnflamatuar yanıtın başlamasından 5-6 saat sonra ise, makrofajlar hasarlı bölgeye yerleşerek aktive olurlar. Bahsi geçen bu aktive makrofajlar; IL-1, IL-6 ve TNF-α gibi proinflamatuar sitokinleri eksprese ederek, sitokinlerin etkisi ile sistemik inflamatuar yanıtta gözlenen değişiklikleri oluşturur. Vasküler permeabilitenin artışı ile beraber koagülasyonu da tetikleyen bu sitokinlerin yönettiği inflamatuar süreçte, organizma adı geçen sürecin şiddetine göre farklı yanıtlar verir. Hafif şiddetli inflamasyonda, yanıt normal süreçte ilerler ve iyileşme yönünde ilerleme gözlenir. Ancak inflamasyon daha şiddetli görüldüğünde ise, organizma tabir-i caizse "kaş yaparken göz çıkartır" ve böylelikle, sistemik inflamasyon gözlenerek; SIRS, sepsis, septik şok ve sonucunda müdahale edilmez ise çoklu organ yetmezliği tablosu gözlenir. [11,12,13,14]

Lokal inflamatuar süreç ile birlikte üç farklı durum ortaya çıkabilir; [9]

1. Hasar gören dokuda sekel kalmaksızın iyileşme gözlenir,
2. İnflamasyonun sınırları net bir şekilde belirlenerek abse formasyonu gözlenebilir
3. Oluşan hasar ile fibrozis ya da sistemik inflamasyon gözlenebilir.

İnflamasyonun tetiklenmesini takiben, belirli bir eşik değerin aşılması halinde, sistemik inflamasyon lehine gelişim gözlenir ve sonuç olarak ise abse formasyonundan çoklu organ yetmezliğine; hatta mortaliteye kadar geniş bir tablo gözlenebilir [15].

Günümüzde adı geçen ve popüler olan antioksidanlar, serbest radikaller ile reaksiyona girerek, serbest radikallerin farklı patolojilere yol açabilecek olumsuz etkilerini azaltan ve/veya inhibe eden maddelerdir [16]. Hücre içerisinde üretilen süperoksit anyonu (O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri (OH); nitrik oksit (NO) ile birleşerek, reaktif nitrojen türevlerini oluştururlar. Bahsi geçen moleküllerin az miktarda eksprese edilmesi; kemotaksise, sitokinlerin ve endotelde lokalize lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonuna neden olurken, yüksek miktarda eksprese ederek salınması ise, organizma için negatif etkiler oluşturmaktadır. Endotelyal hücre hasarı ve vasküler permeabilite artışı ile birlikte, antiproteazların inaktivasyonu gözlenir ve sonraki süreçte hücresel harabiyet gözlenir [17].

2.2. Koroner Arter Hastalığının Epidemiyolojisi

Erişkinlerde en sık görülen kardiyovasküler hastalık koroner arter hastalıkları (KAH)'dır. 1990 yılında ülkemizde başlatılan ve 18 yıllık sonuçların incelendiği 2009 yılında yayınlanan Türk Erişkinlerinde Kalp Hastalıkları ve Risk Faktörleri (TEKHARF) raporuna göre, KAH erkeklerde ve kadınlarda ölüm nedeni olarak ilk sırada yer almaktadır ve KAH'a bağlı ölümler Türkiye'de tüm diğer Avrupa ülkelerine göre daha yüksektir [18].

Türkiye'de ve Avrupa'da, KAH yönünden primer ve sekonder korunma önlemlerinin sonuçlarını değerlendirmek, hastaların yeni kılavuzlara göre önerilen yaşam tarzı değişiklikleri ve ilaç tedavilerine uyuncunu belirlemek amacıyla yapılan "EUROASPIRE IV" çalışmasına göre; ülkemizde Avrupa'ya göre kardiyovasküler korunma önlemlerinin uygulanma oranı düşük, sigaraya devam etme ve hareketsizlik oranları yüksek, eğitim alan ve hekim tarafından izlenen hastaların oranı düşüktür [19]. Bu araştırma sonuçları, ülkemizde kardiyovasküler hastalıklarda primer ve sekonder korunmanın ne kadar önemli olduğunu göstermektedir. Koroner arter hastalığında tedavi edici olarak pek çok molekül kullanılmaktadır fakat profilakside ve tedavide kullanılabilecek doğal ve yeni moleküllere ihtiyaç halen mevcuttur.

2.3. Ateroskleroz Patogenezi

Ross ve arkadaşlarının hipotezine göre, ateroskleroz başlangıcında görev alan mekanizma; vasküler hasarlanma sonrasında inflamatuar cevap olarak aterosklerozun gelişmesidir. Herhangi bir sebeple oluşan doku harabiyetine karşı hücresel ve hümoral yanıtları içeren olayların tamamıdır. İnflamatuar sürecin meydana gelmesindeki amaç, oluşan doku harabiyetinin onarılmasını sağlamaktır. Ross ve arkadaşlarının hipotezine göre ateroskleroz, vasküler yatakta oluşan bir harabiyete cevaben meydana gelen olayların tümü olarak değerlendirilebilir [3].

Ateroskleroza karşı ortaya çıkan ilk protektif yanıt, endotel hücreleri tarafından verilir. Bu sebeple aterosklerozun meydana gelmesinde endotelyal hasar ve yanıt çok önemli bir rol oynamaktadır [20,21]. Endotelyal hücreler vasküler lümenin iç kısmını döşeyen yassı ve tek sıralı hücrelerden oluşan ve normalde hücre elemanlarına karşı bariyer görevi gören, geçişe izin vermeyen bir yapıdadır. Kesintisiz ve düzenli bir yüzey alanı oluşturarak kan ve vasküler duvar arasında bariyer görevi görürler. Bu bariyerin otokrin, endokrin ve parakrin fonksiyonları bulunmakta olup aynı zamanda hemostaz aracılığıyla damarsal fonksiyonların düzenlenmesinde görev alır [22].

Ateroskleroz, genellikle arterlerin dallanıp çatallaşma yaptığı alanlarda laminer akım düşüşü sebebiyle oluşan progresif bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan insan ve hayvan deneylerinde, ateroskleroz gelişimi sürecini başlatan etkinin, apolipoprotein-B içeren lipoproteinlerin endotel altına girerek burada birikimi olduğu ortaya konmuştur [23].

Aterogenez esnasında vasküler yapılarda bazı değişiklikler meydana gelir, özellikle monosit ve makrofajlar bu değişikliklerin ortaya çıkmasında kilit bir görev alırlar. Endotel, monosit ve makrofajlarda yapılan hücre kültürü çalışmaları sayesinde, aterosklerozun patofizyolojisine dair çeşitli mekanizmalar keşfedilmiştir ve inflamatuar süreçte endotelin de çok önemli bir rolünün olduğu gösterilmiştir. Endotelyal adezyon yapısı çok sıkı olup, en fazla albumin boyutundaki moleküllerin geçişine izin verir.

Lipoproteinler ise albuminden daha büyük moleküllerdir, bu sebeple yalnızca plazma vezikülleri aracılığı ile bu bariyeri geçebilirler. Endotel harabiyeti sonucu vasküler geçirgenlik artar ve LDL gibi moleküller endotelden rahatlıkla geçebilir. LDL modifikasyonları çoğunlukla bu sırada meydana gelir [24]. İntimaya giren LDL molekülleri öncelikle endotel tarafından modifiye edilir ve okside LDL'ye dönüştürülür. Okside LDL, sitokinlerin ekspresyonunu indükleyip nitrik oksit salınımını inhibe ettiğinden endotelyal harabiyet oluşturur ve ateroskleroz sürecini hızlandırır. Nitrik oksit; L-arjininden Nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi sayesinde sentezlenir ve endoteli koruyan temel moleküllerden biridir. Özellikle antiagregan etkisiyle trombüs gelişimini önlerken, antiinflamatuar özelliğiyle de ateroskleroz oluşumunu azaltmaktadır. Bu sayede adezyon moleküllerinin endotel yüzeyinden salınımı önlenirken, lipidlerin damar içerisinde birikimi ve düz kasların proliferasyonu da önlenmiş olur [25,26].

NO en potent vazodilatatördür. Sigara kullanımı, hipertansiyon öyküsü, dislipidemi, obezite ve diyabet gibi durumlar, endotel harabiyeti meydana getirir. Bu tarz durumların mevcudiyeti endotelyal NO yıkımının artmasına ya da salınımının azalmasına sebep olur [27]. Sağlıklı endotel yapısı vazodilatasyon ve vazokonstrüksiyon dengesini muhafaza eder. Bu dengenin bozulması durumunda endotel proaterojenik ve proinflamatuar hale gelerek endotel hasarı oluşur [28]. Bu durumda histamin, adrenalin, serotonin, ADP gibi moleküller salınarak damar geçirgenliğinin artmasına sebep olurlar. NO salınımı ya da aktivasyonunun azalması durumunda ise yeterli vazodilatasyon gelişemez ve LDL okside olur [29].

Okside LDL'nin düz kas ve makrofaj hücreleri üzerinde de aktivatör özelliği bulunmaktadır. Okside LDL sebebiyle meydana gelen endotel hasarının pıhtılaşmayı tetiklediği ve proinflamatuar sitokinlerin üretiminde artışa sebep olduğu ortaya konmuştur. Lökositlere etkili kemoatraktan ve adezyon moleküllerinin salınımında da bir artış meydana gelmektedir [30]. LDL oksidasyonuna sebep olan bir diğer hücre grubu da makrofajlardır [31]. Unstabil aterom plaklarında makrofaj ve T hücrelerinin haricinde IL-6, TNF-α gibi proinflamatuar sitokinler, VCAM-1 gibi adezyon molekülleri, kemokinler, de görev almaktadır [32].

Aterosklerozun erken döneminde oluşan lezyonlar tip I lezyonlar olarak tanımlanır. Bu yapılar, az miktarda yağ birikimi ve köpük hücreleri ile karakterizedir. İntima tabakasının kalınlaşmasına yaygın intimal kalınlaşma ismi verilir. Yaygın

intimal kalınlaşmanın içeriğinde; düz kas hücreleri, elastin, proteoglikanlar ve makrofajlar bulunur. Yaygın kalınlaşma aort ve koroner damarlarda gelişebilir ve bu durum yaşa bağımlı değildir [33].

Tip I lezyonlarda makrofajların geçişinden önce hücrelerin dışında lipid biriktiği ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalarda aorta intimasında da lipid birikimlerinin olduğu gösterilmiştir [34]. Koroner arterler incelendiğinde CD68+ makrofajların lipid oranıyla ilişkili olarak artış gosterdiği ortaya konmuştur [35]. Lipoproteinlerin de transsitozis vasıtasıyla endotel altı alana taşındığı gösterilmiştir. Ekstraselüler matriksteki çeşitli proteoglikanlar subendotelyal alanda lipoproteinlerin birikimini kolaylaştırır [36]. Subendotele geçen LDL, çeşitli proteinler ve proteoglikanlarla reaksiyon göstererek değişimler geçirir [37]. Bu olaylar sonucunda LDL'lerden inflamasyonu tetikleyen moleküller meydana gelir. Bu süreçte, oksidasyon, lipoliz ve proteoliz izlenir. Endotel, düz kas hücreleri, monosit ve makrofajlar, okside düşük dansiteli lipoproteini (oxLDL) tutabilirler [38,39].

Sağlıklı endotel hücreleri lökositlerle meydana gelen adezyona karşı oldukça dayanıklıdır. Ancak kolesterol yüksekliği olduğunda; lökositler endotel adezyonu sonrasında transmigrasyon vasıtasıyla intima tabakasına göç ederek burada yağ birikimi ve köpük hücre formasyonu oluşturur. T lenfositler de tıpkı monositler gibi aterom plaklarında toplanırlar. Endotel yüzeyinde sentezlenen bazı adezyon moleküllerinin salınımı; monosit ve T lenfositlerin endotel adezyonunu düzenler. Bahsi geçen adezyon molekülleri iki gruba ayrılır; ilk grup, bir immunglobulin olan "Vascular Cell Adhesion Molecule-1" (VCAM-1)'dir. Bu konuyla ilgili çalışmalar, aterom plaklarındaki hücre yüzeylerinde VCAM-1 salınımının gerçekleştiğini göstermiştir. Bir diğer lökosit adezyon molekülü de "Intercellular Adhesion Molecule-1" (ICAM-1) dir. ICAM-1 endotel tarafından düşük seviyede eksprese olduğundan ve bazı lökositlere bağlandığından ateroskleroz için daha az seçicidir [40].

2.3.1. Aterosklerotik lezyonların gelişimi

Subendotelyal alanda sarı renkli ve yüzeyden kabarık yağlı çizgilenmelerle kendini gösteren makrofaj köpük hücreleri tip II lezyonları oluşturur. Bu lezyonlar T lenfositler, mast hücrelerinden ve düz kas hücrelerinden zengindir. Değiştirilmiş lipoproteinlerin reseptör aracılı endositozu, Scavenger Reseptörler sayesinde meydana

gelir [41] ve oxLDL nin hücre içine alınmasında CD36 ve SR-A reseptörleri görev alır. Köpük hücreleri; MCP-1, IL-6 ve MMP lerin salınımında artışa sebep olur [42,43].

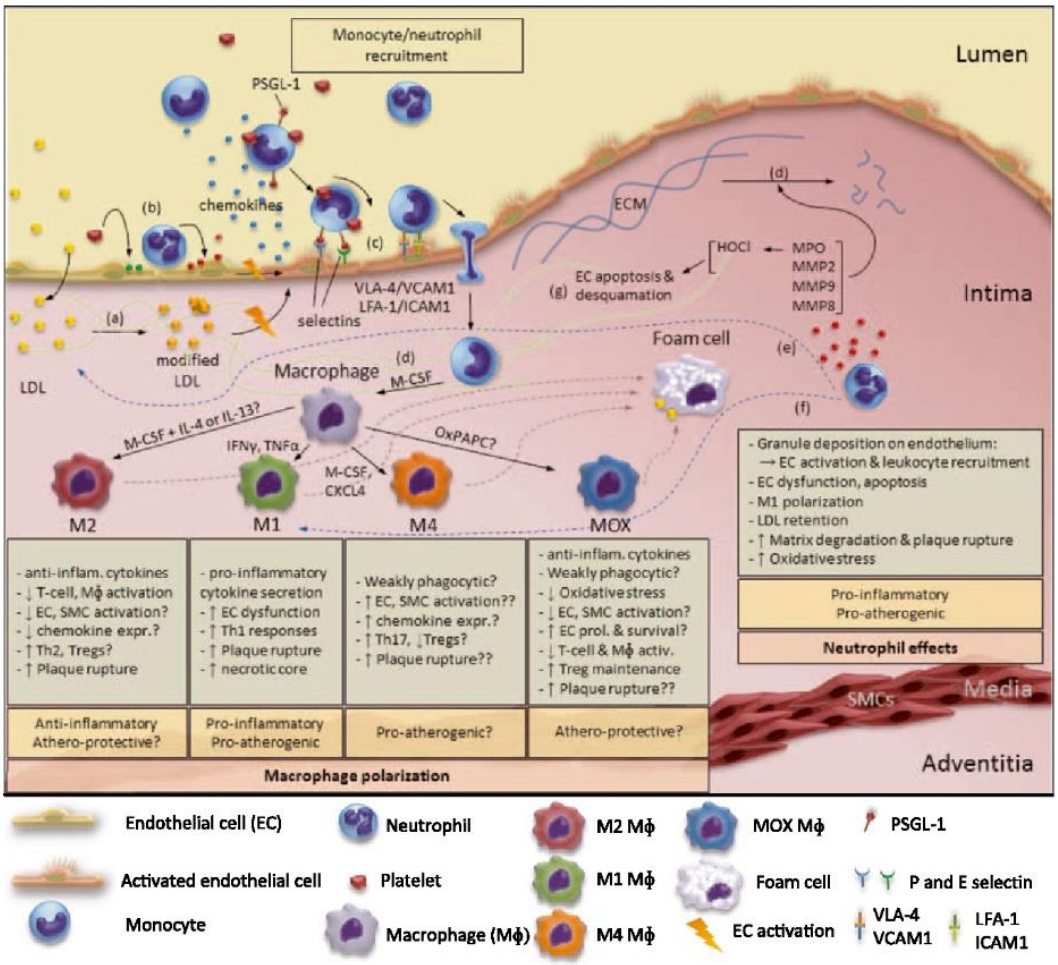
Tip III lezyonlar minimal hücre dışı yağ depolar. Lipidler, ateroskleroz lezyonlarının en derin kısımlarında yerleşirler. Bu birikimler intima organizasyonunu hasara uğratıp ekstraselüler matriks alanının genişlemesine katkıda bulunur. Yağlı çizgilenmeler, fibrozise uğrayarak plaklar oluşturur ve sürecin ara basamağını oluştururlar. Tip II lezyonlarda, lipid yapıları tüm lezyon boyunca dağılırlar. Lipidler en çok intimanın kalınlaştığı bölgelerde bulunan düz kaslarda depolanır. Bu depolar, intraselüler proteoglikanlar ve düz kasların yerine geçer. Ekstraselüler lipid birikimi sonucu ise vasküler duvara makrofajların kapasitesini aşacak kadar fazla lipid birikimi oluşur ve sonucunda aşırı kolesterol birikimi sonrası sitotoksisite ve apopitozis gerçekleşir [40,44].

Tip IV lezyonlar, ileri lezyonlar olarak değerlendirilir, burada ekstraselüler yağ miktarı artarak bir kolesterol havuzu oluşturur. Histolojik özellik olarak, çok sayıda hücre dışı lipid çekirdekleri gözlemlenir ve bunlar aterom olarak isimlendirilir. Bahsi geçen lipid çekirdekleri, tip II lezyonlarda gözlemlenen yağlanmaların birleşimi sonucu meydana gelir ve takip eden süreçte apopitozise giden aşırı doygun makrofajlar da bu lipid çekirdeklerin gelişimine katkı sağlar [45].

Tip V lezyonlarda, yoğunlukla bağ doku bulunur. Lipid çekirdekler fibrotik bir kapsül tarafından sarılırlar. Lezyonlar çok büyük yapıda olduklarından arteryel duvarda remodeling süreci gelişemez ve lümen daralır. Tip Va lezyonlara ise fibroateromlar ismi verilir. Bu lezyonlar, kalın bağ dokusu tabakaları ile birbirlerinden ayrılmış lipid çekirdeklerinin bir araya gelmesinden meydana gelir. Aynı zamanda lezyon yüzeyinin bozulması sonucu da bu tip lezyonlar meydana gelebilir. Bu aşamadan sonra hematom ve trombozis, lezyonların ilerlemesi için uygun bir ortam oluşturur. Tip Vb lezyonlar ise mineralize ve kalsifiye olmuş lipid çekirdeklerinden oluşur. Tip Vc lezyonlar fibrotik lezyonlardır. Ekstraselüler lipid oldukça azdır ve bağ dokusu içerisinde bolca çekirdek mevcudiyeti ile karakterizedir. Ateroskleroz ile ilişkili morbidite ve mortaliteden çoğunlukla Tip IV ve Tip V lezyonlardaki yüzey deformasyonları, hemoraji, hematom gibi komplikasyonlar sorumludur.

2.3.2. Aterosklerozda Hücrelerin rolü

Ateroskleroz patogenezinde, çok sayıda hücre ve bunlar tarafından üretilen aracılar görev alır. Bu hücreler temelde; endotel hücreleri, lökositler, trombositler ve intimal düz kas hücreleri olarak dört gruba ayrılır [46].



Şekil 1: Aterosklerozda hücrelerin rolü

Görsel Referans: Bart Legein et. Al. inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. Cellular and Molecular Life Sciences volume 70, 3847-3869

2.3.2.1. Endotel Hücreleri

Tüm kan damarlarının iç lümenini döşeyen tek katlı yassı epitel hücrelerinden oluşan bir tabaka olması sebebiyle kan ile damar duvarı arasındaki ana bariyeri meydana getirir. Endotelin mekanik bariyer fonksiyonu, kanın laminer akımının sağlanması, tromboz, tromboliz, trombosit - lökosit etkileşimleri, vasküler tonusu

sağlamak, anjiogenez gibi pek çok görevi bulunmaktadır. İnflamasyon, ateroskleroz ve trombozis gibi patolojik durumlarda salınan pek çok mediatör de endotelden salınır. Endotel hücreleri su ve elektrolitlere karşı seçici geçirgendir [46, 47].

Ateroskleroz, hipertansiyon, diabetes mellitus gibi kardiyovasküler sistemi etkileyen hastalıkların kökeninde endotel fonksiyon bozuklukları yer almaktadır. Bu fonksiyon bozuklukları; vazodilatasyon kabiliyetinin azalması, vasküler inflamasyon oluşumu ve protrombotik oluşumlar olabilir [47].

Endotelde gelişen oksidatif stres artışı Nitrik Oksit üretimi ve dengesini bozarak endotelin permeabilitesini artırıp zararlı maddelerin intima altına geçişine sebebiyet vermektedir [47, 48]. NO inhibisyonu damarın vazodilatasyon kabiliyetini azaltmaktadır. Oksidatif stres artışına bağlı NO dengesinin bozulması endotel permeabilitesinin bozulmasına sebep olarak C-Reaktif Proteinin (CRP) endoteli geçmesine sebebiyet vererek inflamasyonu tetikleyecektir [48, 49].

Hipertansiyon, diabetes mellitus, sigara tüketimi, kolesterol yüksekliği gibi durumlar da endotel disfonksiyonuna sebep olur. Bu endotelde proinflamatuar ve protrombotik durumlar meydana gelir [47]. Endotel disfonksiyonu geliştiğinde ICAM-1, VCAM-1 ve monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi adezyon molekülleri daha fazla salınmakta ve damar duvarında aterosklerozun başlamasına sebebiyet vermektedir [47, 50]. Inflamasyon artışını gösteren CRP endotelde, endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz (eNOS) ile gerçekleşen NO üretimini azaltamakta ve aterogenezin artışına sebep olmaktadır [51].

Okside lipoproteinler ve lisofosfatidilkolin gibi aterosklerozu indükleyen iki önemli molekülün de NO inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir [47, 52]. Okside LDL' nin ise eNOS ekspresyonu ve fonksiyonunu azalttığı ortaya konmuştur [53]. Oksidatif stres artışı ve okside lipidler NO biyoyararlanımını azaltır ve NFκB aracılı proinflamatuar yolakları aktive ederler [47]. Endotel disfonksiyonunda antiagregan, antikoagülan ve fibrinolitik özellikler azaldığından plak rüptürü ve trombozis gelişimi kolaylaşır [47]. Plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAİ-1) üretimi endotel disfonksiyonu durumunda aşırı artarak pıhtılaşmaya eğilimi artırır [47, 54]. Özetle, aterosklerozun tüm aşamalarında endotel disfonksiyonu çok önemli bir rol oynamaktadır.

2.3.2.2. Vasküler Düz Kas Hücreleri

Vasküler düz kas hücreleri de ateroskleroz patogenezinde rol oynayan hücrelerden biridir. Damarların tunika media tabakasını oluştururlar ve vasküler tonusu sağlarlar. İntimal ya da subintimal makrofaj yerleşimi yahut inflamasyon gelişimi sonrasında düz kas hücreleri tunika mediadan tunika intimaya doğru göç eder. Bu göç sonrasında düz kas hücreleri intimada çoğalıp ekstraselüler matriks oluşturmak suretiyle fibröz plakların oluşumunu tamamlarlar. Düz kas hücreleri Anjiotensin 2 Tip 1 reseptörleri, Toll like reseptörler (TLR), Lektin benzeri okside LDL reseptörü (LOX-1) gibi pek çok reseptör aracılığıyla ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynamaktadır [55]. Düz kas hücreleri normalde endotelyal hasarı onarmaya çalışır fakat inflamatuar uyarıya yanıt olarak düz kas hücreleri aterosklerozun fibroproliferatif özellik kazanmasına neden olur. Eğer hasar süreci uzun süre devam ederse bu hücreler kontrolsüz çoğalarak fibröz plak oluştururlar ve koroner arterleri daraltarak koroner iskemiye sebep olurlar. Her ne kadar vasküler düz kas hücreleri aterom plağının stabilitesini sağlasa da, sayılarının azalmasına bağlı salgıladıkları kollajen ve ekstaselüler maktriks miktarı azalır ve bunun sonucunda fibröz kılıfı incelen aterom plağında rüptür meydana gelir [46].

2.3.2.3. Lökositler

Lökositler, ateroskleroz patogenezinde kilit rol oynayan bir diğer hücre grubudur. Endotel hasarına yanıt olarak intimal veya subintimal bölgeye geçen monosit ve lenfositler inflamasyonu başlatırlar. Bu durum süreklilik arz ederse ateroskleroz ilerler ve komplike hale gelir. B lenfositler ve plazma hücreleri tunika adventisyada bulunurlar. Aktive mast hücrelerinin de akut iskemik olaya sebep olan lezyonlarda plak içerisinde ve tunika adventisyada yer aldıkları ortaya konmuştur. Nötrofil hücreleri stabil plaklarda gözlemlenmezken plak rüptürü sonrası komplike olan ve tromboz meydana gelen plaklarda gözlemlenebilirler.

Ateroskleroz patogenezinde, en önemli rolü oynayan hücreler monositlerden köken alan makrofajlardır. Monositlerin endotelden geçişinde bazı kemokinlerin büyük rolü olduğu ortaya konmuştur. En önemli monositik kemoatraktan moleküller; okside LDL ve Monosit Kemotaktik Protein-1 (MCP-1)' dir. Transmigrasyon sonrası intima tabakasına ulaşan monositler; monosit koloni sitimüle edici faktör-1 (MCSF-1) ile makrofajlara dönüşerek vasküler inflamasyonu artırırlar. Bunun yanında makrofaj hücreleri modifiye LDL türevlerini aşırı fagosite ederek köpük hücrelerine dönüşürler.

Köpük hücreleri aterosklerozun en tipik hücreleridir. Makrofaj üzerinde bulunan ve lipid fagositozunu sağlayan reseptörlere çöpçü (scavenger) reseptörler denmektedir. Scavenger reseptörler, down regülasyona uğramaması ile diğer reseptörlerden ayrılırlar. Bu sebeple makrofajlar köpük hücresine dönüşürse ölene kadar aterojenik lipidleri fagosite ederler ve apopitotik köpük hücrelerinden nekrotik çekirdekler meydana gelir. Makrofajlar doku faktörleri ve MMP' lar salgılayarak aterom plağının yırtılmasına da sebep olur [46].

2.3.2.4. Trombositler

Trombositler ve pıhtılaşma kaskadı, aterom plağının tromboze olarak komplike hale gelmesi ve akut koroner sendrom gibi iskemik olayların gelişmesinde büyük rol oynar. Trombositlerin bu süreçteki rolü agregasyonla sınırlı değildir, trombositler inflamasyona sebep olan bazı kemokinlerin salınımı ve hücre-hücre etkileşimi gibi bazı basamaklarda da görev alır [56]. Aktive trombosit hücrelerinde selektin ekpresyonu da artmaktadır [57]. Trombositler, sheer stresin yüksek olduğu vasküler alanlarda ICAM-1 ve P–selektin gibi bazı adezyon molekülleri aracılığıyla lökositleri atrakte etmektedir [56, 58]. Antijen sunan dendritik hücrelerin de trombositler ile ilişkilerinin olduğu ortaya konulmuştur [56, 59, 60]. Trombosit hücreleri agregasyon dışında aterosklerozun oluşumunda da inflamatuar ve immün yanıtlar üzerinden önemli etkiye sahiptir.

2.4. İnflamasyon süreçleri ve ateroskleroz

Aterojenik diyet, hiperkolesterolemi ve diğer risk faktörleri kısa süre içerisinde intimada ve diğer subendotelyal tabakalarda lökosit birikimine sebebiyet verir [18]. Endotel hücreleri, sağlıklı bir damar yapısında lökositlerin adezyonuna direnç gösterirler fakat aterosklerotik yapılar bu adezyonu kolaylaştırır. Endotel-lokosit adezyon molekülleri endotele mononükleer lokosit adezyonu için elzemdir. VCAM-1, özellikle erken evre aterom plaklarındaki monosit ve T lenfositlere bağlanır.

Sağlıklı endotel hücreleri lökositler ile uzun süreli temasa direnç gösterir. Endotelde inflamatuar süreç başladığında lökosit adezyon moleküllerinin ekspresyonunda artış meydana gelir. Vasküler adezyon molekül-1 (VCAM-1)'in monositlerin aterom plağına toplanması açısından büyük önemi bulunmaktadır. VCAM-1 salınımı sonrası çeşitli kemoatraktan moleküllerin de vasıtasıyla monositler endotelyal

hücrelere doğru harekete geçerler. CCR2 ile birlikte monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi bazı kemokinler bu sürece dahil olurlar. Monosit intimaya girdikten sonra makrofaja dönüşür. Bu makrofajlar, intraselüler lipoproteinlerin oksidasyon veya glikasyon için modifiye edilmesini sağlayan scavenger reseptörleri eksprese ederler. Böylece intrastoplazmik lipid birikimi meydana gelerek arteryal köpük hücreleri oluşur.

Makrofajlar tunika intima içerisinde meydana gelen ateroskleroz ve komplikasyonlarının çoğundan sorumludur. Proinflamatuar sitokinlerin büyük kısmı bu köpük hücreleri tarafından salınır böylece lezyondaki inflamatuar yanıt ve reaktif oksijen radikallerinin artışı meydana gelir. Aktive olan mononükleer fagositler matriks metalloproteinazlarını (MMP) üretir. Bu matriks metalloproteinazları hücre dışı matriksi çökelterek aterom plağının fibrotik kapsülünü güçlendirir. Makrofajlardan bazıları apopitozisle ölerek "nekrotik çekirdek" oluşumuna sebebiyet verir [61].

VCAM-1'in lökosit adezyonuna ek olarak, endotel hücrelerde, lezyonlu bölgelere kolesterol girişine cevaben de üretildiği gösterilmiştir [62]. Bunun yanında yapılan çalışmalarda kolesterol ile indüklenen lezyon formasyonu gelişimi için VCAM-1'in lökosit migrasyonundan önce miktarının arttığı ortaya konmuştur [63]. Farelerde yapılan deneylerde VCAM-1'in selektif delesyonlarının embriyonik ölümlere sebep olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında VCAM-1'in hipomorfik varyantları üzerinde yapılan çalışmalarda apolipoprotein E geninin (apo-E) inaktivasyonu ile aterogeneze duyarlı hale getirilen farelerde lezyon oluşumunun azaldığı ortaya konmuştur [64].

Aterojenik diyet sonrası, VCAM-1'in indüksiyonu, yüksek ihtimalle hiperlipidemiye cevaben tunika intimada toplanan modifiye lipoproteinler sebebiyle oluşan inflamasyona bağlıdır. Lipoproteinler, okside fosfolipidler ve lipoprotein oksidasyonu sonucu oluşan kısa zincirli aldehitler, VCAM-1 geninin NF-κB aracılı transkripsiyon aktivasyonunu indüklemektedir [65]. İnterlökin -1β veya tümör nekrozis faktör alfa (TNF-α) gibi proinflamatuar stokinlerin de aynı mekanizma ile endotelde VCAM-1 ekspresyonunu artırdıkları ortaya konmuştur. Sonuç olarak proinflamatuar sitokinler, VCAM-1 ekspresyonu ve hiperkolesterolemi ile bağlantılı moleküllerdir.

Son dönemde, lezyon gelişen arterlerde selektif VCAM-1'in ekspresyon mekanizması sıkça araştırılmıştır. Arteryal dallanmalar genellikle kan akımı sebebiyle shear stres (kan akımının damarlara uyguladığı çapraz basınç ya da kayma direnci) yaşamaktadırlar. Bu çalışmalarda ortaya atılan ateroprotektif bakış açısına göre

arterlerin dallandığı noktalar gibi ateroskleroz gelişimine yatkın bölgelerde bozulmalar oluşmaktadır. Ateroprotektif özellik taşıyan genler, promotör bölgelerinde shear stres yanıt elemanlarını barındırırlar ve inflamasyonu düzenlerler. Örneğin; laminar akım bulunan bölgelerde yüksek seviyelerde eksprese edilen süperoksit dismutaz enzimi oksidatif stres ile savaşmakta, VCAM-1 ekspresyonuna ve diğer inflamatuar yolakların aktivasyonuna sebep olmaktadır [66]. Bir diğer gen vasıtasıyla ise endotelden nitrik oksit sentaz ile açığa çıkarılan NO salınmakta, bu durum vasküler inflamasyonun transkripsiyonel kontrol noktası olan NF-κByi inhibe ederek VCAM-1 gen ekspresyonunu da azaltmaktadır [67]. Bu bakış açısı akımın bozulduğu bölgelere rağmen, hiperkolesterolemi gibi risk faktörlerinin oluşumu ile aterom oluşumuna yönelim için bir yanıt oluşturmaktadır.

Yapılan çalışmalarda lökositlerin endotele adezyonu sonrasında mutlak suretle diyapedez vasıtasıyla intimaya girdiği gösterilmiştir. Bu durum yaklaşık 100 yıldır bilinmekte ancak henüz birkaç yıldır moleküler analizleri araştırılmaktadır. Bu sayede lökosit migrasyonuna sebep olan kemokinler tanımlanmıştır. Monosit kemoatraktant protein-1'in (MCP-1) aterosklerotik plaklardaki aşırı ekspresyonu, mononükleer fagositlerin alımına ve plaklarda birikimine sebebiyet vermektedir. IL-8 ve interferon-γ (IFN-γ) tarafından indüklenen CXC kemokinleri de aterogenez sırasında benzer kemoatraktan role sahiptir [68,69]. Mast hücrelerinin aterom plağında görülmesi de benzer şekilde plakta aşırı miktarda üretilen bir CC kemokini olan eotaksine bağlı olabilir [46]

Monositler, tunika intima içerisinde yerleşik hale geldiğinde makrofajlara dönüşmeye başlar ve köpük hücre formuna geleceği bir takım değişiklikler yaşar. Monositler, Scavenger Reseptör A (SRA) ve CD36 gibi reseptörlerin ekspresyonunu artırarak modifiye proteinleri içine alıp sitoplazmik damlacıklar halinde biriken kolesterol esterleri haline getirir. Bu lipidle dolu makrofajlar köpük hücreleri olarak adlandırılırlar ve aterosklerotik lezyonların erken halidirler.

M-CSF'nin, monositlerin makrofajlara dönüşümünde pek çok basamağı aktive ettiği ortaya konmuştur. M-CSF, SRA'yı artırarak sitokin ve growth faktörlerinin ekspresyonlarını artırmakta, sağkalım ve komitojenik uyarıyı indüklemektedir. Hem deneysel hem de insan aterosklerotik plaklarının M-CSF'yi aşırı ürettiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [164, 165]. İnaktif M-CSF mutasyonlu fareler öncesinde

aterosklerotik duyarlılıklarına göre beslenmiş ve M-CSF'nin lezyon gelişimleri üzerine etkileri araştırılmıştır. M-CSF delesyonlu farelerde, makrofaj birikiminin bariz şekilde azaldığı ve lezyon gelişiminin geciktiği gözlemlenmiştir [166, 167]. Bu etki aynı şekilde hem apo-E hem de LDL reseptör eksikliğinde de gözlemlenmiştir. Granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör de (GMCSF) aterosklerotik plaklarda inflamasyonu indükleyebilmektedir. GM-CSF mononükleer fagositlerin yaşamasını destekler. Bu fagositler ise Hipokloröz asit artışının kaynağı olan myeloperoksidaz enzimini içerir ve plaklarda potansiyel oksidatif stres artışı ve inflamasyona sebep olur [168].

Yağlı çizgilenme sonrası oluşan aterom plağı daha karmaşık bir hal alır ve klinik belirtiler oluşur. Geleneksel bakış açısına göre, ekstraselüler matrikste bulunan ve plak içinde kümelenen düz kas hücrelerinin çoğalması ile yağlı çizgiler daha komplike olan ateromaya doğru değişir. Lezyon daha da büyüyünce, arteryal lümen daralır ve klinik belirtiler ortaya çıkmaya başlar. Bu belirtiler koroner akımda; stabil olmayan anjina pektoris veya akut MI'dır. İntimadaki makrofajlar tarafından hazırlanan büyüme faktörleri düz kasların çoğalmasını teşvik ederek lezyonun büyümesinden sorumludur. Klasik bakış açısına göre, bu süreç kaçınılmazdır ve zamanla ilerlemektedir. Var olan deliller, plakların parçalanmasının trombozlar tarafından tetiklenmesi ile gerçekleşebileceğini ve bunun da aterosklerotik lezyonun aniden genişlemesine neden olduğunu göstermektedir [169].

Aterom plaklarının içerisindeki mikrovasküler yapıların rüptürü, ani plak progresyonunu açıklayan bir başka hipotezdir [55]. Aterom plaklarındaki mikrovasküler yapılar tıpkı diabetik retinada olduğu gibi frajildir ve kanamaya yatkındır. Yapılan çalışmalarda aterogenez esnasında plak içinde görülen fibrin, fibrinden yıkım ürünleri ve hemosiderin birikimi plak içinde gelişen kanamalar ve in situ tromboza işaret etmektedir. Bunun sonucunda trombin meydana gelerek fibrinojen artışına; böylece düz kas göçü ve çoğalmasına sebep olur. Trombin, plateletlerden PDGF gibi growth faktörlerinin ekspresyonunu ve düz kas hücrelerinin çoğalmasını ve göçünü sağlar. Aktive plateletlerden transforme edici growth faktörler de (TGF-β) salınır. Bu büyüme faktörleri, düz kas hücrelerinde hücre içi kollajen üretimi için en güçlü uyaranlardır. Böylece aterosklerotik damarların tunika intimasında gelişen mikrovasküler kanamalar plak gelişimini hızlandırmaktadır. En yaygın plak rüptürü ise; plağın fibröz şapkasının kırılarak inflamasyona eklenmesiyle gelişir.

Sağlıklı koroner arterlerde endotel hücreleri bazal membran üstünde arteryal lümeni kaplarlar. Erişkin bir insanda tunika intima genelde eser miktarda düz kas hücresi içerir. İnternal elastik lamina, tunika tabakası ile subintimal ortam arasinda bir bariyer görevi görür. Bu ortam kollajen ve elastin açısından oldukça zengin olup, düz kas hücrelerinden meydana gelen çok katmanlı bir yapıya sahiptir. Aterogenezin erken döneminde, inflamatuar hücrelerin toplanması ve lipid birikimi lipid çekirdeklerin oluşumuna sebep olurken damarlar dışa doğru genişler. Eğer dislipidemi gibi risk faktörleri direnç kazanırsa; IFN-γ gibi proinflamatuar sitokinler yeni kollajenlerin sentezini sınırlarlar, ancak bu esnada lipid çekirdek progrese olup, proteinazlar hücre dışı matriksi parçalayabilir. Bütün bu olaylar fibröz başlığın zayıflayarak frajil bir yapı oluşmasına sebep olur. Bu durumun sonucunda plak rüptüre olur ve plaktan gelen kan intrinsink faktörle etkileşime girerek pıhtılaşma gerçekleşir. Plateletler, pıhtılaşma kaskadı tarafından üretilen trombin ve intimaya temas sayesinde aktive hale geçerek trombüs oluşumunu tetikler. Bunun sonucu olarak trombüs damarı tıkarsa akut MI tablosu ortaya çıkar.

Pıhtılaşma sırasında ortaya çıkan trombin tarafından tetiklenen iyileşme yanıtı, düz kas hücrelerinin çoğalmasını uyarabilir. Aktive plateletler tarafından eksprese edilen PDGF düz kas migrasyonunu uyarır. Aynı şekilde aktif plateletlerce eksprese edilen TFG-β, da hücre içinde kollajen üretimini uyarır. Bu artan göç fibröz başlığın kalınlaşması ve intima tabakasının genişlemesine neden olarak lümeni daraltır bu durum özellikle kalp yükünün artması durumunda kan akışını sınırlandırabilir ve göğüs ağrısı gibi bulguları tetikleyerek iskemi oluşturur. Daha da kalınlaşan stenozlarda kopma veya yeniden tromboz meydana gelebilir. Kan yağ seviyesinin azaltılması bu inflamatuar yanıtın azalmasını sağlayabilir bu sayede daha stabil bir plak ve korunmuş bir lümen (merkez) oluşur [61]. Fibröz plak rüptürleri, MI vakalarının yaklaşık ¾’ üne sebep olmakta ve çoğunlukla herhangi bir klinik bulgu göstermemektedir. Fibrinolitik mekanizmalar, pro-koagülan yolaklara üstün gelirse, mural trombüsler oluşur ve düz kas kümeleşmesi ve kollajen akreditasyonu aterom plaklarının daha da fibroz bir yapıya dönüşmesine sebebiyet verir.

Endotelyal inflamasyon gelişiminin iki farklı mekanizması bulunmaktadır. Bunlardan ilki apopitozis ya da T hücreleri aracılı sitolitik atakla oluşan endotel ölümüdür. Bu durum, lokal inflamatuar aracıların ortaya çıkmasına neden olur.

İnflamatuar aracılar ve okside lipoproteinler matriks metalloproteinazlarının (MMP) üretimi ve aktivasyonunu tetikler [167]. Böylece inflamasyon uyarılır ve endotel kaybı oluşarak yüzeysel erozyon meydana gelir. Makrofajların da dahil olduğu plak içindeki inflamatuar hücreler düz kas hücreleri için growth faktörlerinin salgılanmasına ek olarak asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) aracıları da salgılarlar [170, 171]. Plak içindeki mikrovasküler yapılar hem in situ trombozda kanama bölgesi olarak hem de plak büyümesinde besin görevi taşırlar. Yapılan çalışmalarda, anjiyogenez inhibisyonunun ateroskleroz predispoze farelerde mikrovasküler oluşum ve lezyon gelişimini azalttığı gösterilmiştir [172].

İntersitisyel kollajen, fibröz şapkanın sağlamlığını sağlamaktadır. IFN-γ gibi pro-inflamatuar sitokinler damar düz kaslarında kollajen üretimini inhibe ederler. İntersitisyel kollajen lifleri genelde yıkıma dirençlidir ancak yine de kollajen lifleri içinde proteolitik çentikler oluşmakta ve üçlü helikal yapıda kollajen fibrilleri meydana gelmektedir. Bu çatlakların gelişimi sonrasında jelatinazlar kollajen yıkımına devam eder. Aterom plaklarında MMP-2 ve MMP-9 isimli jelatinazlar aktive olmuştur. Ancak arterler MMP'lerin antagonistlerini endojen olarak üreterek metaloproteinazların doku inhibitörleri olarak görev yaparlar (TIMP) [173]. Bunun yanında aterom plağındaki IL-1β, TNF-α, ve CD40 ligand (CD154) gibi inflamatuar aracıların da MMP ekspresyonunu tetiklediği ortaya konmuştur. Mast hücreleri hem MMP'yi indükleyen TNF-α hem de MMP proenzim aktivatörü olan serin proteinazları eksprese eder [70, 71]. Sonuç olarak; fibröz şapkadaki kollajen yapının degredasyonu plağı güçsüzleştirerek rüptürlere duyarlı hale getirir.

2.5. Ateroskleroz Patogenezinde İnflamasyon Tetikleyicileri

LDL kolesterol, ateroskleroz gelişimi için en büyük risk faktörlerinden biridir ancak Amerika'da koroner arter hastalığına sahip bireylerin büyük bir kısmında kolesterol düzeylerinin yüksek olmadığı da ortaya konmuştur. LDL kolesterolü düşürmeyi amaçlayan tedavi protokollerine ragmen beş yıllık tedavi süresince koroner olayların en fazla 1/3'ü engellenebilmektedir bu sebeple tedavide LDL kolesterol dışında risk faktörlerini de hedeflemek gerekmektedir. Bu risk faktörleri arasında; Chlamydia pneumonia gibi enfeksiyöz ajanlar, lipoprotein A, Herpes virüsü, homosistein, Anjiyotensin II (ATII) bağımlı oksidatif stres yer almaktadır. AT II, hem

inflamasyonu hem de oksidasyonu tetikleyerek hipertansiyon ve ateroskleroza sebep olabilmektedir. Obezite oranları her geçen gün tüm dünyada yükselmekte, insülin direnci, diyabet ve "metabolik sendrom" gibi hastalıklar, ateroskleroz için risk teşkil etmektedir. Adipoz doku sitokin ekspresyonunu artırarak insülin direnci oluşturabilir ve sistemik inflamasyonu tetikleyebilir. Metabolik sendromda bazı küçük ve yoğun lipid parçacıkları oksidasyonu tetikleyerek inflamasyonu artırabilir. Düşük HDL kolesterol ve yüksek trigliserid seviyeleri metabolik sendromda bir diğer endojen inflamatuardır ve ateroskleroza yatkınlığı artırabilir [72]. Sonuç olarak LDL'ye ek olarak farklı risk faktörleri de aterogenezi şiddetlendirebilmektedir.

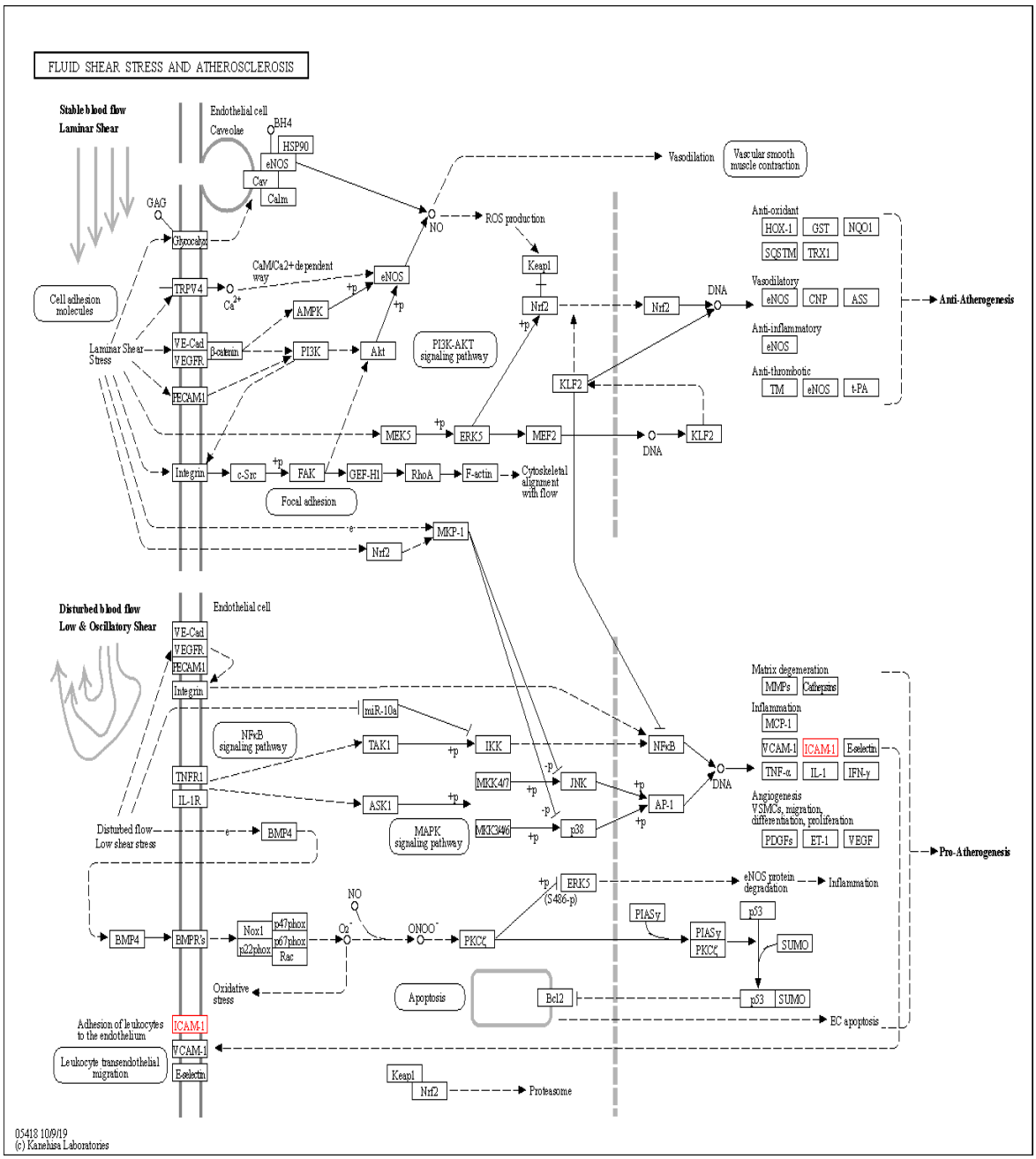
2.6. Ateroskleroz ve inflamatuar süreçte etkili medyatörler

Endotel hücreleri lökosit adezyon moleküllerini ve kemokinleri salgılayarak ateroskleroza katkıda bulunmaktadır. Selektinler; lökosit adezyonunu düzenlerler. Daha sonra kemokinler, lökositleri uyararak VCAM-1 ve ICAM-1'e sırasıyla α4 ve β2 integrin bağlanmasını artırır. VCAM-1 de ICAM-1 de yapısal ve fonksiyonel açıdan benzer özelliktedir. Her ikisi de lökositlerin integrinlerine bağlanan sitokinlerle uyarılabilen immünoglobulinlerdir. Fare ve tavşanlarda yapılan çalışmalarda ateroskleroz predispozisyonu bulunan aortik endotelyum bölgelerinde hem VCAM-1 hem de ICAM-1 salındığı ortaya konmuştur. Kolesterol yüksekliği bulunan hayvanlarda periferdeki köpük hücre yapılarından hem ICAM-1 hem de VCAM-1 salgılanmaktadır. Şekil 2'de inflamatuar süreçte rol oynayan medyatörlerin birbirleriyle etkileşimleri daha net irdelenmektedir.

2.6.1. ICAM-1

İnsanlarda ICAM-1 geni tarafından kodlanan bir protein olan ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1 / Hücrelerarası adezyon molekülü-1) ya da diğer ismiyle CD54 (Cluster of Differentiation 54), endotel hücreleri ve immün sistem hücreleri üzerinden salgılanan bir yüzey glikoproteinidir [73, 74]. ICAM-1, antikorlar ve T-hücre reseptörlerinin de dahil olduğu immünglobulin süperailesine aittir. Molekül ağırlığı, 80-114 kDa arasında olup bulunduğu hücre tipine göre değişmektedir. ICAM-1, CD11a/CD18 ya da CD11b/CD18 gibi integrinlere bağlanır ve rhinovirüsler için bağlanma bölgesi oluşturacak bir reseptör görevi görür. ICAM-1 endotel hücreleri ve

lökositler tarafından bazal seviyelerde salgılanır ancak TNF-α, IFN-γ, IL-1 ve LPS gibi inflamatuar uyaranlarla salınımı artış gösterir [75, 76, 77]. IL-4 ve glukokortikoidler ICAM-1 ekspresyonu üzerinde inhibitor etki gösterir [78, 79].



Şekil 2: Shear stres ve Ateroskleroz mekanizmalarında rol oynayan inflamatuar medyatörlerin birbirleriyle etkileşimi.

Görsel Referans: https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map05418&keyword=atherosclerosis

Erişim tarihi 13.05.2020

ICAM-1'in ana görevi, lökosit transmigrasyonu ve adezyonunu sağlamaktır. Diapedez olarak da bilinen lökositlerin migrasyonu dört adımda incelenir [80];

1. Yuvarlanma
2. Bağlanma
3. Adezyon
4. Transmigrasyon

Migrasyonun ilk adımı selektin ile düzenlenir. Bir hücreden uzanan selektinler, diğer hücrenin sialik asit içeren karbohidratı ile bağlanır. E ve P selektinler, endotel ve lökosit hücrelerinde bulunurlar. P-selektinler glikoprotein ligand - 1 üzerinde yer alan Sialy Lewis X ile ilişkili karbohidratlara zayıf bir biçimde bağlıdır. L selektin ise dolaşımdaki lökositlerde bulunur ve endotel üzerindeki CD-34, PSGL-1 ve Sialy Lewis X ile bağlıdır. Lökositlerin endotel hücrelerine gevşekçe bağlanması, bir yuvarlanma hareketinin meydana gelmesini sağlayarak CCL-2, CXCL-8, CCL-5 ve CCL-3 gibi kemokinlere sunumu kolaylaştırır. [81].

Migrasyonun ikinci basamağında kemokinler görevlidir. Yavaşça yuvarlanan lökositler kemokinlerce işlevini kaybeden endotel kısımlarına yönlendirilirler. Kemokinler, lökositlerin internal ve eksternal sinyal yolaklarını yöneterek integrinleri active eder. Lökosit yüzeyinde aktive olan integrinler inflamasyonlu alanda bulunan adezyon moleküllerine sıkıca bağlanırlar. Kuvvetli adezyon; ICAM-1'in LFA-1'e, VCAM-1'in VLA-4'e ve MADCAM-1'in α4β1'e bağlanması sonucu meydana gelir [82, 83, 84].

Lökositler endotele kuvvetli adezyon gerçekleştirdiğinde podozomlar oluştururlar böylece endotel yüzeyinin derinlerine inebilirler [85]. Bu bölgeler ICAM-1, VCAM-1 ve F-aktinden zengindir [86]. İntegrin bağlanması endotel sinyalizasyonunu başlatarak kasılmalara ve kurulmuş bağlantıların gevşemesine sebep olur. ICAM-1

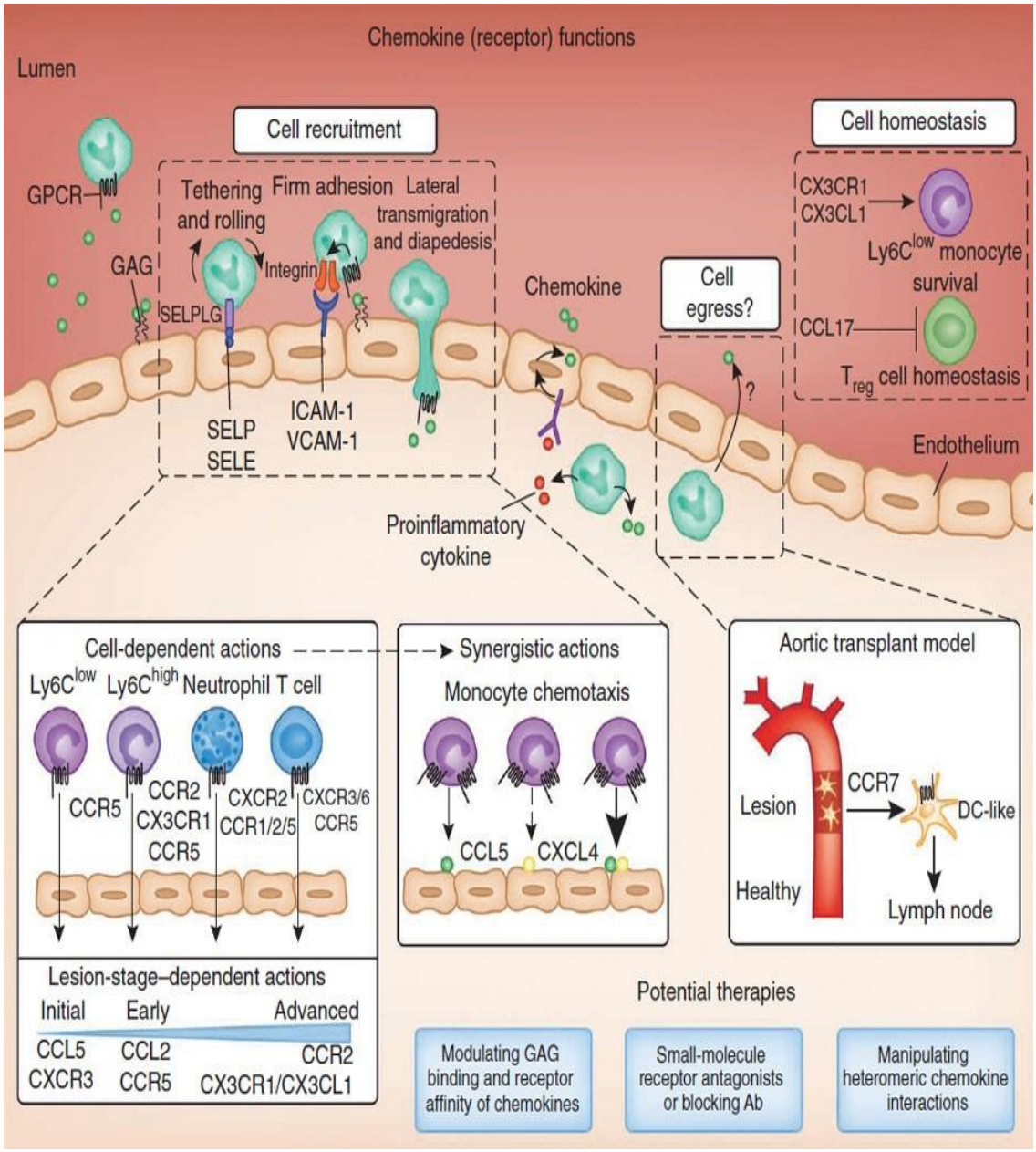
eksik hücrelerde yapılan çalışmalar, transmigrasyonun azalsa da tamamen kaybolmadığını göstermiştir. Bu durum son migrasyon basamağının şart olmadığını göstermektedir. Adezyon molekül bağlarının serbestleşmesiyle lökositler dokuların içine göç edebilir hale gelirler [87].

ICAM-1 bağlantı oluşumu, remodelling ve kararlı immünolojik komplekslerin oluşumu gibi immünolojik olaylarda da önemli rol alır. Bağlantı oluşumu sırasında antijen sunucu hücreler ve T hücreleri arasındaki yakın temas ICAM-1 ve LFA-1'in sayesinde gerçekleşir [88].

2.6.2. VCAM-1

VCAM-1 (Vasküler hücre adezyon molekülü-1 / CD106) hücre adezyon molekülü olarak görev yapan ve insanlarda VCAM-1 geni tarafından kodlanan bir proteindir. Genellikle endotel hücrelerinin sitokinlerle uyarımı sonrasında salınırlar. VCAM-1 lenfosit, monosit ve eozinofil gibi hücrelerden salınan α4β1 integrini ile bağ kurar. VCAM-1, α4β1 integrinin durumuna göre hem yuvarlanan hem de sabit tip adezyonu düzenleyebilir [89]. VCAM-1 normalde salınmaz ancak erken lezyonları kapsayan pro-aterosklerotik olaylarda salınımı hızla artış gösterir [90, 91]. Yapılan çalışmalarda, VCAM-1'in α4β1 salınımı gerçekleştiren hücrelerin adezyonunu düzenlediği ve shear stres altında bile bunu gerçekleştirebildiğini göstermiştir. Bir başka çalışmada α4β1 ve VCAM-1 etkileşiminin monosit migrasyonunu azalttığı ve VCAM-1'in monosit adezyonunu ve ateroskleroza yakın vasküler duvarda monosit adezyonunu artırdığı gösterilmiştir [92]. VCAM-1'in α4β1 ile olan ilişkisi sağlıklı bir koryoallontorik gelişim için gerekmektedir [93].

İnsanlarda LDL, ateroskleroz için önemli bir risk faktörüdür. VCAM-1'in aterosklerotik lezyon oluşumu dışında restenoz oluşumunda ve endotel hasarını takiben neointimal gelişimde de önemli bir rolü vardır. Tel ile oluşturulmuş hasar modelinde neointimal hücrelerde VCAM-1 salınımının overekspresyonu ve VCAM-1 antikorlarının neointimal gelişime karşı protektif olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, VCAM-1'in monosit infiltrasyonunu kolaylaştırarak ya da düz kas hücre proliferasyonunu artırarak neointima oluşumuna etkili olduğunu göstermektedir [94].

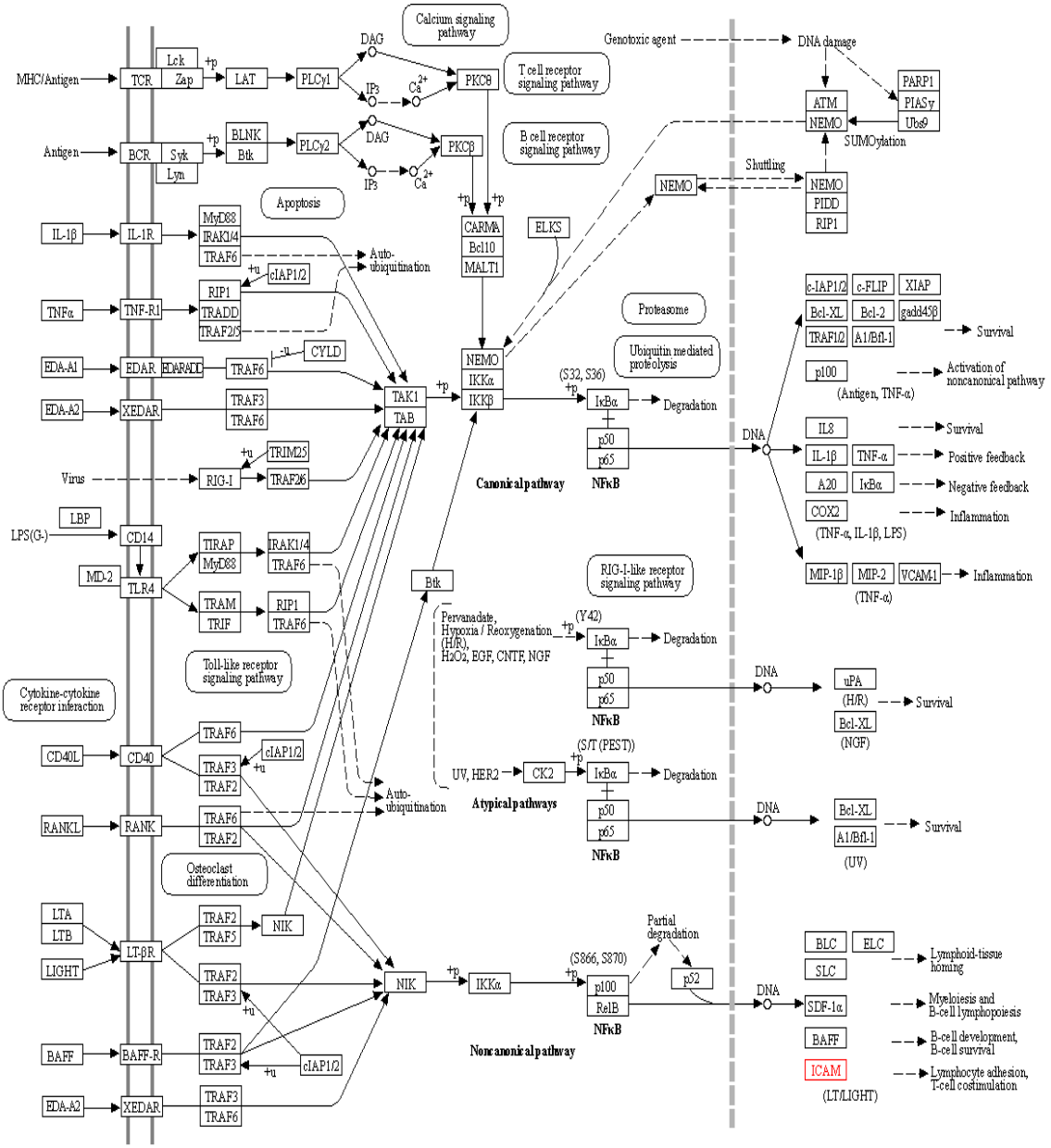


Şekil 3: Kemokin Reseptör Fonksiyonları

Görsel Referans: Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. Christian Weber & Heidi Noels Nature Medicine volume 17, pages1410–1422 (2011)

2.6.3. NF-κB

NF-κB, (Aktive B hücreleri Nükleer faktör kappa hafif zincir artırıcı) DNA transkripsiyonunu kontrol edebilen bir protein kompleksidir. NF-κB stres, UV, serbest radikaller, sitokinler, okside LDL ve antijenlere karşı hücresel immün yanıtlarda ve enfeksiyonlara karşı bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar [95-98].



Şekil 4: NF-κB sinyal yolağında etkili inflamatuar medyatörler.

Referans Erişim Tarihi 13.05.2020: https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04064&keyword=NF%20kappa

NF-κB'nin hatalı düzenlenmesi; kanser, inflamatuar ve otoimmün hastalıklar, sepsis, viral enfeksiyon ve hatalı immün gelişime sebep olabilir. Bunun yanında NF-κB sinaptik plastisite ve hafıza süreçlerinde, sitokin üretiminde ve sağkalım için de kilit rol oynayan bir proteindir [99-102].

NF-κB'nin tüm proteinleri, N-terminallerinde Rel homoloji bölgesi taşır. RelA, RelB ve c-Rel içeren alt aile, C-terminalinde transaktivasyon bölgesi içerir. NF-κB1 ve NF-κB2, p100-105 olmak üzere büyük prekürsörler olarak sentezlendikten sonra olgun

NF-κB p50 ve p52'yi meydana getirirler. p52, p100 den, p50 de p105'ten oluşturulur. [103-106].

NF-κB; inflamasyon başlangıcı ve düzenlenmesinde, doğal ve edinilmiş bağışıklık sisteminde, hücrelerin çoğalmasında görevli bir transkripsiyon faktörüdür. NF-κB ilk defa Ig hafif zincir geninde κB alanı olarak bilinen spesifik DNA bölgesine bağlanan bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanmıştır [107]. Bu transkripsiyon faktörünün, yalnızca B hücrelerin matürasyonu için önemli olduğu düşünüldüğünden NF-κB ismi verilmiştir. Sonrasında NF-κB'nin transkripsiyon faktörü görevi gören bir protein kompleksi olduğu anlaşılmıştır [108]. NF-κB, pleotropik ve latent sitoplazmik bir transkripsiyon faktör prototipidir [109].

NF-κB'nin standart ve standart olmayan olmak üzere iki adet sinyal yolağı bulunur. Standart IKK kompklesi IKK2 (IKKβ) proteininden oluşur ve NF-κB esansiyel modulator protein (NEMO ya da IKKγ olarak da bilinir) tarafından düzenlenir. Standart NF-κB yolu IKK kompleksini içeren IKK2'yi indüklemek için bir çok inflamatuar uyaranca tetiklenir. Standart olmayan yol, IKK1 tarafından düzenlenir ve RelB dimerlerini nükleusa salmak için p52 /p100 dimer oluşum sürecini indükler. Hem standart, hem standart olmayan yollar, immün sistem fonksiyonunda önemli rol oynarlar ancak rolleri farklılık gösterir. Standart yol, proliferasyonu ve apopitozisi kontrol ederken inflamasyonu da düzenler. Standart olmayan yol ise lenfoid organların gelişiminde rol alır. Standart yol, dakikalar içinde hızlı etki gösterir ve negatif geribildirim mekanizmasına sahip olduğundan reversibldır. Standart olmayan yol ise saatlerce ya da günlerce süren yavaş bir yolaktır [110].

Standart NF-κB yolağında, patojen temelli lipopolisakkaritler (LPS), TNF-α, IL-1 benzeri sitokinler gibi proinflamatuar uyaranlar ile çoğu hücre tipinde NF-κB aktivitesi uyarılır [111]. Standart NF-κB'nin başlangıcı hızlıdır ve de novo protein sentezine ihtiyaç duymaz. Nükleer NF-κB aktivitesindeki artış, dakikalar içinde gözlemlenir ve yanıt promotörleri hemen uyarılır. IKBα negatif feedback mekanizmasını yöneterek uyaranları yok etmede NF-κB'yi baskılamaktan sorumludur. IKBα'nın neden olduğu negatif feedback, IKBε tarafından kontrol edilen bir diğer negatif feedback mekanizması sayesinde engellenir [112,113].

Standart olmayan NF-κB yolağı ise, farklı birçok hücre tipinde noninflamatuar uyaranların sinyal mekanizmaları ile ilişkilendirilmiştir. Standart olmayan NF-κB

standart yolağa göre daha geç aktive olur. Bununla birlikte, standart olmayan yolağın negatif feedback mekanizması da standart yolağa göre daha zayıftır [110].

Aterom plaklarında, TNF-α ve IL -1 gibi birçok sitokinin NF-κB'yı aktive ettiği gösterilmiştir [114, 115]. NF-κB'nin artmış aktivasyonu ya da NF-κB'ye bağlı olarak artmış TNF-α ya da IL-1'den oluşan kısır döngü, otokrin mekanizmalarca da tetiklenebilir [116]. Fibronektin gibi diğer aterogenez faktörleri de NF-κB'yi aktive edebilir [117].

Düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) de NF-κB aktivasyonunu modüle eder. Ayrıca serbest oksijen radikalleri ile oluşan oksidatif stres de NF-κB'yi stimule eder ve bazı antioksidanlar da NF-κB'yi inhibe eder [118,119,120].

Endotel hücrelerindeki NF-κB aktivasyonu, erken evre aterosklerozda önemli rol oynamaktadır. ICAM-1, VCAM-1 ve ELAM-1 gibi adezyon moleküllerinin NF-κB ile regüle edildiği farklı çalışmalarca ortaya konmuştur [112,121]. Aktif NF-κB, endotelyal hücrelerden lökositlerin lezyonlara saldırmasını sağlayan kemotaktik substrat MCP-1 gibi substratların üretimini de düzenlemektedir [121]. NO, NF-κB aktivasyonunu ve NF-κB hedef gen CSF aktivasyonunu engelleyerek anti-aterojenik özellikler de göstermektedir [120].

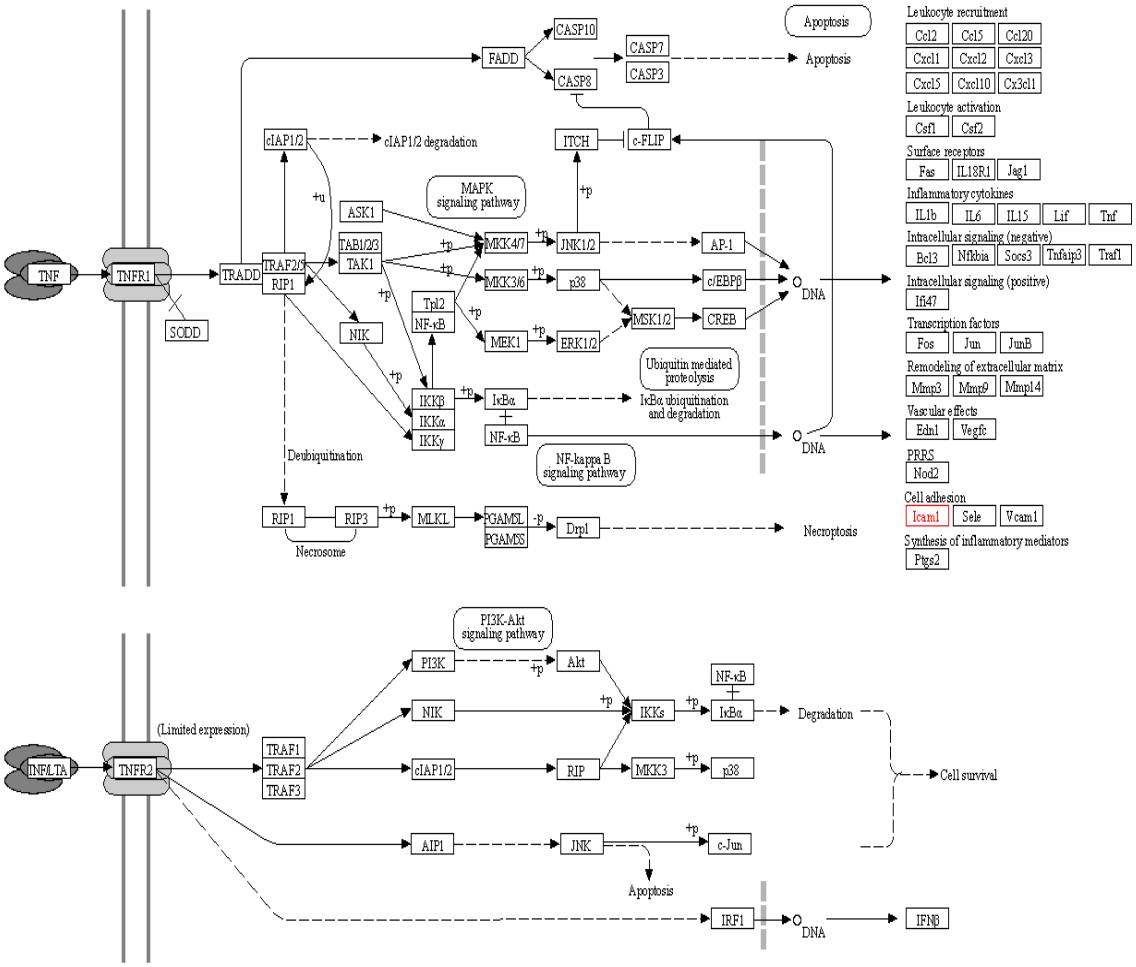
2.6.4. TNF-α

TNF-α, nonglikolize bir transmembran protein olup, proinflamatuar sitokinler arasında en erken salınan ve en güçlü yanıt oluşturan mediatördür. Iki formu bulunur, bunlar: Aktive makrofajlardan salınan TNF-α (Kaşeksin) ve aktive T hücrelerinden salınan TNF-β (Lenfotoksin)' dır. TNF-α geni, insanda 6. kromozomun kısa kolu üzerinde bulunur. TNF-α 17 kilodalton (kDa) ağırlığında olup 157 aminoasit içerir ve yarılanma ömrü 14-18 dakikadır. Cilt, gastrointestinal sistem ve böbreklerde metabolize olur [122].

TNF-α'nın pek çok farklı görevi vardır. Bunlardan bazıları [122];

1. Nötrofillerin kemik iliğinden salınması
2. Nötrofil migrasyonununda görev alan adezyon moleküllerinin ekspresyonu
3. Transendotelyal nötrofillerin göçünün kontrolü

4. Süperoksit üretimi ve lizozimlerin ekspresyonu
5. Pıhtılaşma ve kompleman kaskadının aktivasyonu
6. Akut faz proteinlerinin sentezlenmesi
7. Trombomodulin inhibisyonu



Şekil 5: TNF-α Sinyal yolağında etkili medyatörler ve ilişkileri

Görsel Referans Erişim tarihi 13.05.2020: https://www.kegg.jp/kegg-bin/highlight_pathway?scale=1.0&map=map04668&keyword=Tnf

2.6.5. İnterlökin -6 (IL-6)

B hücre stimülan faktörü ya da B hücre farklılaştırıcı faktörü olarak da adlandırılan IL-6 temelde T lenfositlerden eksprese edilen ve B lenfositlerin farklılaşmasını sağlayan 26 kD ağırlığında bir sitokin molekülüdür. IL -6 monositler,

fibroblastlar, endotel hücreleri, B lenfositler, astrositler, mezengial hücreler gibi hücreler tarafından da eksprese edilebilmektedir.

IL-6'nın organizmadaki en önemli görevi B lenfositlerde proliferasyonu uyarmadan diferansiyasyonu ve antikor salınımını uyarmasıdır. Bunun yanında kemik iliğindeki prekürsör hücreleri de uyararak nötrofil ve makrofaj oluşumunu da tetikler. T lenfositlerin stimulasyonunda da yardımcı bir sitokin olarak görev alır. Plazmositoma ve miyeloma gibi birçok malign plazma hücresi için IL-6 bir büyüme faktörü gibi davranır; plazmositoma hücrelerinin çoğu otokrin büyüme faktörü olarak IL-6 eksprese eder. Tıpkı IL-1 gibi IL-6'da fibrinojen gibi akut faz yanıtına katılan çeşitli plazma proteinlerinin hepatositler tarafından sentezlenmesini uyarır. Aynı zamanda nöral hücrelerin diferansiyasyonundan da IL-6 sorumludur. Gram negatif bakterilerle gelişen enfeksiyonlar ya da TNF-α infüzyonu sonrası dolaşımda saptanabilen IL-6, LPS'den çok TNF-α veya IL-1'e bir cevap olarak eksprese edilir [123].

2.6.6. İnterlökin -8 (IL-8)

Nötrofil kemotaktik faktör olarak da isimlendirilen IL-8 etkisini özellikle nötrofiller üzerinde gösteren yaklaşık 8-10 kD ağırlığında bir sitokin molekülüdür. LPS, TNF-α veya IL-1 gibi sitokinler ile uyarılmış mononükleer fagositler, endotel ya da epitel hücreleri ve fibroblastlar tarafından eksprese edilirler. IL-8 özellikle nötrofiller ve daha az oranda da eozinofil, bazofil, lenfosit gibi hücreler için stimülan ve kemotaktik bir moleküldür. IL-8'in deneysel olarak doku içine enjeksiyonu, inflamatuar yanıt meydana getirir. TNF-α ve IL-1'in başlattığı nötrofil aktivasyonunun çok büyük oranda bu moleküllerce stimüle edilen IL-8 ve ilişkili proteinlerin ekspresyonuna bağlı olduğu ortaya konmuştur. Bu sebeple IL-8 inflamasyonun en önemli sekonder medyatörü olarak gösterilmektedir [124].

2.7. Flavinoidler

Biyolojik sistemlerdeki aerobik metabolizma bazal koşullarda bile prooksidanlar olarak bilinen reaktif oksijen ürünlerini (ROS) oluşturur. DNA, lipidler, proteinler gibi moleküllerin prooksidan hasarlara direnebilmesi için endojen ve eksojen antioksidanlara

ihtiyaç duyulmaktadır. Vücutta aşırı miktarda prooksidan molekül birikimi meydana gelirse oksidatif hasar oluşur ve bu durum kanser, kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalığın temelini oluşturur. Antioksidanlar organizmadaki bu reaktif oksijen radikallerini (ROS) temizleyerek ya da ROS oluşumuna engel olarak etki gösterirler. Eksojen kaynaklı antioksidanların çoğu yaygın olarak yediğimiz gıdalarda bulunurlar.

Sarı renkli olmaları nedeniyle latince sarı manasına gelen "flavus" kelimesinden türetilerek flavinoid ismini almışlardır. 15 karbonlu difenilbenzopiron yapısına sahiptirler ve bu yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak isimlendirilirler. İskelet yapılarına göre flavon, flavonol, flavonon, biflavinoid, kalkon gibi türlere ayrılırlar.

Flavinoidler, çoğunlukla bitkisel besinlerde bulunurlar ve bitkilerin sekonder metabolitlerindendirler. Bitkilerin hayati ihtiyaçları için kullandıkları karbonhidratlar, aminoasitler gibi primer metabolitlerinden oluşurlar. Fenil Benzopiron yapısı, A, B ve C halkaları olmak üzere 3 halkadan oluşur. A halkası glikoz metabolizmasından türeyen asetil koenzim A'nın metabolizasyonu sonucu ortaya çıkan malonil koenzim A'nın 3. Molekülünün kondensasyonuyla, B ve C halkaları ise glukoz metabolizmasında yer alan şikimik asitten türeyen sinnamik asit gibi fenil propanoid bileşiklerden oluşur. Çeşitli karbon atomlarına hidroksil, metil ya da sülfat gibi farklı grupların bağlanmasıyla değişik flavinoid türevleri meydana gelmektedir.

Tablo 1'de iskelet yapılarına göre Flavinoid sınıflandırması daha detaylı incelenebilir.

Tablo 1: Farklı iskelet yapılarına göre flavinoidler.

FLAVONLER	FLAVONOLLER	FLAVANONLAR

Chrysin	Quercetin	Naringenin
Apigenin	Rutin	Eriodiktol
Luteolin	Kaempferol	Hesperidin
	Rhamnetin	
FLAVANOLLER	**DİHİDROFLAVONOLLER**	**BİFLAVONOİDLER**
Catechin	Taksifolin	Amentoflavon
Epicatechin	Slibin	

Flavinoidlerin sayılarının 4000'den fazla olduğu tahmin edilmekte olup elma, soğan, baklagiller, hububat, domates, turunçgiller, çay, kırmızı şarap gibi besinlerde bolca bulunurlar. Normal bir diyet ile günlük ortalama 1 gr kadar flavinoid tüketildiği tahmin edilmektedir.

Flavinoidler farklı mekanizmalarla etki gösterebilirler. Bunlardan birkaçı:

1. Süperoksit ve hidroksil radikallerini temizlemek
2. Peroksit ve alkoksil radikallerinin peroksidil zincirlerini kırmak
3. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe etmek
4. Demir ve bakır gibi metalleri şelatlayarak etkisiz hale getirmek
5. Kalsiyum modülasyonuyla görev yapan kalmodulini inhibe etmek
6. Protein Kinaz inhibisyonu yapmak
7. Laktat transportunu inhibe etmek

Flavinoidlerin canlılar üzerindeki etkileri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Antitümör etki: interselüler etkileşimi artırıp ornitin dekarboksilazı inhibe ederek antiproliferatif etki göstererek, laktat transportu ve kalmodulin inhibisyonu ile vasküler NO sentezini regüle ederek gerçekleştirir.

2. Antiviral etki: Viral proteinlere bağlanarak protein sentez inhibisyonu gerçekleştirir

3. Antiinflamatuar etki: Mast hücrelerde histamin salınımını ve lökotrien sentez inhibisyonu yaparak gerçekleştirir.

4. Antitrombotik etki: Platelet cAMP konsantrasyonunu artırarak, platelet agregasyon inhibisyonu yaparak ve eikosanoid metabolizmasını pek çok yerinden inhibe ederek gerçekleştirir.

5. Antihistaminik etki: Mast hücrelerden histamin salınımını inhibe eder.

6. Antiaterojenik ve kardiyoprotektif etki: Serbest radikalleri yakalayarak COX ve LOX enzimlerini inhibe edip lipid peroksidasyonunu önleyerek aterom plağının gelişimini önlerler. Antitrombotik etki ile de kardiyoprotektif özellik gösterirler.

7. Vazodilatatör etki: NO sentezini düzenleyerek gerçekleştirir.

8. İmmünstimulan etki: Makrofajların fagositoz etkisini, mast hücre aktivasyonu ve nötrofillerin oksidan molekülleri salgılamasını baskılayarak gerçekleştirir. Yüksek konsantrasyonda immünstimulan, düşük konsantrasyonlarda ise immünsupresan etki gösterirler [125]

2.8. Amentoflavon

Amentoflavon (C30H18O10) kimyasal olarak 8-[5-(5,7-dihydroxy- 4-oxo-4H-chromen-2-yl)-2-hydroxyphenyl]-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-one olarak ifade edilen ve bitkilerde sıkça bulunan bir bioflavinoiddir. Aynı zamanda C30 – C80 kovalent bağı ile bağlı bir apigenin dimeridir. Bu bileşik, ilk olarak Okigava ve arkadaşları tarafından 1971'de Selaginella türünden üç farklı bitkide izole edilmiştir. Bunlar; Selaginella tamariscina (Beauv.) Spring, Selaginella nipponica ve Selaginella pachystachysdir [126]. Sonrasında bu bioflavinoid 120'den fazla bitkide daha izole edilmiştir ve bu bitkilerin bir kısmı binlerce yıldır dünyanın farklı yerlerinde geleneksel tıp uygulamalarında kullanılmaktadır. Modern farmakolojinin gelişimi ile amentoflavonun bir çok farklı bioaktivitesi olduğu ispatlanmıştır. Bunlardan bazıları; antioksidan [127], antiinflamatuar [128], antisenesens [129], antitümor [130], antivirüs [131], ve antifungal [132] etkilerdir. Bunun yanında santral sinir sistemi [133] ve

kardiyovasküler sistem [134] üzerinde tedavi edici etkileri de bulunmaktadır. Doğası sayesinde sahip olduğu geniş bioaktivite sebebiyle amentoflavon, birçok farklı çalışma alanında dikkat çeken bir molekül haline gelmiştir. Bizim çalışmamızda amentoflavonun atetosklerotik süreçlerdeki etkisi araştırılmıştır.

2.8.1. Amentoflavon kaynakları

Polifenolik bir bileşik olan amentoflavon çok sayıda bitkide bulunmaktadır. Bilindiği kadarıyla bu bitkilerin çoğu Calophyllaceae, Clusiaceae, Cupressaceae, Euphorbiaceae, and Selaginellaceae ailelerine ve Calophyllum, Garcinia, and Selaginella türlerine mensuptur. Bu bitkilerin bir kısmı geleneksel tıp tedavilerinde tüm dünyada kullanılmaktadır. Gingko biloba, Lobelia chinensis, Polygala sibirica, Ranunculus ternatus, Selaginella pulvinata, Selagenella tamariscina bitkileri geleneksel Çin tıbbında, Calophyllum inophyllum, Selaginella bryopteris geleneksel Hint tıbbında, Byrsonima intermedia geleneksel Amerikan tıbbında, Cnestis ferruginea ve Drypetes gerrardii ise geleneksel Afrika tıbbında kullanılmaktadır.

2.8.2. Amentoflavonun antiinflamatuar ve antioksidan Etkileri

Oksidatif stres yanıtı inflamatuar cevabın bir parçasıdır. Garcinia brasiliensis'ten izole edilen amentoflavonun süperoksit anyonlarının gelişimini inhibe ettiği ve total reaktif oksijen radikali üretimini azalttığı ortaya konulmuştur. 2,20-azobis (2-amidinopropane) hydrochloride ile indüklenen insan eritrositlerinde oksidatif hemolizi ve lipid peroksidasyonunu da inhibe ettiği gösterilmiştir [127]. Sıçan astrositoma hücre hattında, lipopolisakkaridler, NO, ROS, MDA seviyelerini artırabilir ve glutatyon seviyelerini düşürebilir. Bunun yanında insan monositik lösemi hücre hattında lipopolisakkaridler ile TNF-α seviyeleri yükselmektedir. Tüm bu etkiler amentoflavon ile azaltılabilmiştir [135]. LPS ile indüklenen RAW 264.7 hücrelerinde amentoflavonun nitrik oksit, prostoglandin E2 üretimini baskıladığı ve C-fos'un nükleer translokasyonunu baskıladığı görülmüştür. Buna ek olarak ERK yolağını da inhibe etmektedir [136]. İnsan periferik kan örneklerinin süpernatantında IL-1, IL-6, TNF-α, ve PGE2 oluşumunu da inhibe etmektedir.

2.8.3. Amentoflavonun Kardiyovasküler sistem üzerine etkileri

Amentoflavonun sıçanların torasik aort kan dmarları üzerinde vazodilatör etkilerinin olduğu in vitro olarak ortaya konulmuş ve bunun nitrik oksit ile ilgili ve endotel bağımlı olduğu gösterilmiştir [137]. Aynı zamanda amentoflavonun vasküler endotelyal hücrelerde koruyucu etkisi bulunmaktadır. Amentoflavon ile tedavi edilen S fazındaki HUVEC hücrelerinin yaşayabilirliği artmıştır [138]. Hücre çalışmalarında alınan bazı sonuçlar amentoflavonun nitrik oksit seviyelerini artırıp VCAM-1, E-selektin, IL-6, IL-8, ve ET-1, seviyelerini düşürerek süperoksit dismutaz aktivitesini artırdığını, MDA düzeylerini azalttığını ve VCAM-1, E-selektin, ve NF-κB p65 in protein ekspresyonlarını downregüle ederek vasküler endotel hücreleri koruduğu gösterilmiştir [139]. İzole sıçan kalbinde 10-50 mg dozlarında amentoflavon uygulamasının kalp atım hızını belirgin oranda artırdığı ortaya konulmuştur [140].

2.8.4. Amentoflavonun Antitümör etkileri

Amentoflavonun IC50 (20.7 mikromolar) konsantrasyonlarında servikal adenokarsinom (HeLa) hücreleri üzerinde iyi bir sitotoksik etki yaptığı gösterilmiştir [141].

Meme kanseri MCF-7 hücreleri amentoflavon ile tedavi edildikten sonra, bazı hücresel değişiklikler gözlemlenmiştir. DNA ve nükleer parçalanma ve kalsiyum metabolizmasında downregülasyon meydana gelmiş ek olarak, kaspaz 3'ün aktivasyonu, mitokondriyal iç zar potansiyelinin azaltılması ve sitokrom c'nin mitokondriden salınması gibi mitokondri aracılı apopitozisin bazı işaretleri gözlemlenmiştir [142].

Amentoflavon ayrıca C57BL / 6 farelerinde gelişen B16F-10 melanomunun neden olduğu solid tümör gelişimini önemli ölçüde inhibe etmektedir. Mekanizma G0 / G1'den S fazına geçişi inhibe etmekle ve hücre döngüsü ve apopitoziste rol oynayan genleri düzenleyen, P21, P27, Bax, kaspaz-9 vb. genleri regüle etmekle ilgili olabilir [143].

2.8.5. Amentoflavonun Antisenesens etkileri

Ultraviyole B (UVB) ışınlamasının Lamin A ve fosfo-H2AX seviyelerini artırdığı ortaya konmuştur. Normal insan fibroblastlarında bu proteinler az iken yaşlı bireylerde veya erken yaşlananlarda yüksektir. Amentoflavonun bu zararları düzeltebildiğini gösteren ve UVB ile ilişkili cilt yaşlanma süreçlerini yavaşlattığını

gösteren çalışmalar mevcuttur [144]. UVB ile indüklenen normal insan fibroblastlarında yapılan başka bir çalışmada araştırmacılar amentoflavonun ERK protein seviyeleri, p38 ve JNK aktivasyonunu etkilemeden ERK aktivasyonunu inhibe edebileceğini bulmuşlardır. Bu bulgular, amentoflavonun cildin foto yaşlanmasını önleme veya tedavi etme potansiyeli olduğunu ortaya koymaktadır [145].

2.8.6. Amentoflavonun Antidiyabetik etkileri

Amentoflavonun glikoz metabolizma bozukluğunu iyileştirdiği, insülin sekresyonunu düzenlediği ve streptozotosin ile indüklenen diyabetik farelerde pankreasın eski haline getirilmesini sağladığı ortaya konulmuştur [146].

2.8.7. Amentoflavonun Antiviral etkileri

Amentoflavon, Dang virüsü NS5 RNA'ya bağımlı RNA polimerazı inhibe ederek antiviral etkinlik göstermektedir [147]. Torreya nucifera'dan izole edilen on iki bileşen arasında amentoflavonun IC50 değeri olan 8.3 mikromolar düzeyinde koronavirüse (SARS-CoA) bağlı şiddetli akut solunum yetmezliği sendromunu inhibe etmekte en aktif bileşik olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, amentoflavon insan immün yetmezliği vakalarında (HIV) 119 mikromolar değerinde ve Respiratuar sinsityal virüsü (RSV) üzerinde 5.5 g / mL IC50 değeri ile iyi performans göstermiştir [148, 149]

2.8.8. Amentoflavonun Antifungal etkileri

Amentoflavonun Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae ve Trichosporon beigelii gibi çeşitli patojenik mantarlara karşı antifungal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Candida albicans'ta, hücre içi trehaloz birikimini uyarabilir ve dimorfik geçişi bozabilir [150]. Amentoflavonun antifungal etkilerinin mitokondriyal disfonksiyon ile ilişkili apopitotik hücre ölümüne bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, amentoflavon ile indüklenen hidroksil radikalleri apoiptoziste önemli bir rol oynayabilir [151].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda kullanılan HUVEC hücreleri, protokole uygun biçimde çözülüp ekimleri yapıldı. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen; hücrelerin ekimi, TNF-α ile uyarımı, amentoflavon uygulanması, endotelyal hücrelerden mRNA izolasyonları, cDNA sentezleri, RT-PCR reaksiyonarı ve ELISA ile protein düzey belirleme işlemleri Atlas Biyoteknoloji / Ankara'da gerçekleştirilmiştir (Şubat 2019 – Eylül 2019).

3.1. Umbilikal Ven Endotel Hücre Kültür ve MTT Deney Hazırlıkları

3.1.1. Hücrelerin Açılması ve Ekilmesi

Hücre kültürü çalışması, laminar akım altında steril koşullarda gerçekleştirildi. Sıvı azot içinde gelen hücreler, aşağıdaki çözdürme protokolüne uygun olarak çözdürüldü.

1. Hücrelerin bulunduğu kriyo tüp, 37°C'lik su banyosunda 1 dakika tutularak çözünmesi sağlandı.
2. İçindeki hücreler çözülen kriyo tüp, %70 etanol içeren beherin içine konuldu ve laminar akımlı kabine yerleştirildi.
3. Kriyo tüp, etanolün tüp içine girmesi engellenecek şekilde açıldı.
4. Tüpün içindeki hücre süspansiyonu, falkon tüp içine aktarıldı ve ardından üzerine 37°C'lik sıcaklıktaki 6 ml medyum eklendi.
5. 2 ml medyum ile kriyo tüp temizlendi ve falkona aktarıldı.
6. 1200 rpm'de 5 dk santrifüj yapılarak hücrelerin çökmesi sağlandı
7. Üst sıvı uzaklaştırılarak pellet kısmında çöken hücreler mikropipet yardımı ile toplandı.
8. Peletin üzerine 5ml medyum eklenerek dikkatlice pipetaj yapıldı.

9. Hücre süspansiyonu, 1200rpm de 5 dk santrifüj edildi.
10. Süpernatantı uzaklaştırıldı.
11. Hücre sayımı yapıldı (T25 flask 3-5x10^4 hücre)
12. Hesaplanan hücre miktarı, tip I kolajen ile kaplı halde satın alınan flaskın, hücrelerin yapışacağı kısımına bırakıldı.
13. Flask dik konuma getirildi ve 5 ml hacminde besiyeri eklendi
14. Yatay konuma getirilen flask, hafif karıştırıldıktan sonra mikroskopta hücrelerin homojen dağıldıkları kontrol edilerek 37°C'lik %5 lik CO_2 inkübatörüne konuldu

3.1.2. Besiyerinin hazırlanması

1. Serum inaktivasyonu için FBS (fetal bovine serum) 55ºC su banyosunda 30 dakika inkübe edildi.
2. Besiyeri ve Penisilin/Streptomisin karışımı, 37 ºC de 15 dakika inkübe edildi.
3. Serumun total hacme oranı %10 olarak ayarlandı. 50ml FBS besiyerine eklendi.
4. %1 Pen/Strep olacak şekilde yaklaşık 6 ml antibiyotik besiyerine aktarıldı.
5. %1 lik oranda L-glutamin eklendi.
6. Besiyeri homojen bir şekilde karıştırıldı ve kullanıma hazır hale getirildi.

3.1.3. Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler konfluent duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında fiziksel yer kısıtlılığından dolayı kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Bu nedenle hücrelerin pasajlanmaları gerekir.

1. Komplet hücre kültür ortamı, FBS ve %25 tripsin-edta su banyosunda 37°C'ye ısıtıldı.
2. Hücreler CO_2 inkübatöründen alındı ve mikroskopta incelendi.
3. Flask dik konuma getirildi ve hücre tabakasının olduğu yüzeye pipet değdirilmeden ortam yavaşça çekildi.
4. Hücre tabakasına pipet değdirilmeden flask alt köşesine 6ml FBS eklendi, yüzey yıkandı ve FBS yavaşça çekildi.
5. Ortama %25 tripsin-EDTA eklendi ve flask 2 dakika süresince CO_2 inkübatöründe tutuldu.
6. Mikroskopta hücrelerin flask tabanından serbestleşip serbestleşmediği kontrol edildi.
7. Serbestleşmeyen hücreler için, flask tabanına birkaç kez fiziksel vurma hareketi uygulandı.
8. Hücrelerin serbestleşmesinin ardından ise flaska komplet ortam eklendi (eklenen tripsinin 3 katı hacimde) ve santrifüj tüpüne aktarıldı.
9. Hücreler 1200 rpm de 5dk santrifüj edildi.
10. Supernatant, tüpün tabanında 1 mL kadar sıvı da bırakılacak şekilde uzaklaştırıldı.
11. Hücre pelletini çözmek için tüpün dibine birkaç defa hafifçe vuruldu.
12. Tüpe 5ml taze medyum eklenerek pipetaj yapıldı.
13. 1200 rpm de 5 dk santrifüj yapıldı.
14. Süpernatant uzaklaştırıldı.
15. Hücrenin yoğunluğuna göre besiyeri eklenerek seyreltildi.
16. Hücre sayımı yapıldı
17. Flask üzerine hücre hattı ismi, pasaj numarası, pasaj tarihi yazıldı.
18. Her cm^2'ye 6.000 hücre gelecek şekilde hücrelerin ekimi yapıldı
19. Hücreler mikroskopta incelendi.

20. Flask 37°C'lik %5 lik CO_2 inkübatörüne yerleştirildi.

3.1.4. Canlı Hücrelerin Mikroskopta Sayılması

İncelenecek hücreler tripan mavisi ile boyandı. Bu boya, canlı hücreler tarafından dışarı atılırken ölü hücreleri koyu mavi renge boyar. Hücreler, toma lamı üzerine alınarak sayımları yapıldı.

1. Lamel, toma lamının tam ortasına gelecek şekilde yerleştirildi.
2. 20µl hücre, 20µl tripan mavisi ile birlikte mikrofüj tüpüne konuldu. Tüpe hafifçe vurularak karışmaları sağlandı.
3. Hazırlanan hücre/tripan mavisi karışımı otomatik pipet ile çekildi. 20µl'si, otomatik pipetin ucundaki damla kılcal hareketle lamele emdirilerek toma lamının her kenarına yayıldı.
4. Toma lamı, hemen mikroskoba yerleştirildi ve düşük güçte toma lamının çizgileri gözlendi. Sadece bir $1mm^2$ içindeki hücreler sayıldı.
5. $1mm^2$ içindeki 25 karenin içindeki hücreler sayıldı ve hücrelerin ne kadar seyreltilmesi gerektiği hesaplandı.
6. 4 farklı 1mm'lik kare sayıldıktan sonra toplam hücre sayısı dörde bölünerek ortalama değer alındı.
7. Böylelikle ml başına düşen hücre sayısı hesaplandı. 1 ml'ye düşen ortalama hücre sayısı x 10.000X dilüsyon oranı = Orijinal örnekte 1ml'ye düşen hücre sayısı
8. Orijinal kültürdeki canlı hücrelerin yüzdesi hesaplandı. 4 tane 1mm alandaki canlı hücre sayısı canlı olmayan hücre sayısına bölünür ve 100 ile çarpılır.

3.2. MTT Deney protokolü

Metabolik aktivitenin ölçümüne dayalı hücre proliferasyon testlerinde yaygın olarak Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) gibi tetrazolyum tuzları kullanılmaktadır. Çalışma prensibi, temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı) kullanarak formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır [163].

MTT protokolü, kit (MTT Cell Viability Kit, Biotium INC. Kat. No. 30006) yardımı ile uygulandı.

1. 96-well kültür platelerine hücreler ekildi. Genellikle, her bir kuyuya ekilecek olan hücre yoğunluğu 5.000-8.000 aralığında idi. Böylece hücreler 48-72 saatte ideal yoğunluğa ulaşabildi.
2. Kültürde ilgili kuyucuklara 10 ng/ml TNF-α ve 20 mikromolar amentoflavon uygulaması yapıldı. Her bir kuyudaki kültür medyum hacmi 100 µl olarak belirlendi.
3. Her bir kuyudaki 100 µl medyum üzerine 10 µl MTT solüsyonu eklendi. Orbital shaker kullanılarak platedeki medyumun MTT solüsyonu ile karışması sağlandı.
4. Plate, 37°C'de 4 saat boyunca inkübe edildi.
5. İnkübasyon sonrası 200 µl DMSO mediumun içine eklendi ve pipetleme işlemiyle formazan tuzunun çözülmesi sağlandı. Kuyudaki son hacim 300 µl olarak belirlendi
6. Spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okuması yapılarak sinyal absorbans değeri elde edildi. Background absorbans için 630 nm dalga boyu kullanıldı. Sinyal absorbans değerinden background absorbans değeri çıkarılarak normalize edilmiş absorbans değerine ulaşıldı.

3.2.1. Amentaflavon ve TNF-α Çözeltilerinin Hazırlanması

Amentaflavon 500, 100, 20 ve 4 mikromolar yoğunlukta olacak şekilde DMEM içinde çözündürüldü.

50 mg TNF-α 1ml FBS ile çözüldü. Böylelikle, 50000 ng/mL olacak biçimde ana stok hazırlanmış oldu. Sonrasında ise, TNF-α uygulanan gruplara 160, 40, 10 ve 2.5 ng/mL olacak biçimde eklendi.

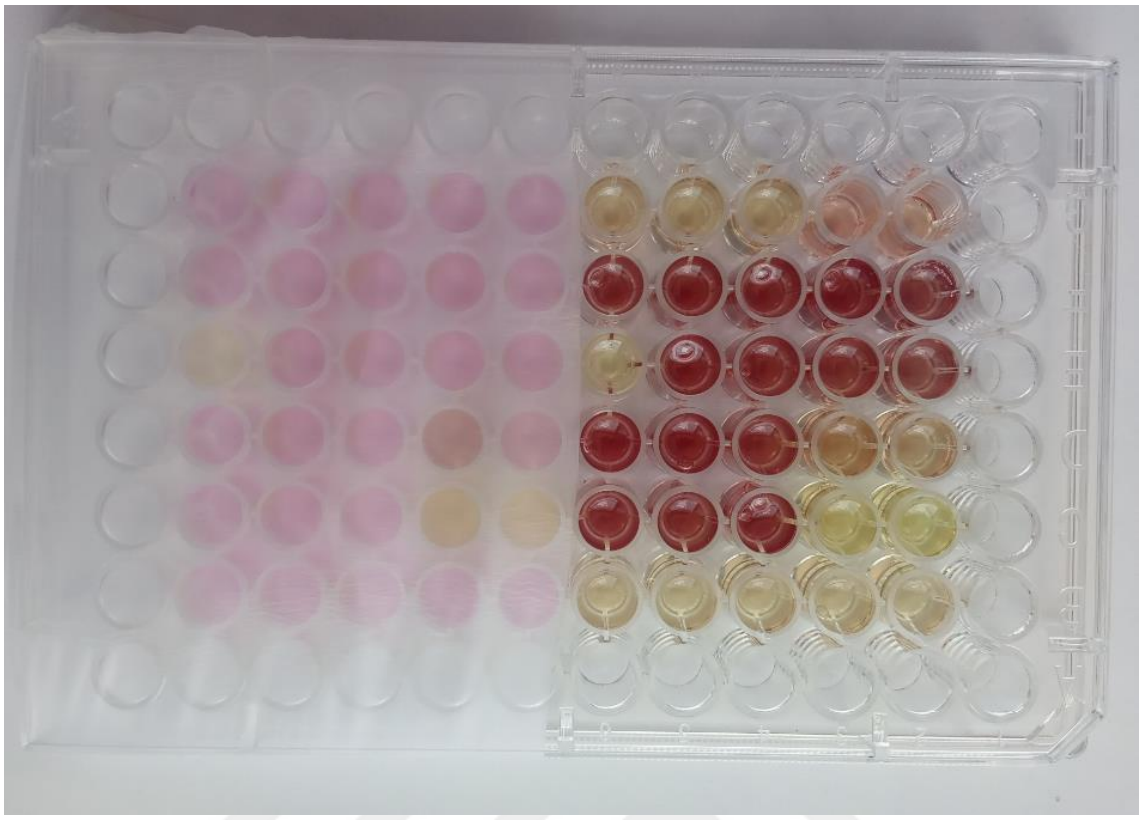
Tablo 2: Amentoflavon ve TNF-α Çözelti hazırlama hesaplamaları

AMF SULANDIRMA HESAPLANMASI				
Stok AMF µM	Alınacak Hacim µl		İstenen Konsantrasyon µM	İstenen Hacim µl
1000	X	=	63	5000
	X	=	63*5000/1000	
	X	=	315 ul STOK AMF üzerine 4685 µl Medyum eklendi.	
TNF-α SULANDIRMA HESAPLANMASI				
Stok TNF-α ng/ml	Alınacak Hacim µl		İstenen Konsantrasyon ng/ml	İstenen Hacim µl
50000	X	=	20	5000
	X	=	20*5000/1000	
	X	=	100 ul Stok TNF-α üzerine 4900 µl Medium eklendi.	

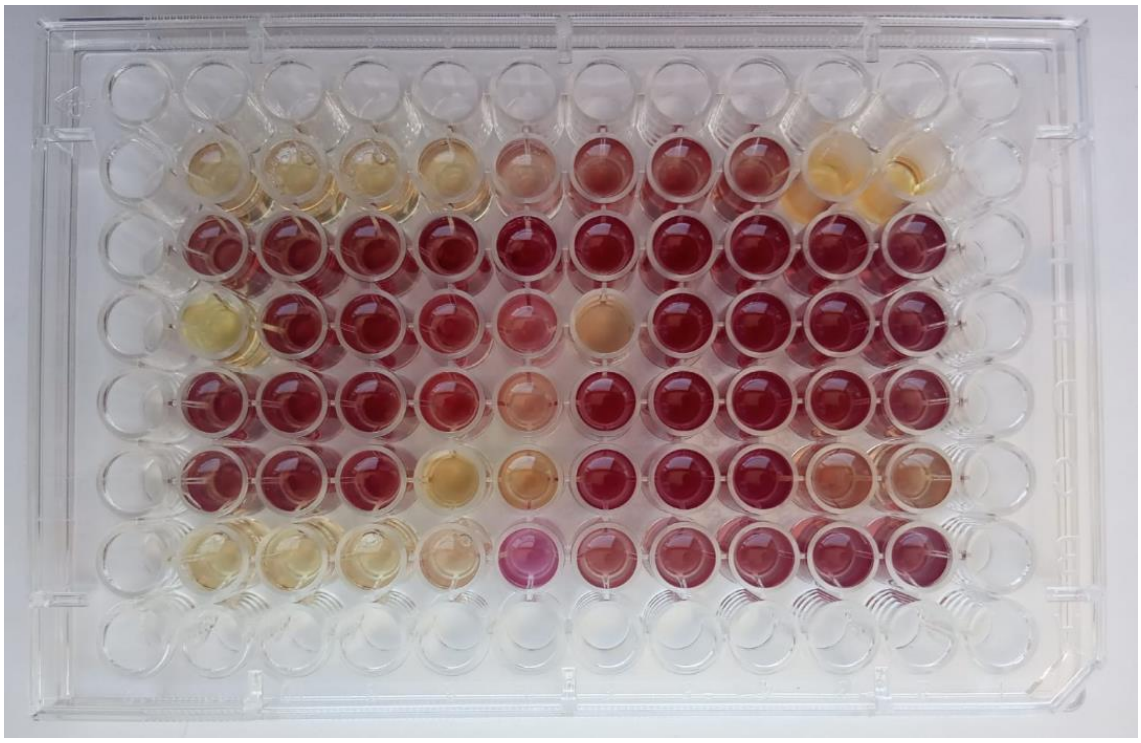
Yapılan 24 ve 48 saatlik MTT değerlendirmesinin sonucunda amentoflavonun IC50 dozu 22.684 mikromolar olarak hesaplandı, değer 20 mikromolara yuvarlanarak çalışmalar gerçekleştirildi. TNF-α için ise doz 10 ng/ml olarak belirlendi.

Tablo 3: MTT Plate Dizaynı

X	24 Saat MTT					48 Saat MTT					X
X	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	X
X	AMF 500µM	AMF 500µM	TNF-α 160ng/ml	TNF-α 160ng/ml	Kontrol	AMF 500µM	AMF 500µM	TNF-α 160ng/ml	TNF-α 160ng/ml	Kontrol	X
X	AMF 100µM	AMF 100µM	TNF-α 40ng/ml	TNF-α 40ng/ml	Kontrol	AMF 100µM	AMF 100µM	TNF-α 40ng/ml	TNF-α 40ng/ml	Kontrol	X
X	AMF 20µM	AMF 20µM	TNF-α 10ng/ml	TNF-α 10ng/ml	DMSO 2KAT	AMF 20µM	AMF 20µM	TNF-α 10ng/ml	TNF-α 10ng/ml	DMSO 2KAT	X
X	AMF 4µM	AMF 4µM	TNF-α 2,5ng/ml	TNF-α 2,5ng/ml	DMSO 1250KAT	AMF 4µM	AMF 4µM	TNF-α 2,5ng/ml	TNF-α 2,5ng/ml	DMSO 1250KAT	X
X	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	Blank	X
X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X



Şekil 6: 24 saatlik MTT plate görünümü



Şekil 7: 48 saatlik MTT plate görünümü

3.3 Umbilikal Ven Endotel Hücre Kültürü Deney Aşamaları

MTT testi sonucunda amentoflavon için uygulama dozu 20 mikromolar, TNF-α için ise 10 nanogram/mililitre olarak hesaplanmıştır. Hücre Kültürü aşamaları MTT testindeki ile aynıdır. Hücre kültürü çalışması için hücreler 6 kuyucuklu plate üzerine ekilmiş, gerekli uygulamalar yapılmış ve toplamda 24 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında qRTPCR ve ELISA metodlarıyla 2'şer tekrarlı olacak şekilde değerlendirmeler yapılmıştır.

Çalışmada 6 değerlendirme grubu mevcuttur;

1. Kontrol grubu: Herhangi bir uygulama yapılmayan sağlıklı insan umbilikal ven endotelyal hücreleri bu grupta yer almaktadır.
2. Amentoflavon grubu (AMF): HUVEC Hücrelerine 20 mikromolar amentoflavon uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. Bu grup amentoflavon ve TNF-α'nın birlikte uygulandığı gruplar için pozitif kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda amentoflavonun tek başına uygulandığında IL-6, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, NF-κB üzerine etkilerinin anlaşılması amaçlanmıştır.
3. TNF-α Grubu (TNF): HUVEC Hücrelerine 10 ng/ml TNF-α uygulanarak 24 saat inkübe edilmiştir. Bu grup amentoflavon ve TNF-α birlikte uygulandığı gruplar için negatif kontrol olarak değerlendirilmiştir. Aynı zamanda TNF-α'nın tek başına uygulandığında IL-6, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, NF-κB üzerine etkilerinin anlaşılması amaçlanmıştır.
4. AMF + TNF Grubu: 20 mikromolar amentoflavon ve 10 ng/ml TNF-α'nın HUVEC Hücrelerine eş zamanlı olarak uygulanarak 24 saat inkübe edildiği gruptur. Bu grupta amentoflavonun endotelyal hasarlanmanın başlangıcında alındığındaki tedavi edici özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.
5. Pre AMF + Post TNF Grubu: Bu grupta HUVEC hücrelerine 20 mikromolar amentoflavon önden uygulanıp hücreler 6 saat inkübe edildikten sonra

kuyucuğa 10 ng/ml TNF-α ilave edilerek inkübasyon süresi 24 saate tamamlanmıştır. Bu grubun amacı amentoflavonun endotelyal hasarlanma öncesinde profilaktik olarak uygulandığındaki etkilerini incelemektir.

6. Pre TNF + Post AMF Grubu: Bu grupta HUVEC hücrelerine 10 ng/ml TNF-α önden uygulanıp hücreler 6 saat inkübe edildikten sonra kuyucuğa 20 mikromolar amentoflavon ilave edilerek inkübasyon süresi 24 saate tamamlanmıştır. Bu grubun amacı amentoflavonun endotelyal hasarlanma meydana geldikten sonraki tedavi edici etkilerini incelemektir.

Bu gruplamalar sayesinde amentoflavonun profilaktik, inflamasyonla eş zamanlı ve hastalık sonrası tedavi edici etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Hem sağlıklı hücrelerle hem de amentoflavon ve TNF-α ile pozitif ve negatif kontrol edilerek sonuçların daha güvenilir bir şekilde değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

24 saatlik inkübasyon sonrasında grupların her birinde qRT-PCR metodu ile IL-6, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri 2 tekrarlı olacak şekilde bakılmış, sonrasında ise ELISA metodu ile IL-6, IL-8, ICAM-1, VCAM-1, NF-κB protein ekspresyonları 2 tekrarlı olacak şekilde değerlendirilmiştir.

3.4. mRNA qRTPCR Çalışması

3.4.1. mRNA İzolasyonu

mRNA izolasyonu için Tablo 4'te belirtilen materyaller kullanılmıştır.

Tablo 4: mRNA İzolasyonu İçin Kullanılan Materyal Bilgileri

Kullanılan Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
GeneAll	RiboEx	301-001
GeneAll	Hybrid-R	305-101

mRNA izolasyon protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Dokunun üzerine 1 ml RiboEx eklendi.
2. Oda ısısında 5 dk. inkübe edildi.
3. Karışım üzerine 200 µL kloroform eklendi.
4. +4°C de 12.000×g'de 15 dk santrifüj yapıldı.
5. Süpernatant temiz bir tüpe alındı. Süpernatantın hacmi kadar RB1 Buffer eklendi. Pipetaj yapılan karışım spin kolona aktarıldı. 10.000×g'de 30 sn. santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
6. Kolon üzerine 500 µL SW1 Buffer eklendi. 10.000×g de 30 sn. santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
7. Kolon üzerine 500 µL RNW Buffer eklendi. 10.000×g de 30 sn. santrifüj yapıldı. Collection tüp yenisi ile değiştirildi.
8. Kolon içinde kalan yıkama solüsyonlarını uzaklaştırmak için 10.000×g de 1 dk. santrifüj yapıldı.
9. Daha sonra kolon temiz bir tüpe alınarak üzerine 50 µL RNase-free su eklendi ve 1dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra 10.000×g de 1 dk. santrifüj yapıldı.
10. Elde edilen mRNA örnekleri -80°C sıcaklıkta dondurulduu.

3.4.2. cDNA Sentezi

mRNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA sentezinde, GeneAll HyperScriptTM First strand synthesis kit (601-005) kullanılmıştır.
cDNA sentezi için kullanılan mastermix bilgileri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 5: cDNA Sentezi İçin Kullanılan Mastermix Bilgileri

Bileşen	Hacim
RNA örneği	2 µl
Primer	1 µl
dNTP mix	1 µl
RNase- içermeyen distile su	10 µl

1. cDNA mastermix hazırlandıktan sonra 65 °C sıcaklıkta 5 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında karışım buz üzerine alındı.

2. Aşağıdaki tabloda adı ve miktarları belirtilen bileşenler cDNA mastermix üzerine eklendi ve homojen olarak karışması sağlandı.

Tablo 6: cDNA Mastermix Üzerine Eklenen Bileşenler

Bileşen	Hacim
10X RTase Reaksiyon Buffer	2
0.1 M DTT	2
Revers Transkriptaz	1
RNaz İnhibitörü	1

3. cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 7: cDNA Sentez Reaksiyonu Koşulları

	Adım 1	Adım 2
Sıcaklık (°C)	55	85
Süre	60 dk.	5 dk.

Elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR aşamasına kadar -80°C sıcaklıkta muhafaza edildi.

3.4.3. Real-Time qPCR

cDNA elde edildikten sonra Real-Time qPCR aşamasına geçilmiştir. Real-Time qPCR için GeneAll RealAmpTM SYBR qPCR Master mix (801-051) kullanılmıştır.

Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bilgileri aşağıdaki tabloda belirtilmiştir.

Tablo 8: Real-Time qPCR İçin Kullanılan MasterMix Bilgileri

MasterMix Bileşenleri	Hacim
2X MasterMix (with SYBR-Green)	10 µl

ROX Dye	1 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
cDNA Template	4 µl
RNase içermeyen distile su	3 µl
TOPLAM	20 µl

Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçilmiştir. Real-Time qPCR için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. Real-Time qPCR reaksiyonu Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

Tablo 9: Real-Time qPCR Reaksiyonu Koşulları

PCR Adımları	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç denatürasyonu	95	300 sn.	1
Denatürasyon	95	15 sn.	40
Primer Bağlanması	55 - 68	60 sn.	
Erime Eğrisi	65 - 95	2 - 5 sn./adım	1

3.4.4. Relatif Kantitasyon Hesaplanması

mRNA ekspresyonları kantitasyonu ACTB transkripti referans olarak kullanılıp kontrol gurubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplamasında "ΔΔCt Yöntemi" kullanılmıştır. ΔΔCt hesaplaması aşağı açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Hem hedef grupta hem de referans grupta her bir örneğin hem hedef mRNA hem de referans RNA için Real-Time PCR sonucunda Ct değerleri elde edilmiştir.
2. Hedef grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak hedef grup ΔCt değerleri elde edilmiştir.
3. Referans grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak referans grup ΔCt değerleri elde edilmiştir.

4. Hedef grup ΔCt değerlerinden referans grup ΔCt değerleri çıkarılarak ΔΔCt değerleri elde edilmiştir.
5. ΔΔCt değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ şeklinde işleme alınarak kat değişimi (Fold Change) hesaplanması yapılmıştır.
6. Fold Change değeri 1'in üzerinde çıkması durumunda hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak artış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Fold Change değeri 1'in altında çıkması durumunda ise hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

3.5. ELISA Testi Çalışması

ELISA çalışması için kullanılan kitlere ait bilgiler aşağıdaki gibidir;

Tablo 10: ELISA Çalışması Kit Bilgileri

Kullanılan Kitin Markası	Kitin Adı	Katalog No
Elabscience Biotechnology Inc.	ICAM	E-EL-H2585
Elabscience Biotechnology Inc.	IL-6	E-EL-H0102
Elabscience Biotechnology Inc.	IL-8	E-EL-H0048
Elabscience Biotechnology Inc.	NF-κB	E-EL-H1388
Elabscience Biotechnology Inc.	VCAM	E-EL-H5587

Deney Protokolü:

ELISA kitleri, Sandwich-ELISA yöntemini kullanmaktadır. Kit içinden çıkan mikro ELISA plate kuyucukları araştırılan moleküle spesifik bir antikorla önceden kaplanmıştır. Öncelikle standartlar ve örnekler, plate kuyucuklarına ilave edilerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda araştırılan molekül ile spesifik antikor birleşti. Daha sonra, araştırılan molekül ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına spesifik bir biyotinlenmiş tespit antikoru, her bir kuyucuğa eklendi ve inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bağlanmayan serbest bileşenler yıkandı. Sonra

Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) ortama eklenerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda araştırılan molekül-biyotinlenmiş tespit antikoru-Avidin-HRP konjugat bileşenlerinden oluşan sandwich yapısı tamamlanmış oldu. Sonra tekrar yıkama yapılarak bağlanmayan serbest bileşenler uzaklaştırıldı. Yıkama sonrasında substrat çözeltisi her kuyucuğa eklenerek inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda yalnızca araştırılan molekül, biyotinlenmiş tespit antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyular mavi renkte görüldü. Enzim-substrat reaksiyonu, durdurma çözeltisi ilave edilerek sonlandırıldı ve mavi renk sarıya döndü. Optik dansite (OD), 450 nm ± 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. OD değeri, araştırılan molekülün konsantrasyonuyla orantılıdır.

Numune içerisindeki araştırılan biyomolekülün seviyesini belirlemek için, kullanılan standartların konsantrasyonu ve bu standartların OD değeri yatay-dikey eksen üzerine grafik çizilerek hesaplandı. Standart konsantrasyonların ve OD değerlerinin grafikteki kesiştiği noktalara göre en uygun eğri çizilerek standart bir eğri oluşturulmuştur. Numunelerin OD'si standart eğriyle karşılaştırılarak numunelerdeki araştırılan molekülün konsantrasyonu hesaplanmıştır.

3.6. İstatistiksel analiz

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama ve standart sapma değerleri kullanılmıştır. Değişkenlerin dağılımı Kolmogrov Smirnov testi ile analiz edildi. Gruplar arası fark için ANOVA, ileri analiz (post hoc) için Tukey - Kramer testi kullanıldı. Analizlerde SPSS 22.0 programı kullanılmıştır. $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MTT Testi Sonuçları

Tablo 11: 24 ve 48 Saatlik MTT değerlendirme sonuçları.

Bu Tablo, Tablo 3'teki MTT Plate dizaynı ile kıyaslanarak incelenecektir:

24 Saat MTT Testi Sonuçları **48 Saat MTT Testi Sonuçları**

0,0284	0,0301	0,0304	0,0284	0,0308	0,0296	0,0246	0,0297	0,0287	0,0282	0,0286	0,0287
0,0292	1,2689	1,2201	1,0807	0,9713	0,8933	0,9095	0,4237	0,387	0,3311	0,3413	0,0286
0,0312	0,5876	0,6553	1,716	1,6529	1,472	0,4454	0,3254	1,4685	1,267	1,2703	0,0254
0,0298	1,065	1,303	1,4683	1,6792	1,4925	0,5261	1,0227	1,6463	1,3191	1,1922	0,032
0,0311	1,325	1,4083	1,529	1,5661	0,3111	0,7226	0,9215	1,3783	1,3884	0,2643	0,0434
0,0315	1,3345	1,3938	1,4327	1,6294	1,3984	1,8474	1,5162	1,2639	1,2592	1,185	0,0296
0,031	0,5922	1,0209	0,8223	0,8617	0,836	0,4331	0,3321	0,3871	0,4614	0,3585	0,0295
0,0314	0,0291	0,0304	0,0327	0,0291	0,0352	0,0299	0,0297	0,0292	0,0291	0,0309	0,0289

Tablo 12: AMF MTT dozları 48 saat sonuçları ve IC50 Doz Hesaplaması

DOZ	Yanıt	Öngörülen
500	98	96,3537
100	82	82,8128
20	47	46,7677
4		

Parametre	Değer
IC50	22,605
slope	1,05744
Ortalama Sq	3,42497

Yapılan 24 ve 48 saatlik MTT değerlendirmesinin sonucunda amentoflavonun IC50 dozu 22.684 mikromolar olarak hesaplandı, değer 20 mikromolara yuvarlanarak çalışmalar gerçekleştirildi. TNF-α için ise doz 10 ng/ml olarak belirlendi.

4.2. qRTPCR İstatistik Sonuçları

qRT-PCR yöntemi ile saptanan göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri aşağıdaki tablolarda gruplanarak gösterilmiştir. Gruplara öncelikle tek yönlü varyans analizi (ANOVA testi) uygulanarak incelenen parameter açısından gruplar arası anlamlı fark olup olmadığı değerlendirildi, sonrasında Tukey – Kramer Testi vasıtasıyla gruplar tek tek kendi arasında karşılaştırılarak sonuçlara ulaşıldı. Aşağıdaki özet tabloda tüm gruplara ait parametreler değerlendirilebilir.

Tablo 13: qRTPCR İstatistik Sonuçları Özet Tablo

	GRUP											
	1. KONTROL		2. AMF		3. AMF +TNF		4. TNF		5. pre TNF +post AMF		6. pre AMF +post TNF	
	ORT	SD	ORT	SD	ORT	SD	ORT	SD	ORT	SD	ORT	SD
ICAM	1,03	0,36	1,78	0,01	0,29	0,03	47,95	3,52	21,59	4,29	0,85	0,01
IL-6	1,000	0,01	0,34	0,14	3,79	1,15	45,65	4,46	10,03	2,53	2,44	0,05
IL-8	1,005	0,13	0,29	0,04	0,71	0,16	3,46	0,30	0,88	0,007	0,10	0,04
NF-κB	1,010	0,21	1,56	0,17	7,05	0,73	32,38	3,62	10,35	1,71	2,26	0,67
VCAM	1,005	0,04	0,91	0,45	4,91	1,71	17,52	1,06	11,81	2,15	6,50	1,81

4.2.1. qRTPCR Tek yönlü varyans analizi ICAM-1

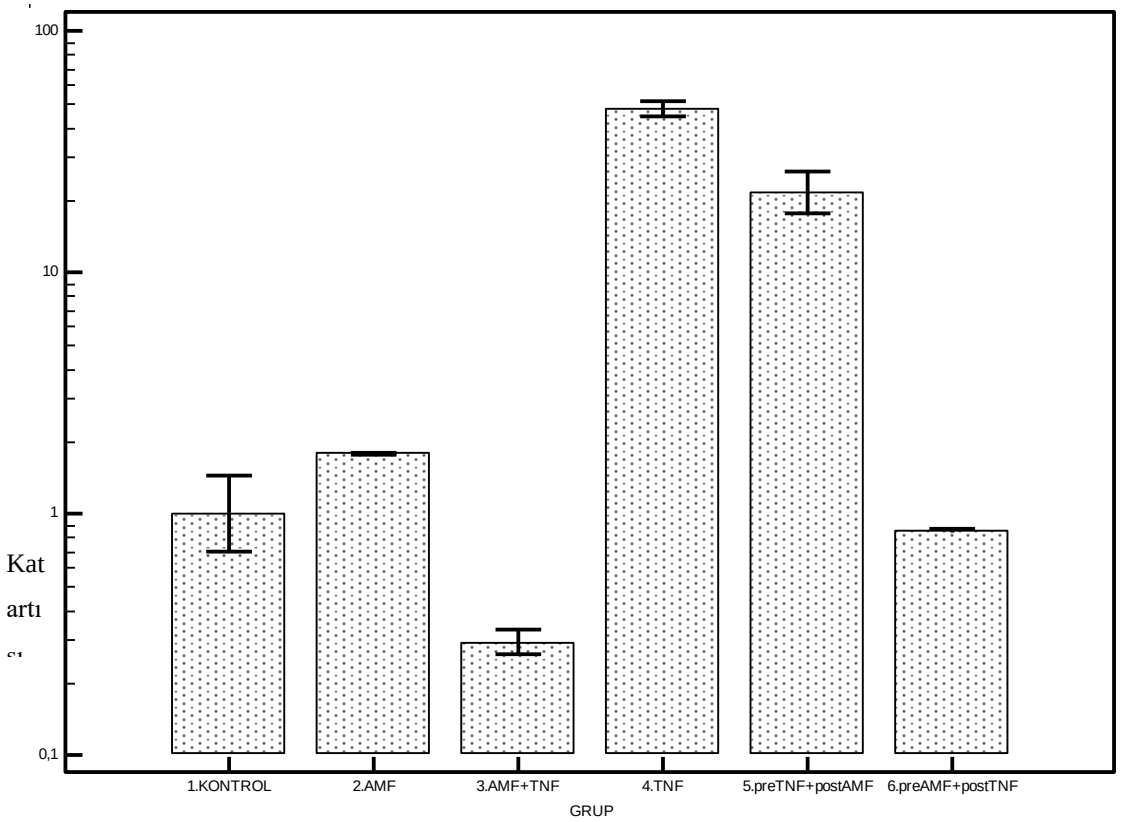
Yapılan ANOVA testi sonucunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu (P < 0,001), gruplar kendi aralarında değerlendirilmek üzere Tukey – Kramer Testi uygulandı.

Tablo 14: qRTPCR ICAM-1 ANOVA Testi Sonuçları

Varyasyon	Sum of Squares	DF	Mean Square
Gruplar arası	7,5319	5	1,5064
Grup içi	0,03650	6	0,006083
Total	7,5684	11	
F- değeri	247,631		
Anlamlılık düzeyi	P < 0,001		

Tablo 15: ICAM-1 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Sonuçları

Grup	n	Geometrik Ortalama	Değişkenlik oranı (P<0,05)
(1) 1.KONTROL	2	0,9966	(3)(4)(5)
(2) 2.AMF	2	1,7800	(3)(4)(5)(6)
(3) 3.AMF+TNF	2	0,2939	(1)(2)(4)(5)(6)
(4) 4.TNF	2	47,8901	(1)(2)(3)(5)(6)
(5) 5.PRE-TNF+POST-AMF	2	21,3749	(1)(2)(3)(4)(6)
(6) 6.PRE-AMF+POST-TNF	2	0,8499	(2)(3)(4)(5)



Şekil 8: ICAM-1 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği

1. Kontrol Grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Kontrol Grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF ve Pre TNF + Post AMF Gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

2. AMF Grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF Grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF ve Pre TNF + Post AMF Gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05).

3. AMF+TNF Grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05).

4. TNF Grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05).

5. Pre TNF + Post AMF Grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol, AMF, AMF + TNF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05).

6. Pre AMF + Post TNF Grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre AMF + Post TNF Grubunda ICAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF, AMF ve Pre TNF + Post AMF Gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05).

4.2.2. qRTPCR Tek yönlü varyans analizi – IL-6

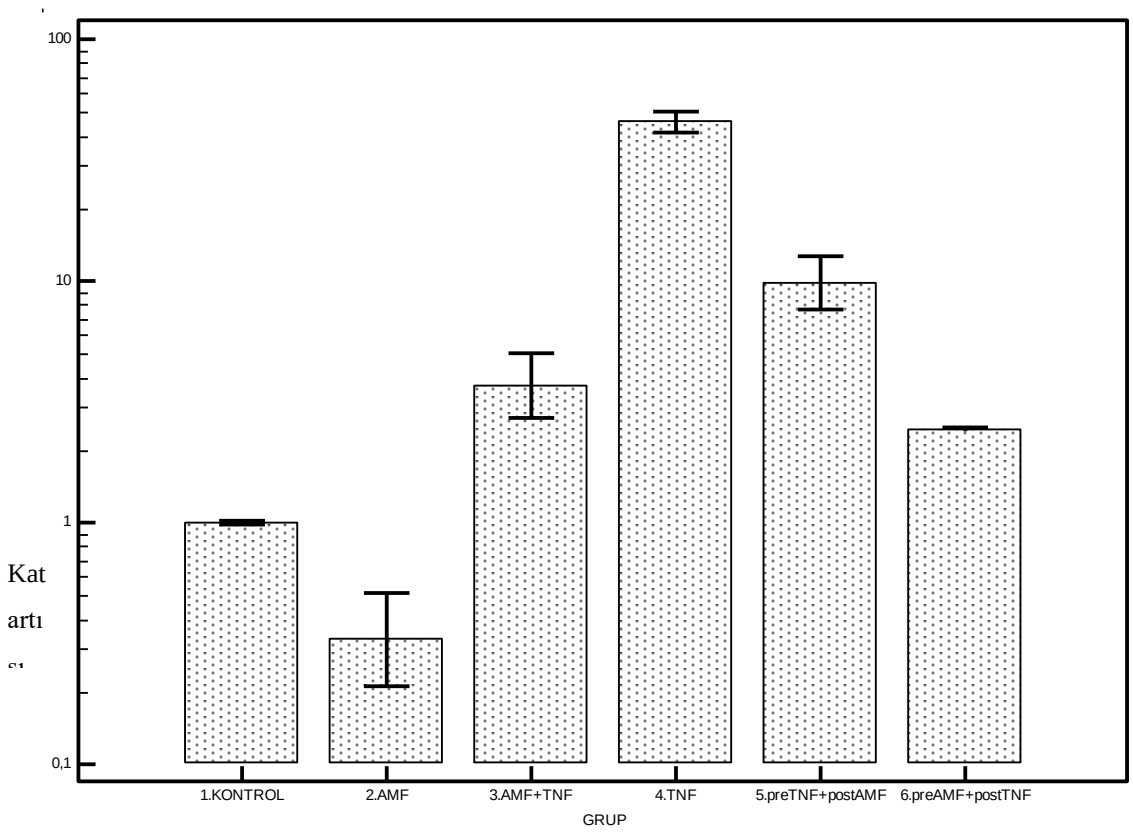
Yapılan ANOVA testi sonucunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu (P < 0,001), gruplar kendi aralarında değerlendirilmek üzere Tukey – Kramer Testi uygulandı.

Tablo 16: IL-6 qRTPCR ANOVA Testi Sonuçları

Varyasyon	Sum of Squares	DF	Mean Square
Gruplar arası	5,6364	5	1,1273
Grup içi	0,06950	6	0,01158
Total	5,7058	11	
F- değeri	97,323		
Anlamlılık düzeyi	P < 0,001		

Tablo 17: IL-6 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Sonuçları

Grup	n	Geometrik Ortalama	Değişkenlik oranı (P<0,05)
(1) 1.KONTROL	2	0,9999	(2)(3)(4)(5)
(2) 2.AMF	2	0,3286	(1)(3)(4)(5)(6)
(3) 3.AMF+TNF	2	3,7065	(1)(2)(4)
(4) 4.TNF	2	45,5459	(1)(2)(3)(5)(6)
(5) 5.PRE-TNF+POST-AMF	2	9,8732	(1)(2)(4)(6)
(6) 6.PRE-AMF+POST-TNF	2	2,4397	(2)(4)(5)



Şekil 9: IL-6 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği

1. Kontrol Grubunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Pre AMF + Post TNF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Kontrol Grubunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF, AMF + TNF ve Pre TNF + Post AMF Gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

2. AMF Grubunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05).

3. AMF+TNF Grubunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Pre AMF + Post TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF + TNF Grubunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF ve Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF Grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4. TNF Grubunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05).

5. Pre TNF + Post AMF Grubunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF Grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre TNF + Post AMF Grubunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF, Pre AMF + Post TNF ve Kontrol gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF Grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

6. Pre AMF + Post TNF Grubunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF ve Kontrol Grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre AMF + Post TNF Grubunda IL-6 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF Grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF ve Pre TNF + Post AMF Gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4.2.3. qRTPCR Tek yönlü varyans analizi – IL-8

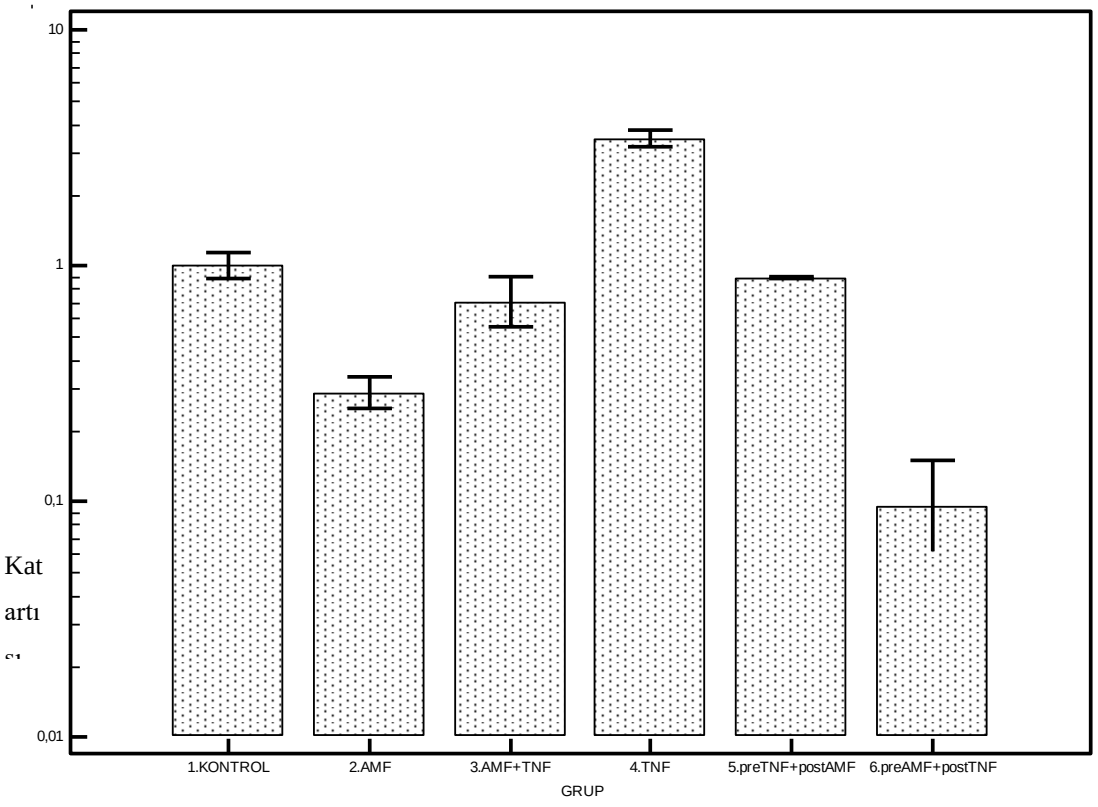
Yapılan ANOVA testi sonucunda IL-8 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu (P < 0,001), gruplar kendi aralarında değerlendirilmek üzere Tukey – Kramer Testi uygulandı.

Tablo 18: IL-8 qRTPCR ANOVA Testi Sonuçları

Varyasyon	Sum of Squares	DF	Mean Square
Gruplar arası	2,7964	5	0,5593
Grup içi	0,05605	6	0,009342
Total	2,8525	11	
F- değeri	59,871		
Anlamlılık düzeyi	P < 0,001		

Tablo 19: IL-8 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Sonuçları

Grup	n	Geometrik Ortalama	Değişkenlik oranı (P<0,05)
(1) 1.KONTROL	2	1,0005	(2)(4)(6)
(2) 2.AMF	2	0,2884	(1)(3)(4)(5)(6)
(3) 3.AMF+TNF	2	0,6998	(2)(4)(6)
(4) 4.TNF	2	3,4583	(1)(2)(3)(5)(6)
(5) 5.PRE-TNF+POST-AMF	2	0,8850	(2)(4)(6)
(6) 6.PRE-AMF+POST-TNF	2	0,09539	(1)(2)(3)(4)(5)



Şekil 10: IL-8 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği

1. Kontrol Grubunda IL-8 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Kontrol Grubunda IL-8 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

2. AMF Grubunda IL-8 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Pre AMF + Post TNF grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek, Kontrol, AMF + TNF, TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

3. AMF+TNF Grubunda IL-8 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF + TNF Grubunda IL-8 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4. TNF Grubunda IL-8 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05).

5. Pre TNF + Post AMF Grubunda IL-8 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol ve AMF + TNF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre TNF + Post AMF Grubunda IL-8 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

6. Pre AMF + Post TNF Grubunda IL-8 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4.2.4. qRTPCR Tek yönlü varyans analizi – NF-κB

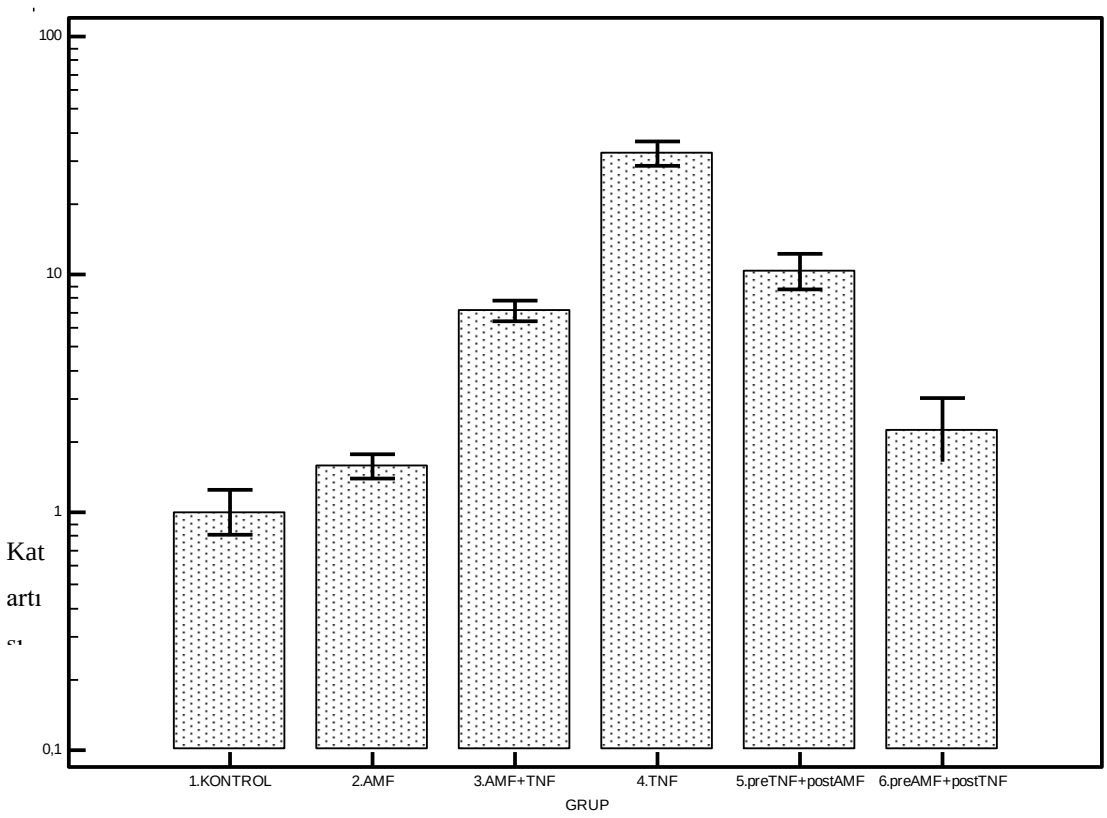
Yapılan ANOVA testi sonucunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu (P < 0,001), gruplar kendi aralarında değerlendirilmek üzere Tukey – Kramer Testi uygulandı.

Tablo 20: NF-κB qRTPCR ANOVA Testi Sonuçları

Varyasyon	Sum of Squares	DF	Mean Square
Gruplar arası	3,2661	5	0,6532
Grup içi	0,03804	6	0,006340
Total	3,3041	11	
F- değeri	103,035		
Anlamlılık düzeyi	P < 0,001		

Tablo 21: NF-κB qRTPCR Tukey-Kramer Testi Sonuçları

Grup	n	Geometrik Ortalama	Değişkenlik oranı (P<0,05)
(1) 1.KONTROL	2	0,9988	(3)(4)(5)(6)
(2) 2.AMF	2	1,5600	(3)(4)(5)
(3) 3.AMF+TNF	2	7,0308	(1)(2)(4)(6)
(4) 4.TNF	2	32,2786	(1)(2)(3)(5)(6)
(5) 5.PRE-TNF+POST-AMF	2	10,2790	(1)(2)(4)(6)
(6) 6.PRE-AMF+POST-TNF	2	2,2084	(1)(3)(4)(5)



Şekil 11: NF-κB qRTPCR Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği

1. Kontrol Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Kontrol Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF, TNF, Pre AMF + Post TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

2. AMF Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF, TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

3. AMF+TNF Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Pre TNF + Post AMF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF + TNF Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol, AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4. TNF Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05).

5. Pre TNF + Post AMF Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre TNF + Post AMF Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol, AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

6. Pre AMF + Post TNF Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre AMF + Post TNF Grubunda NF-κB göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF, AMF + TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4.2.5. qRTPCR Tek yönlü varyans analizi – VCAM-1

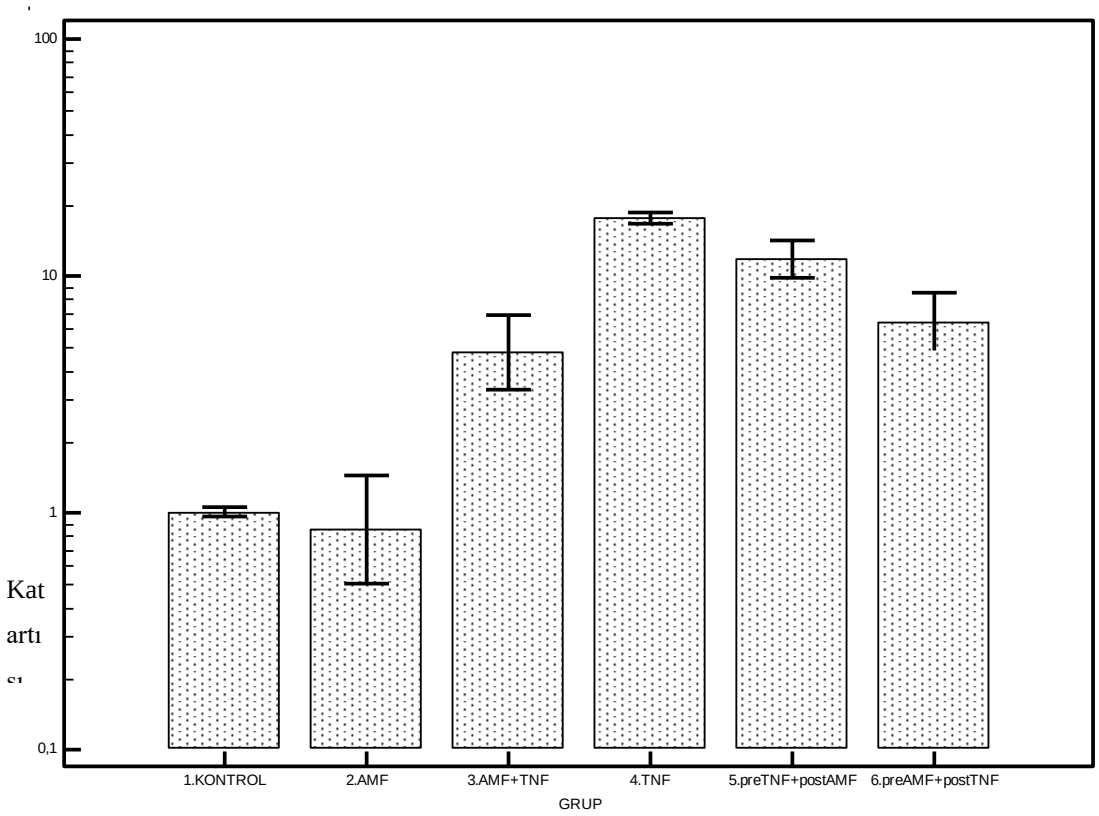
Yapılan ANOVA testi sonucunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu (P < 0,001), gruplar kendi aralarında değerlendirilmek üzere Tukey – Kramer Testi uygulandı.

Tablo 22: VCAM-1 qRTPCR ANOVA Testi Sonuçları

Varyasyon	Sum of Squares	DF	Mean Square
Gruplar arası	2,9646	5	0,5929
Grup içi	0,09844	6	0,01641
Total	3,0631	11	
F- değeri	36,140		
Anlamlılık düzeyi	P < 0,001		

Tablo 23: VCAM-1 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Sonuçları

Grup	n	Geometrik Ortalama	Değişkenlik oranı (P<0,05)
(1) 1.KONTROL	2	1,0044	(3)(4)(5)(6)
(2) 2.AMF	2	0,8553	(3)(4)(5)(6)
(3) 3.AMF+TNF	2	4,7586	(1)(2)(4)
(4) 4.TNF	2	17,5087	(1)(2)(3)
(5) 5.PRE-TNF+POST-AMF	2	11,7162	(1)(2)
(6) 6.PRE-AMF+POST-TNF	2	6,3727	(1)(2)



Şekil 12: VCAM-1 qRTPCR Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği

1. Kontrol Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Kontrol Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF, TNF, Pre AMF + Post TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

2. AMF Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF, TNF, Pre AMF + Post TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

3. AMF+TNF Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Pre TNF + Post AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF + TNF Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4. TNF Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Pre TNF + Post AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir

(P>0,05). TNF Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol, AMF ve AMF + TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05)

5. Pre TNF + Post AMF Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF, TNF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre TNF + Post AMF Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05)

6. Pre AMF + Post TNF Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi AMF + TNF, TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre AMF + Post TNF Grubunda VCAM-1 göreceli mRNA ekspresyon seviyesi Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05)

4.3. ELISA İstatistik Sonuçları

Gruplara öncelikle tek yönlü varyans analizi (ANOVA testi) uygulanarak incelenen parameter açısından gruplar arası anlamlı fark olup olmadığı değerlendirildi, sonrasında Tukey – Kramer Testi vasıtasıyla gruplar tek tek kendi arasında karşılaştırılarak sonuçlara ulaşıldı. Aşağıdaki özet tabloda tüm parametreler değerlendirilebilir.

Tablo 24: ELISA İstatistik Sonuçları Özet Tablo

Parametre	GRUP											
	1.KONTROL		2.AMF		3.AMF+ TNF		4.TNF		5.preTNF+ postAMF		6.preAMF+ postTNF	
	ORT	SD	ORT	SD	ORT	SD	ORT	SD	ORT	SD	ORT	SD
ICAM-1	242,93	6,40	247,96	10,98	356,8	10,64	767,6	7,60	598,47	11,58	355,25	15,92
IL-6	20,88	0,14	20,24	0,47	24,24	0,36	62,67	1,03	35,61	0,90	25,83	0,38
IL-8	98,24	2,82	90,79	3,50	108,03	2,50	144,57	2,60	116,14	1,79	106,27	5,69
NF-κB	0,51	0,01	0,52	0,01	0,76	0,02	2,32	0,04	1,72	0,02	0,81	0,007
VCAM-1	5,13	0,06	4,82	0,08	6,34	0,15	21,31	0,5	15,14	0,23	12,03	0,10

4.3.1. ELISA Tek yönlü varyans analizi – ICAM-1

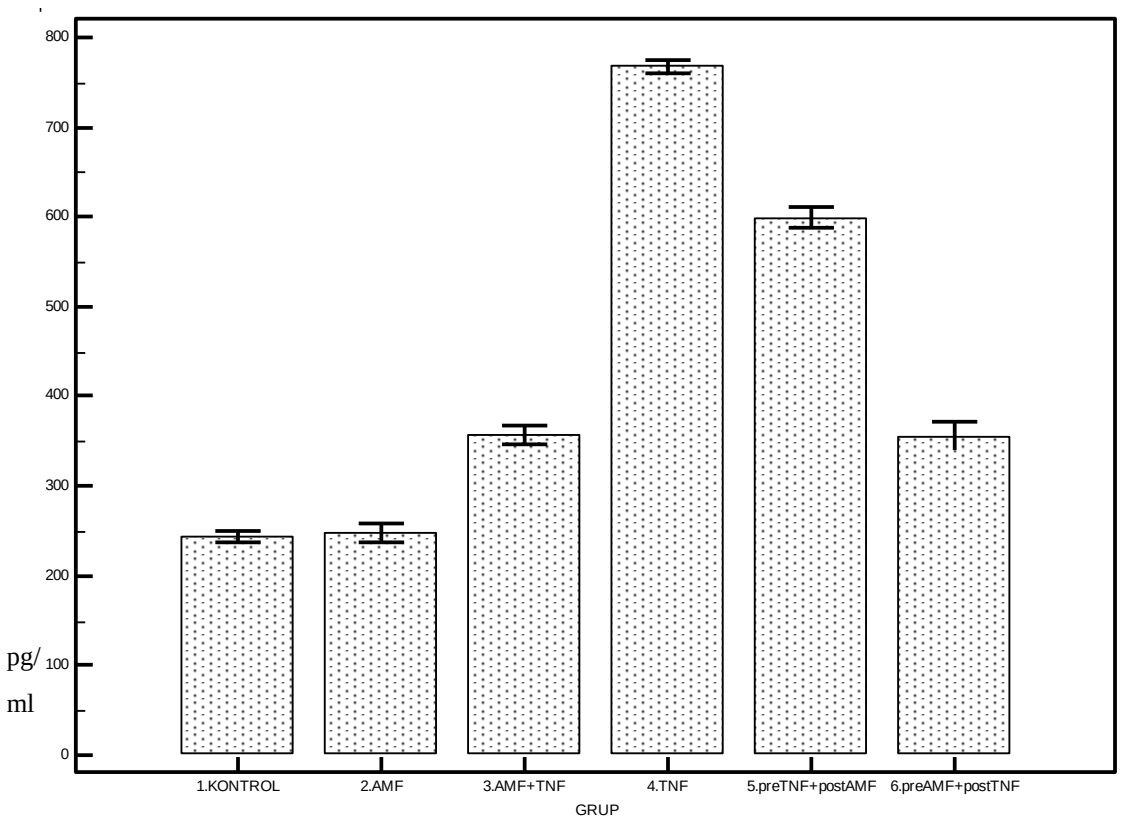
Yapılan ANOVA testi sonucunda ICAM-1 protein ekspresyonları açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu (P < 0,001), gruplar kendi aralarında değerlendirilmek üzere Tukey – Kramer Testi uygulandı.

Tablo 25: ICAM-1 ELISA ANOVA Testi Sonuçları

Varyasyon	Sum of Squares	DF	Mean Square
Gruplar arası	442853,3147	5	88570,6629
Grup içi	720,6636	6	120,1106
Total	443573,9783	11	
F- değeri	737,409		
Anlamlılık düzeyi	P < 0,001		

Tablo 26: ICAM-1 ELISA Tukey-Kramer Testi Sonuçları

Grup	n	Geometrik Ortalama	Standart Deviasyon	Değişkenlik oranı (P<0,05)
(1) 1.KONTROL	2	242,9300	6,4064	(3)(4)(5)(6)
(2) 2.AMF	2	247,9650	10,9814	(3)(4)(5)(6)
(3) 3.AMF+TNF	2	356,8150	10,6420	(1)(2)(4)(5)
(4) 4.TNF	2	767,6200	7,6085	(1)(2)(3)(5)(6)
(5) 5.PRE-TNF+POST-AMF	2	598,4750	11,5895	(1)(2)(3)(4)(6)
(6) 6.PRE-AMF+POST-TNF	2	355,2500	15,9240	(1)(2)(4)(5)



Şekil 13: ICAM-1 ELISA Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği

1. Kontrol Grubunda ICAM-1 protein düzeyleri AMF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Kontrol Grubunda ICAM-1 protein düzeyleri AMF + TNF, TNF, Pre AMF + Post TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

2. AMF Grubunda ICAM-1 protein düzeyleri Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF Grubunda ICAM-1 protein düzeyleri AMF + TNF, TNF, Pre TNF + Post AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

3. AMF+TNF Grubunda ICAM-1 protein düzeyleri Pre AMF + Post TNF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF + TNF Grubunda ICAM-1 protein düzeyleri Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4. TNF Grubunda ICAM-1 protein düzeyleri tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05).

5. Pre TNF + Post AMF Grubunda ICAM-1 protein düzeyleri Kontrol, AMF, AMF + TNF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

6. Pre AMF + Post TNF Grubunda ICAM-1 protein düzeyleri AMF + TNF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre AMF + Post TNF Grubunda ICAM-1 protein düzeyleri Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4.3.2. ELISA Tek yönlü varyans analizi – IL-6

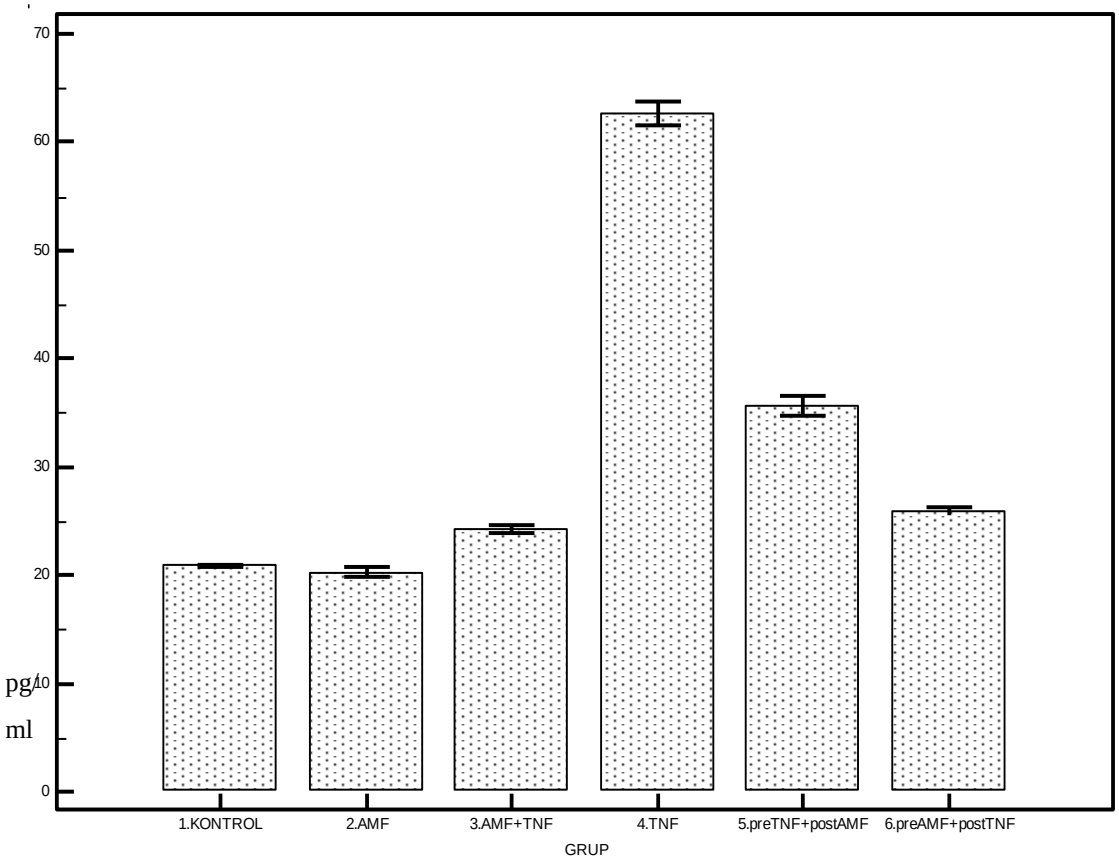
Yapılan ANOVA testi sonucunda IL-6 protein düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu (P < 0,001), gruplar kendi aralarında değerlendirilmek üzere Tukey – Kramer Testi uygulandı.

Tablo 27: IL-6 ELISA ANOVA Testi Sonuçları

Varyasyon	Sum of Squares	DF	Mean Square
Gruplar arası	2625,2647	5	525,0529
Grup içi	2,4125	6	0,4021
Total	2627,6772	11	
F- değeri	1305,831		
Anlamlılık düzeyi	P < 0,001		

Tablo 28: IL-6 ELISA Tukey-Kramer Testi Sonuçları

Grup	n	Geometrik Ortalama	Standart Deviasyon	Değişkenlik oranı (P<0,05)
(1) 1.KONTROL	2	20,8850	0,1485	(3)(4)(5)(6)
(2) 2.AMF	2	20,2450	0,4738	(3)(4)(5)(6)
(3) 3.AMF+TNF	2	24,2400	0,3677	(1)(2)(4)(5)
(4) 4.TNF	2	62,6700	1,0324	(1)(2)(3)(5)(6)
(5) 5.PRE-TNF+POST-AMF	2	35,6100	0,9051	(1)(2)(3)(4)(6)
(6) 6.PRE-AMF+POST-TNF	2	25,8300	0,3818	(1)(2)(4)(5)



Şekil 14: IL-6 ELISA Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği

1. Kontrol Grubunda IL-6 protein düzeyleri AMF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Kontrol Grubunda IL-6 protein düzeyleri AMF + TNF, TNF, Pre AMF + Post TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

2. AMF Grubunda IL-6 protein düzeyleri Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF Grubunda IL-6 protein düzeyleri AMF + TNF, TNF, Pre TNF + Post AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

3. AMF+TNF Grubunda IL-6 protein düzeyleri Pre AMF + Post TNF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF + TNF Grubunda IL-6 protein düzeyleri Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4. TNF Grubunda IL-6 protein düzeyleri tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05).

5. Pre TNF + Post AMF Grubunda IL-6 protein düzeyleri Kontrol, AMF, AMF + TNF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

6. Pre AMF + Post TNF Grubunda IL-6 protein düzeyleri AMF + TNF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre AMF + Post TNF Grubunda IL-6 protein düzeyleri Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4.3.3. ELISA Tek yönlü varyans analizi – IL-8

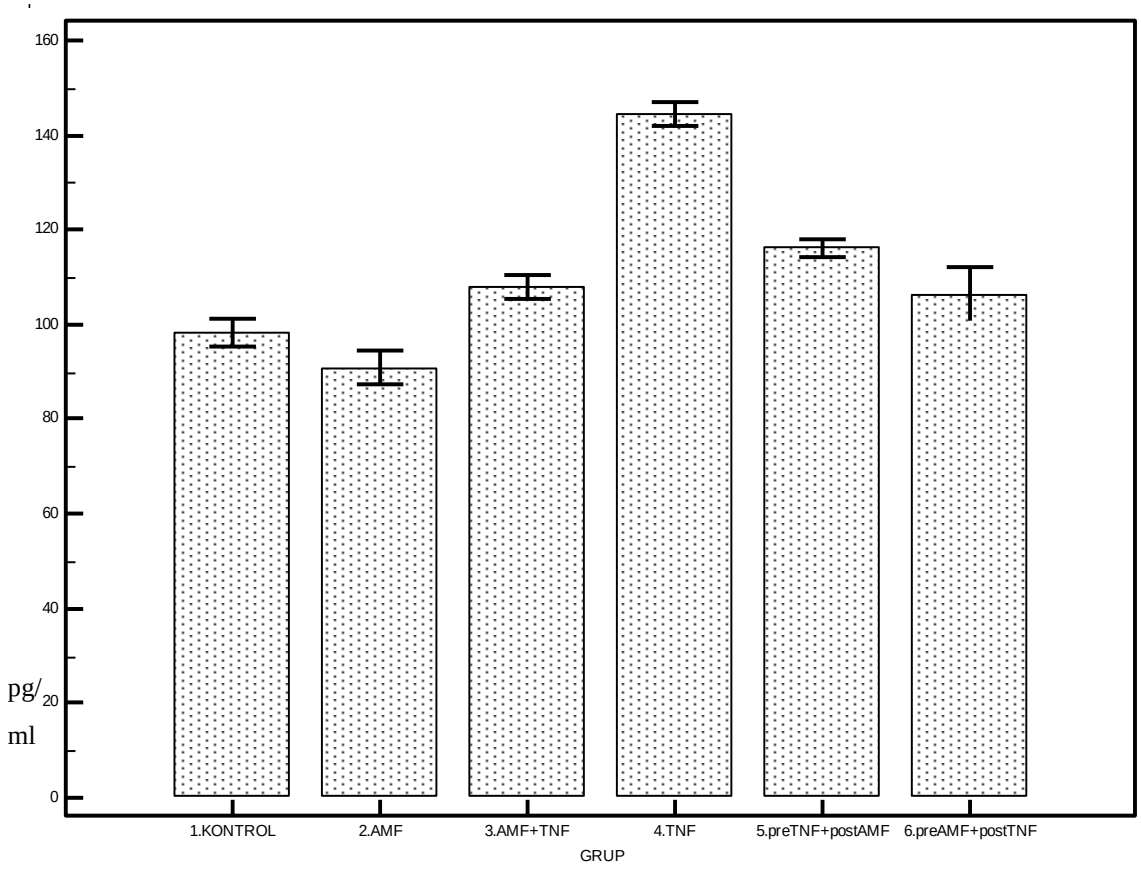
Yapılan ANOVA testi sonucunda IL-8 protein düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu (P < 0,001), gruplar kendi aralarında değerlendirilmek üzere Tukey – Kramer Testi uygulandı.

Tablo 29: IL-8 ELISA ANOVA Testi Sonuçları

Varyasyon	Sum of Squares	DF	Mean Square
Gruplar arası	3509,6251	5	701,9250
Grup içi	68,8754	6	11,4792
Total	3578,5005	11	
F- değeri	61,147		
Anlamlılık düzeyi	P < 0,001		

Tablo 30: IL-8 ELISA Tukey-Kramer Testi Sonuçları

Grup	n	Geometrik Ortalama	Standart Deviasyon	Değişkenlik oranı (P<0,05)
(1) 1.KONTROL	2	98,2450	2,8214	(4)(5)
(2) 2.AMF	2	90,7950	3,5002	(3)(4)(5)(6)
(3) 3.AMF+TNF	2	108,0300	2,5032	(2)(4)
(4) 4.TNF	2	144,5700	2,6022	(1)(2)(3)(5)(6)
(5) 5.PRE-TNF+POST-AMF	2	116,1400	1,7961	(1)(2)(4)
(6) 6.PRE-AMF+POST-TNF	2	106,2750	5,6922	(2)(4)



Şekil 15: IL-8 ELISA Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği

1. Kontrol Grubunda IL-8 protein düzeyleri AMF, AMF+ TNF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Kontrol Grubunda IL-8 protein düzeyleri TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

2. AMF Grubunda IL-8 protein düzeyleri Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF Grubunda IL-8 protein düzeyleri AMF + TNF, TNF, Pre TNF + Post AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

3. AMF+TNF Grubunda IL-8 protein düzeyleri Kontrol, Pre TNF + Post AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF + TNF Grubunda IL-8 protein düzeyleri AMF grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4. TNF Grubunda IL-8 protein düzeyleri tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05).

5. Pre TNF + Post AMF Grubunda IL-8 protein düzeyleri AMF + TNF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre TNF + Post AMF grubunda IL-8 protein düzeyleri Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

6. Pre AMF + Post TNF Grubunda IL-8 protein düzeyleri Kontrol, AMF + TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre AMF + Post TNF Grubunda IL-8 protein düzeyleri AMF grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4.3.4. ELISA Tek yönlü varyans analizi – NF-κB

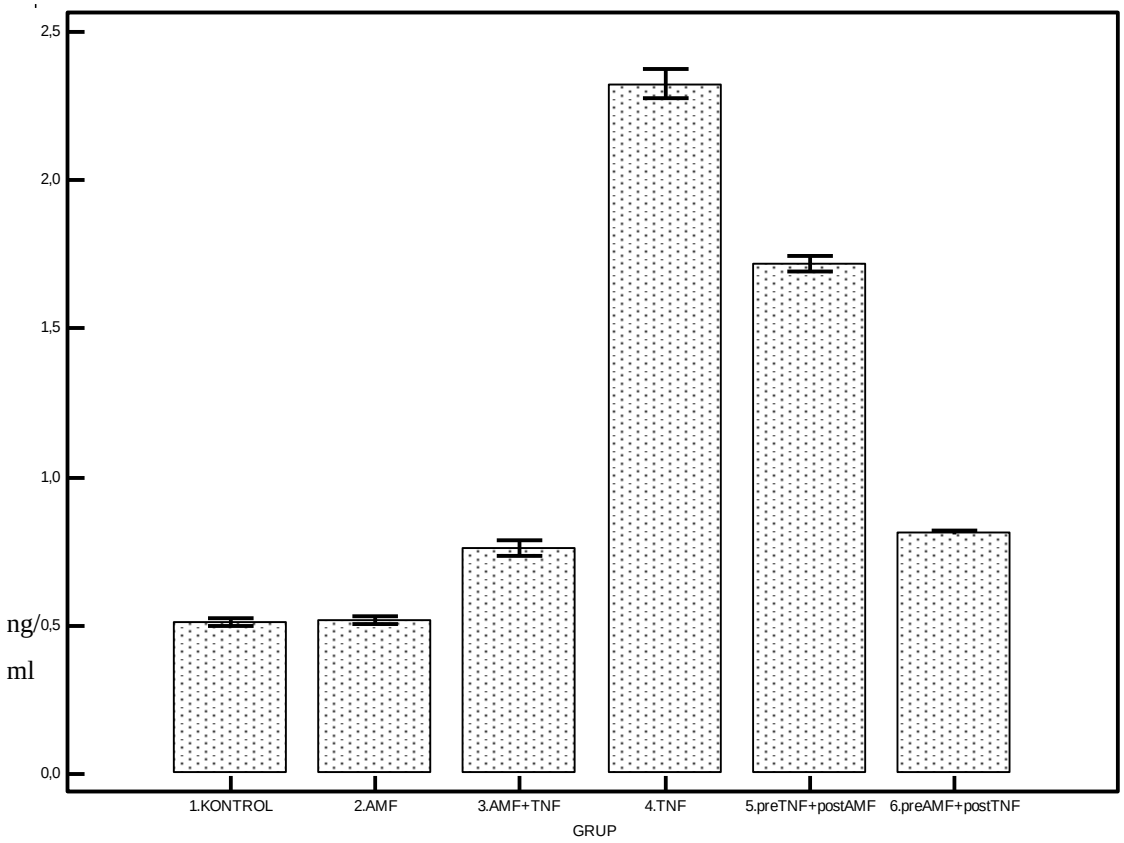
Yapılan ANOVA testi sonucunda NF-κB protein düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu (P < 0,001), gruplar kendi aralarında değerlendirilmek üzere Tukey – Kramer Testi uygulandı.

Tablo 31: NF-κB ELISA ANOVA Testi Sonuçları

Varyasyon	Sum of Squares	DF	Mean Square
Gruplar arası	5,5319	5	1,1064
Grup içi	0,004500	6	0,0007500
Total	5,5364	11	
F- değeri	1475,164		
Anlamlılık düzeyi	P < 0,001		

Tablo 32: NF-κB ELISA Tukey-Kramer Testi Sonuçları

Grup	n	Geometrik Ortalama	Standart Deviasyon	Değişkenlik oranı (P<0,05)
(1) 1.KONTROL	2	0,5100	0,01414	(3)(4)(5)(6)
(2) 2.AMF	2	0,5200	0,01414	(3)(4)(5)(6)
(3) 3.AMF+TNF	2	0,7600	0,02828	(1)(2)(4)(5)
(4) 4.TNF	2	2,3250	0,04950	(1)(2)(3)(5)(6)
(5) 5.PRE-TNF+POST-AMF	2	1,7200	0,02828	(1)(2)(3)(4)(6)
(6) 6.PRE-AMF+POST-TNF	2	0,8150	0,007071	(1)(2)(4)(5)



Şekil 16: NF-κB ELISA Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği

1. Kontrol Grubunda NF-κB protein düzeyleri AMF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Kontrol Grubunda NF-κB protein düzeyleri AMF + TNF,

TNF, Pre AMF + Post TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

2. AMF Grubunda NF-κB protein düzeyleri Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF Grubunda NF-κB protein düzeyleri AMF + TNF, TNF, Pre TNF + Post AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

3. AMF+TNF Grubunda NF-κB protein düzeyleri Pre AMF + Post TNF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF + TNF Grubunda NF-κB protein düzeyleri Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4. TNF Grubunda NF-κB protein düzeyleri tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05).

5. Pre TNF + Post AMF Grubunda NF-κB protein düzeyleri Kontrol, AMF, AMF + TNF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

6. Pre AMF + Post TNF Grubunda NF-κB protein düzeyleri AMF + TNF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Pre AMF + Post TNF Grubunda NF-κB protein düzeyleri Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4.3.5. ELISA Tek yönlü varyans analizi – VCAM-1

Yapılan ANOVA testi sonucunda VCAM-1 protein düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu (P < 0,001), gruplar kendi aralarında değerlendirilmek üzere Tukey – Kramer Testi uygulandı.

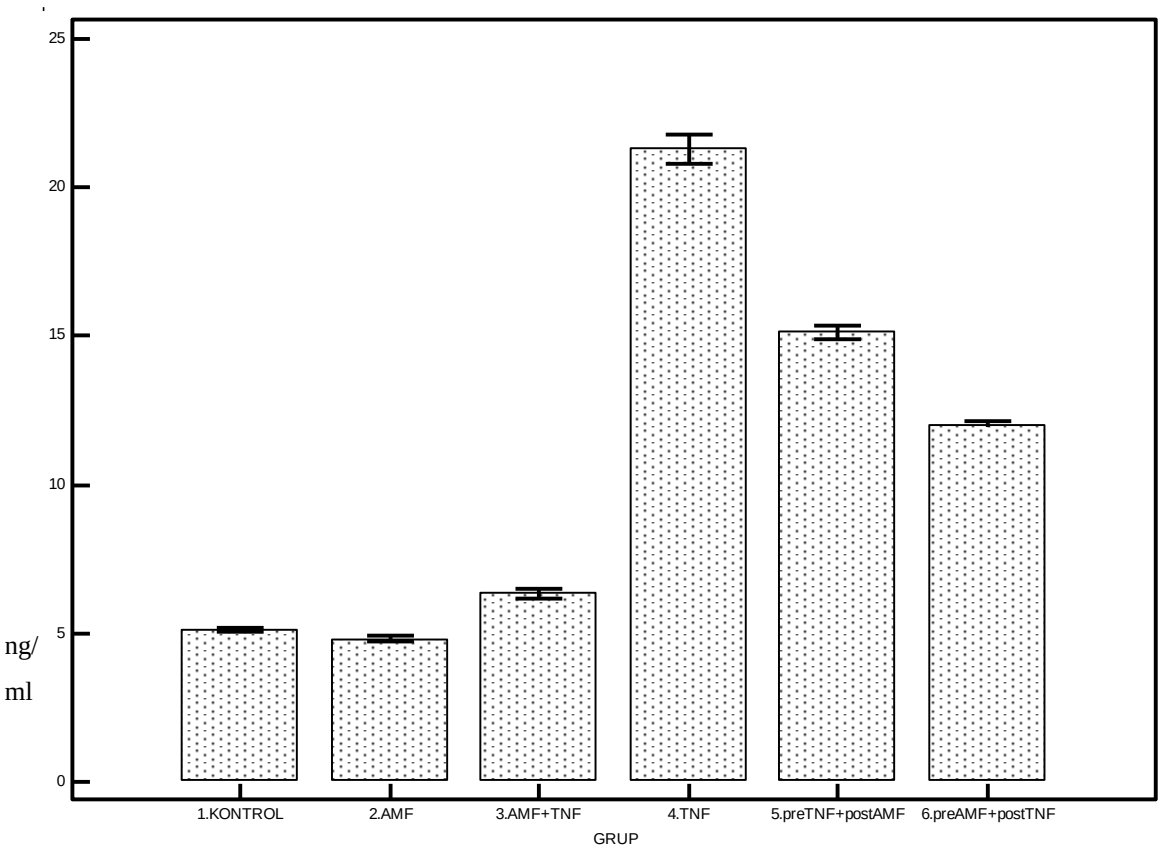
Tablo 33: VCAM-1 ELISA ANOVA Testi Sonuçları

Varyasyon	Sum of Squares	DF	Mean Square

Gruplar arası	437,4274	5	87,4855
Grup içi	0,3532	6	0,05887
Total	437,7806	11	
F- değeri	1486,163		
Anlamlılık düzeyi	P < 0,001		

Tablo 34: VCAM-1 ELISA Tukey-Kramer Testi Sonuçları

Grup	n	Geometrik Ortalama	Standart Deviasyon	Değişkenlik oranı (P<0,05)
(1) 1.KONTROL	2	5,1350	0,06364	(3)(4)(5)(6)
(2) 2.AMF	2	4,8200	0,08485	(3)(4)(5)(6)
(3) 3.AMF+TNF	2	6,3400	0,1556	(1)(2)(4)(5)(6)
(4) 4.TNF	2	21,3150	0,5020	(1)(2)(3)(5)(6)
(5) 5.PRETNF+POSTAMF	2	15,1450	0,2333	(1)(2)(3)(4)(6)
(6) 6.PREAMF+POSTTNF	2	12,0350	0,1061	(1)(2)(3)(4)(5)



Şekil 17: VCAM-1 ELISA Tukey-Kramer Testi Karşılaştırmalı Grafiği

1. Kontrol Grubunda VCAM-1 protein düzeyleri AMF grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). Kontrol Grubunda VCAM-1 protein düzeyleri AMF + TNF, TNF, Pre AMF + Post TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

2. AMF Grubunda VCAM-1 protein düzeyleri Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık göstermemiştir (P>0,05). AMF Grubunda VCAM-1 protein düzeyleri AMF + TNF, TNF, Pre TNF + Post AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

3. AMF+TNF Grubunda VCAM-1 protein düzeyleri Kontrol ve AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF, Pre TNF + Post AMF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu (P<0,05)

4. TNF Grubunda VCAM-1 protein düzeyleri tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek bulundu (P<0,05).

5. Pre TNF + Post AMF Grubunda VCAM-1 protein düzeyleri Kontrol, AMF, AMF + TNF ve Pre AMF + Post TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($P<0,05$)

6. Pre AMF + Post TNF Grubunda VCAM-1 protein düzeyleri Kontrol, AMF ve AMF + TNF gruplarına göre anlamlı olarak daha yüksek, TNF ve Pre TNF + Post AMF gruplarına göre anlamlı olarak daha düşük bulundu ($P<0,05$)

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, insan umbilikal ven endotelyal hücre kültüründeki (HUVEC) hücrelere Tumor Necrosis Factor Alfa (Tümör Nekroz Faktörü Alfa, TNF-α) uygulayarak oluşturduğumuz deneysel inflamasyon/ateroskleroz modelinde amentoflavon uygulaması sonrasında Intercellular Adhesion Molecule – 1 (Hücrelerarası Adezyon Molekülü – 1, ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule – 1 (Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1, VCAM-1) ve Nuclear Factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells (Aktive edilmiş B hücresi nüklear faktör kappa-hafif-zincir artırıcı, NF-κB), IL-6 (interlökin 6) ve IL-8 (interlökin 8) moleküllerinin göreceli mRNA ekspresyon seviyelerini qRT-PCR metodunu kullanarak, protein ekspresyon düzeylerini ELISA metodlarını kullanarak ölçümleyerek amentoflavonun vasküler hasarlanma ve ateroskleroz üzerine olası etkilerini araştırdık.

1971'de Selaginella türünden üç farklı bitkide izole edilmiş olan amentoflavon, bu keşfin sonrasında bir kısmı binlerce yıldır dünyanın farklı yerlerinde geleneksel tıp uygulamalarında kullanılan 120'den fazla bitkiden daha izole edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, amentoflavonun anti-oksidan [127], antiinflamatuar [128], antisenesens [129], antitümor [130], antiviral [131], ve antifungal [132] etkilerinin olduğu gösterilmiş, bunun yanında santral sinir sistemi [133] ve kardiyovasküler sistem [134] üzerinde tedavi edici etkilerinin de bulunduğu ortaya konmuştur. Doğası sayesinde sahip olduğu geniş biyoaktivite sebebiyle amentoflavon, birçok farklı çalışma alanında dikkat çeken bir molekül haline gelmiştir. Sıçanların torasik aortasında yapılan çalışmalarda amentoflavonun; NO bağımlı ve endotel bağımlı vazodilatör etkilerinin olduğu gösterilmiştir [137]. Bunun yanında amentoflavonun vasküler endotelyal hücrelerde sitoprotektif etkileri mevcuttur. Amentoflavon ile tedavi edilen S fazındaki HUVEC hücrelerinin yaşayabilirliği artmıştır [138]. Hücre çalışmalarında alınan bazı sonuçlar amentoflavonun nitrik oksit seviyelerini artırıp VCAM-1, E-selektin, IL-6, IL-8, ve ET1, seviyelerini düşürerek süperoksit dismutaz aktivitesini artırdığını, MDA düzeylerini azalttığını ve VCAM-1, E-selektin, ve NF-κB p65 in protein ekspresyonlarını downregüle ederek vasküler endotel hücreleri koruduğu gösterilmiştir [139]. Apo-E knockout farelerle ICAM-1 knockout farelerin çaprazlandığı çalışmalarda VCAM-1'in aterom plağının olgunlaşmasında önemli görevlerinin olduğu ortaya

konmuştur [152]. ICAM-1 ve VCAM-1'in ekspresyonu immün cevap ve inflamatuar süreçlerde önemli rol oynamaktadırlar.

NF-κB inflamatuar sürece ve metabolik hastalıkların gelişimine katkıda bulunan önemli moleküllerden bir diğeridir. Amentoflavonun aterosklerozdaki vasküler hasarlanmayı düzenleyen etki mekanizmalarından birisi NF-κB yolağını modifiye ederek antiinflamatuar etki göstermesidir. NF-κB, önemli bir proinflamatuar nükleer transkripsiyon faktörü olup primer ve indüklenmiş inflamasyon yanıtlarına katkıda bulunur. NF-κB inhibitör proteinleri indirgeyerek aktive olup DNA'ya bağlanarak hedef genlerin ekspresyonunu artırır. Yapılan çalışmalarda, Visfantin, TNF-α, ve adiponektin gibi adipokinlerin ve adipokin ile azaltılan ya da artırılan monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) , İnterlökin 6 (IL-6), İnterlökin 8 (IL-8), E-selektin, ICAM-1 ve VCAM-1 gibi inflamatuar medyatörlerin salınımının da endotelde NF-κB üzerinden regüle edildiği ortaya konulmuştur. Yapılan çalışmalarda TNF-α'nın ICAM-1, VCAM-1 ve NF-κB ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir [153]. Bizim çalışmamızın çıktıları da bu bulguları desteklemektedir. Yalnızca TNF-α uygulanan grupta ICAM-1, VCAM-1, NF-κB, IL-6 ve IL-8 mRNA ekspresyonları ile protein ekspresyonları; kontrol grubuna ve amentoflavon uygulanan gruplara göre ateroskleroz patogeneziyle uyumlu olacak şekilde anlamlı derecede yüksek saptanmıştır. Bugüne kadar yapılmış olan pek çok farklı çalışmada da TNF-α'nın NF-κB ekspresyonunu artırarak bu yolağı uyardığı bildirilmiştir [154, 155].

Hipotezimize göre, antiinflamatuar, antioksidan ve vasküler hücreler üzerinde sitoprotektif etkisi bulunan amentoflavonun 10 ng/ml TNF-α ile indüklenen HUVEC kültüründe vasküler inflamasyon basamağını tetikleyen NF-κB ekspresyonunu baskılayıcı özellikleri bulunmalıdır. Bunun yanında amentoflavonun inflamasyonda önemli rolleri olduğu bilinen ICAM-1, VCAM-1, IL-6 ve IL-8 düzeylerini de düşürmesi beklenmektedir. Çalışmamızda TNF-α uygulaması ile eş zamanlı ve TNF-α uygulamasından sonra amentoflavon uygulanarak NF-κB yolağı inhibe edilmeye ve inflamasyon basamakları geriye döndürülmeye çalışılmıştır. Bunun yanında TNF-α uygulamasından önce profilaktik olarak amentoflavon uygulanıp molekülün gelişecek endotelyal inflamasyonu önleyip önlemeyeceği de anlaşılmaya çalışılmıştır.

10 ng/ml TNF-α'nın tek başına uygulandığı grupta, ICAM-1, VCAM-1, IL-6, IL-8 ve NF-κB'nin hem qRTPCR göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri hem de ELISA

testinde protein düzeyleri tüm diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (P<0,05). Bu durum 10 ng/ml dozunda TNF-α ile indüklenen hücrelerde başarılı bir şekilde inflamasyonun tetiklendiği ve ilgili tüm medyatörlerin hem mRNA hem de protein ekspresyonlarının arttığı / NF-κB yolağının aktive olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Bunun tam tersine, 20 mikromolar dozunda amentoflavonun tek başına uygulandığı grupta ise ICAM-1, VCAM-1, IL-6, IL-8 ve NF-κB'nin hem qRTPCR göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri hem de ELISA testinde protein düzeyleri açısından kontrol grubuyla arasında anlamlı bir fark olmadığı ortaya konulmuştur (P>0,05). Bu durum amentoflavonun IC50 dozlarında (20 mikromolar) uygulandığında vasküler hücrelere sitotoksik etki açısından güvenli olduğu ve molekülün tek başına uygulanmasının herhangi bir şekilde inflamatuar yanıtı tetiklemediği şeklinde yorumlanmıştır.

20 mikromolar amentoflavonun 10 ng/ml TNF-α ile eş zamanlı, öncesinde ya da sonrasında uygulandığı tüm gruplarda TNF-α'nın tek başına uygulandığı gruba kıyasla ICAM-1, VCAM-1, IL-6, IL-8 ve NF-κB'nin hem qRTPCR göreceli mRNA ekspresyon seviyeleri hem de ELISA testinde protein düzeyleri anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (P<0,05). Bu durum amentoflavonun hem profilaktik olarak sağlıklı hücrelere verilip sonrasında hastalığın geliştiği durumda hastalığı önlemede, hem hastalık başlangıcında verildiğinde tedavi edici – inflamasyon gelişimini durdurucu olarak, hem de inflamasyon geliştikten sonra verildiğinde tedavi edici olarak etki gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Amentoflavon, TNF-α tarafından indüklenen NF-κB ekspresyonunu azalttığından ateroskleroz gelişiminde rol oynayan inflamatuar süreçleri azaltarak, günümüzde halen en önemli ölüm sebeplerinin başında gelen koroner arter hastalığı ve akut miyokard infarktüsü gibi durumların oluşumunu azaltabilir. Vasküler inflamasyonun oluşum mekanizması oldukça kokarmaşıktır ve birden fazla yolağı içermektedir. Oksidatif stres artışı da bu etmenlerden önemli bir tanesidir [156]. Amentoflavonun antioksidan etkisinin ve süperoksit dismutaz aktivitesini artırarak, reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu azaltmasının da bu antiinflamatuar etkiye katkıda bulunduğu düşünülmektedir [127, 139]. Dolayısıyla bu durum amentoflavonun yalnızca NF-κB inhibisyonu üzerinden değil, reaktif oksijen radikali oluşumunu

azaltmasına bağlı oksidatif stresi azaltmasıyla da koroner arter hastalığının önlenmesinde veya tedavisinde faydalı olabileceğini düşündürmektedir.

ICAM-1, endotel hücreleri ve lökositler tarafından normal koşullarda bazal seviyelerde eksprese edilir. Ayrıca; TNF-α, IFN-γ, IL-1 ve LPS gibi inflamatuar uyaranlar ile de ekspresyonu artar [159, 160]. ICAM-1, lökosit transendotelyal göçü ve antijen sunumu sırasında meydana gelen sıkı adezyonu sağlar ve ateroskleroz gelişimine katkıda bulunur [161]. VCAM-1, özellikle yeni oluşan aterom üzerindeki monosit ve T lenfositlere bağlanır [162]. IL-1β veya TNF-α gibi proinflamatuar sitokinler, NF-κB aracılı VCAM-1 transkripsiyonunu indüklemektedir. Bu da; proinflamatuar sitokinler, NF-κB, VCAM-1 ve ateroskleroz arasındaki bağlantıyı anlaşılır kılmaktadır. Çalışmamızda, amentoflavon uygulanan gruplarda hem ICAM-1 hem de VCAM-1'in ekspresyonlarının TNF-α grubuna göre anlamlı derecede ($p<0.05$) azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durum, amentoflavonun hem hücre-hücre bağlantısını hem de hücre-lökosit bağlantısını azaltarak adezyonu önlemeye de katkıda bulunduğu şeklinde yorumlanmıştır. Bu sebeple amentoflavonun etkilerine yalnızca NF-κB tarafından bakılmamalı; diğer intraselüler mekanizmaların da bu etkilerde rol alabileceği ve amentoflavonun kompleks bir düzenleyici olabileceği dikkate alınmalıdır.

Amentoflavon uygulaması yapılan çeşitli çalışmalarda adezyon moleküllerinin ekspresyonunda, NF-κB'nin önemli bir düzenleyici rolünün olduğu ortaya konulmuştur [157, 158]. Vasküler inflamasyon ve ateroskleroz patogenezinde önemli rol oynayan adezyon moleküllerinin mRNA ve protein ekspresyonundaki azalmanın en olası sebebi, amentoflavon uygulamasının NF-κB ekspresyonunu azaltmasıdır. VCAM-1 gen ekspresyonunun regülasyonu, NF-κB aracılığı ile oksidatif strese eşlik etmektedir. VCAM-1 in sitokin ile aktiflenen endotelyal ekspresyonu, NF-κB mobilizasyonunun antioksidanlar tarafından baskılanmasıyla inhibe edilirler. NF-κB aktivasyonu, endotelyal hücrelerde adezyon moleküllerinin transkripsiyonlarının indüksiyonu için önem arz etmektedir.

TNF-α uygulaması öncesinde profilaktik ya da TNF-α ile eş zamanlı uygulanan amentoflavon, ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonlarını tek başına TNF-α uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede düşürmüştür ($p<0.05$). TNF-α uygulamasından sonra verilen amentoflavon da ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonlarını tek başına TNF-α uygulanan gruba kıyasla anlamlı derecede düşürmüştür ($p<0.05$). Ancak bu düşüş

amentoflavonun eş zamanlı yahut profilaktik uygulandığı durum kadar yüksek değildir. ICAM-1 ve VCAM-1 seviyelerindeki düşüşler yüksek ihtimalle NF-κB üzerindeki inhibitör etki ile bağlantılıdır. Ancak yine de 20 mikromolar amentoflavon uygulaması, ICAM-1 ve VCAM-1 ekspresyonlarını kontrol grubu ve tek başına amentoflavon grupları seviyesine getirememiştir. Uygulama sürelerini artırmak veya ardışık uygulamalar yapmak bu etkiyi daha doğru saptayabilmek açısından daha doğru bir yaklaşım olabilir.

B hücre stimülan faktörü ya da B hücre farklılaştırıcı faktörü olarak da adlandırılan İnterlökin 6 (IL-6), temelde T lenfositlerden eksprese edilen ve B lenfositlerin farklılaşmasını sağlayan 26 kD ağırlığında bir sitokin molekülüdür. IL-6, monositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, B lenfositler, astrositler, mezengial hücreler gibi hücreler tarafından da eksprese edilebilmektedir. IL-6'nın organizmadaki en önemli görevi B lenfositlerde proliferasyonu uyarmadan diferansiyasyonu ve antikor salınımını uyarmasıdır. IL-1 gibi IL-6'da fibrinojen gibi akut faz yanıtına katılan çeşitli plazma proteinlerinin hepatositler tarafından sentezlenmesini uyarır. Aynı zamanda IL-6, kronik inflamasyonun da önemli bir medyatörüdür [123].

Amentoflavon uygulanan grupların tümünde IL-6 düzeylerinde TNF-α grubuna göre anlamlı oranda düşüş saptanmıştır ($p<0.05$). Amentoflavonun TNF-α ile eş zamanlı veya profilaktik uygulamasının, IL-6 mRNA ve protein düzeylerini kontrol grubu seviyelerine çektiği görülmüştür. Bunun yanında amentoflavonun tek başına uygulandığı durumda IL-6 mRNA seviyesi kontrol grubunun bile altına düşmüştür. Bu durum, amentoflavon uygulamasının akut faz yanıtını ve IL-6'nın kronik inflamasyondaki etkilerini de azaltabileceğini düşündürmektedir.

Nötrofil kemotaktik faktör olarak da isimlendirilen IL-8 etkisini özellikle nötrofiller üzerinde gösteren yaklaşık 8-10 kD ağırlığında bir sitokin molekülüdür. LPS, TNF-α veya IL-1 gibi sitokinler ile uyarılmış mononükleer fagositler, endotel ya da epitel hücreleri ve fibroblastlar tarafından eksprese edilirler. IL-8 özellikle, nötrofiller ve daha az oranda da eozinofil, bazofil, lenfosit gibi hücreler için stimülan ve kemotaktik bir moleküldür. IL-8'in deneysel olarak doku içine enjeksiyonu inflamatuar yanıt meydana getirir. TNF-α ve IL-1'in başlattığı nötrofil aktivasyonunun çok büyük oranda bu moleküllerce stimüle edilen IL-8 ve ilişkili proteinlerin ekspresyonuna bağlı olduğu ortaya konmuştur. Bu sebeple IL-8 inflamasyonun en önemli sekonder medyatörü olarak gösterilmektedir [124].

Amentoflavon uygulanan tüm gruplarda TNF-α grubuna kıyasla IL-8 mRNA ve protein ekspresyonlarında anlamlı bir düşüş meydana gelmiştir ($p<0.05$). Bu düşüşler amentoflavonun TNF-α ile eş zamanlı ya da profilaktik olarak önden uygulandığı durumlarda daha dramatik düzeylerde meydana gelmiştir. Bu durum bize amentoflavonun antiinflamatuar etkinliğinin sadece NF-κB yolu ve ICAM-1, VCAM-1 gibi adezyon molekülleri üzerinden değil, aynı zamanda nötrofil ve makrofaj kemotaksisini de modifiye ederek hücresel inflamatuar yanıtları da azalttığını düşündürmüştür.

Çalışmamızda insan umbilikal ven endotelyal hücreleri üzerine kısa süreli amentoflavon uygulaması yapılarak, amentoflavonun inflamatuar süreçler üzerine olan akut etkisi değerlendirilmiştir. Amentoflavonun uzun süreli ve kronik uygulamalarına dair henüz net bilgiler bulunmamakla birlikte; amentoflavonun ateroskleroz kökenli hastalıkların profilaksi ve tedavisinde NF-κB yolağındaki adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak etkili olabileceği düşünülebilir. Bu sebeple, amentoflavonun etkinliği ve ateroskleroz patogenezi üzerine etkilerini daha detaylı inceleyecek ve altta yatan moleküler mekanizmaları ortaya koyacak yeni deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmanın limitasyonları: Doktora tez projesi bütçesinin yetersiz kalmasından ötürü Western Blot ve immünfluoresan boyama işlemleri gerçekleştirilememiştir. Bu sebeple ELISA testlerinin sonuçları farklı metodlarla doğrulanamamıştır. Bunun yanında amentoflavonun NF-κB yolağının aktivasyonunu ve TNF-α' ya yanıt olarak ICAM-1, VCAM-1, IL-6 ve IL-8 ekspresyonlarını hangi hücresel mekanizmalarla inhibe ettiği araştırılamamıştır. Bu mekanizmaların ileriki çalışmalarla aydınlatılması amentoflavonun hücresel etkilerini daha iyi anlamamıza olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Ramji, D.P. and T.S. Davies, Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. Cytokine Growth Factor Rev, 2015.
2. ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction presenting st segment elevation. Eur Heart J, 2012. 33(20): p.2569-619
3. Ross, R. and J.A. Glomset, The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). N Engl J Med, 1976. 295(8): p. 420-5.
4. Effect of Citrus Flavonoids, Naringin and Naringenin, on Metabolic Syndrome and Their Mechanisms of Action. M. Ashraful Alam et al. 2014 American Society for Nutrition. Adv. Nutr. 5: 404–417, 2014; doi:10.3945/an.113.005603
5. Flavonoids: an overview, A.N. Panche et al. Journal of Nutritional Science (2016), vol. 5, e47, page 1 of 15
6. Flavones Mitigate Tumor Necrosis Factor Alfa Induced Adhesion Molecule Upregulation in Cultured Human Endothelial Cells: Role of Nuclear Factor-B1, Jung-Suk Choi, Yean-Jung Choi, Sung-Hee Park, Jung-Sook Kang, and Young-Hee Kang, J. Nutr. 134: 1013–1019, 2004.
7. Flavanone metabolites decrease monocyte adhesion to TNF-α -activated endothelial cells by modulating expression of atherosclerosis-related genes, Audrey Chanet et al. British Journal of Nutrition (2013), 110, 587–598
8. The Biflavonoid Amentoflavone Inhibits Neovascularization Preventing the Activity of Proangiogenic Vascular Endothelial Growth Factors, Valeria Tarallo et al. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 286, NO. 22, pp. 19641–19651, June 3, 201
9. Timmermans WMC, Laar JAM, Hagen PM. Immunopathogenesis of granulomas in chronic autoinflammatory diseases. Clin & Transl Immunology, 2016, 5: 118.
10. Kuzu MA. İnflamasyon, sistemik inflamatuar yanıt sendromu ve peritonitin fizyopatolojisi. Hastane infeksiyonları Dergisi, 2001, 5: 69-83.
11. Patrick KK. Inflammatory responses and mediators. Surg Clin North Am, 2000, 8: 885-894.
12. Napolitano LM, Faist E. Immune Dysfunction in Trauma. Surg Clin North Am, 1999, 79: 1385-1416. 81
13. Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. Annals Surg, 1992, 216: 117-134.
14. Davies MG. Systemic Inflammatory Response Syndrome. Br J Surg 1997, 84: 920-935.
15. Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D. Antimicrobial effect of linalool and aterpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. Anaerobe, 2012, 18: 369-372.

16. Bouzabata A, Cabral C, Goncalves MJ, Cruz MT, Bighelli A, Cavaleiro C, Casanova J, Tomi F, Salgueiro L. Myrtus communis L. as source of a bioactive and safe essential oil. Food Chem Toxicol, 2015, 75: 166-172
17. Barreto RSS, Albuquerque-Júnior RLC , Araújo AAS. A systematic review of the wound-healing effects of monoterpenes and iridoid derivatives. Molecules, 2014, 19: 846-862.
18. Onat, A., et al., [Turkish Adult Risk Factor survey 2014: Overall mortality and coronary disease incidence in Turkey's geographic regions]. Turk Kardiyol Dern Ars, 2015. 43(4): p. 326-32.
19. Kotseva K et al., EUROASPIRE IV: A European Society of Cardiology survey on the lifestyle, risk factor and therapeutic management of coronary patients from 24 European countries. Eur J Prev Cardiol. 2016 Apr;23(6):636-48. doi: 10.1177/2047487315569401. Epub 2015 Feb 16.
20. Lee, K.W., et al., Circulating endothelial cells, von Willebrand factor, interleukin-6, and prognosis in patients with acute coronary syndromes. Blood, 2005. 105(2): p. 526-32.
21. 7. Lerman, A. and A.M. Zeiher, Endothelial function: cardiac events. Circulation, 2005. 111(3): p. 363-8.
22. Davignon, J. and P. Ganz, Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation, 2004. 109(23 Suppl 1): p. III27-32
23. Williams, K.J. and I. Tabas, The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. 15(5): p. 551-61.
24. Landmesser, U., B. Hornig, and H. Drexler, Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? Circulation, 2004. 109(21 Suppl 1): p. II27-33.
25. Tsao, P.S., et al., Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1. Circulation, 1997. 96(3): p. 934-40.
26. De Caterina, R., et al., Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. J Clin Invest, 1995. 96(1): p. 60-8.
27. Li, H. and U. Forstermann, Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J Pathol, 2000. 190(3): p. 244-54.
28. Libby, P., P.M. Ridker, and A. Maseri, Inflammation and atherosclerosis. Circulation, 2002. 105(9): p. 1135-43.
29. Steinberg, D., et al., Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. N Engl J Med, 1989. 320(14): p. 915-24.
30. Miller, Y.I., et al., Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. 25(6): p. 1213-9.
31. Aviram, M., et al., Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. J Clin Invest, 1998. 101(8): p. 1581-90.
32. Jara, L.J., et al., Accelerated atherosclerosis, immune response and autoimmune rheumatic diseases. Autoimmun Rev, 2006. 5(3): p. 195-201.

33. Stary, H.C., et al., A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler Thromb, 1992. 12(1): p. 120-34.78
34. Guyton, J.R. and K.F. Klemp, Transitional features in human atherosclerosis. Intimal thickening, cholesterol clefts, and cell loss in human aortic fatty streaks. Am J Pathol, 1993. 143(5): p. 1444-57.
35. Nakashima, Y., et al., Distributions of diffuse intimal thickening in human arteries: preferential expression in atherosclerosis-prone arteries from an early age. Virchows Arch, 2002. 441(3): p. 279-88.
36. Olin-Lewis, K., et al., ApoC-III content of apoB-containing lipoproteins is associated with binding to the vascular proteoglycan biglycan. J Lipid Res, 2002. 43(11): p. 1969-77.
37. Faggiotto, A., R. Ross, and L. Harker, Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. Arteriosclerosis, 1984. 4(4): p. 323-40.
38. Morel, D.W., P.E. DiCorleto, and G.M. Chisolm, Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. Arteriosclerosis, 1984. 4(4): p. 357-64.
39. Parthasarathy, S., et al., Macrophage oxidation of low density lipoprotein generates a modified form recognized by the scavenger receptor. Arteriosclerosis, 1986. 6(5): p. 505-10.
40. Libby, P., Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation, 2001. 104(3): p. 365-72.
41. Greaves, D.R. and S. Gordon, The macrophage scavenger receptor at 30 years of age: current knowledge and future challenges. J Lipid Res, 2009. 50 Suppl: p. S282-6.
42. Klouche, M., et al., Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. Circulation, 2000. 101(15): p. 1799-805.
43. Shiffman, D., et al., Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages. J Biol Chem, 2000. 275(48): p. 37324-32.
44. Warner, G.J., et al., Cell toxicity induced by inhibition of acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferase and accumulation of unesterified cholesterol. J Biol Chem, 1995. 270(11): p. 5772-8.
45. Ball, R.Y., et al., Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. Atherosclerosis, 1995. 114(1): p. 45-54.
46. Falk, E., Pathogenesis of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol, 2006. 47(8 Suppl): p. C7-12.
47. Rajendran, P., et al., The vascular endothelium and human diseases. Int J Biol Sci, 2013. 9(10): p. 1057-69.
48. Rubanyi, G.M. and P.M. Vanhoutte, Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. Am J Physiol, 1986. 250(5 Pt 2): p. H822-7.
49. Devaraj, S., U. Singh, and I. Jialal, The evolving role of C-reactive protein in atherothrombosis. Clin Chem, 2009. 55(2): p. 229-38.

50. Landmesser, U., B. Hornig, and H. Drexler, Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? Circulation, 2004. 109(21 Suppl 1): p. II27-33.
51. Pasceri, V., J.T. Willerson, and E.T. Yeh, Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. Circulation, 2000. 102(18): p. 2165-8.
52. Eizawa, H., et al., Lysophosphatidylcholine inhibits endothelium-dependent hyperpolarization and N omega-nitro-L-arginine/indomethacin-resistant endothelium-dependent relaxation in the porcine coronary artery. Circulation, 1995. 92(12): p. 3520-6.
53. Chan, H., et al., Oxidized low-density lipoprotein inhibits endothelium-dependent vasodilation by an antioxidant-sensitive, lysophosphatidylcholine-independent mechanism. J Cardiovasc Pharmacol, 2003. 41(6): p. 856-65.
54. Behrendt, D. and P. Ganz, Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. Am J Cardiol, 2002. 90(10C): p. 40L-48L.
55. Lim, S. and S. Park, Role of vascular smooth muscle cell in the inflammation of atherosclerosis. BMB Rep, 2014. 47(1): p. 1-7.
56. Nording, H.M., P. Seizer, and H.F. Langer, Platelets in inflammation and atherogenesis. Front Immunol, 2015. 6: p. 98.
57. Galkina, E. and K. Ley, Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). Annu Rev Immunol, 2009. 27: p. 165-97.
58. Kuijper, P.H., et al., Platelet-dependent primary hemostasis promotes selectin- and integrin-mediated neutrophil adhesion to damaged endothelium under flow conditions. Blood, 1996. 87(8): p. 3271-81.
59. Simon, D.I., et al., Platelet glycoprotein ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). J Exp Med, 2000. 192(2): p. 193-204.
60. Manthey, H.D. and A. Zernecke, Dendritic cells in atherosclerosis: functions in immune regulation and beyond. Thromb Haemost, 2011. 106(5): p. 772-8.
61. Singh, R.B., et al., Pathogenesis of atherosclerosis: A multifactorial process. Exp Clin Cardiol, 2002. 7(1): p. 40-53.
62. Mayerl, C., et al., Atherosclerosis research from past to present--on the track of two pathologists with opposing views, Carl von Rokitansky and Rudolf Virchow. Virchows Arch, 2006. 449(1): p. 96-103.
63. VCAM-1 Signals During Lymphocyte Migration: Role of Reactive Oxygen Species Joan M Cook-Mills Mol Immunol. 2002 Dec;39(9):499-508
64. Nakashima, Y., et al., Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. 18(5): p. 842-51.
65. Fitzgibbons, T.P. and M.P. Czech, Epicardial and perivascular adipose tissues and their influence on cardiovascular disease: basic mechanisms and clinical associations. J Am Heart Assoc, 2014. 3(2): p. e000582.
66. Almabrouk, T.A., et al., Perivascular fat, AMP-activated protein kinase and vascular diseases. Br J Pharmacol, 2014. 171(3): p. 595-617.

67. Preiss, D.J. and N. Sattar, Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis? Int J Clin Pract, 2007. 61(4): p. 697-701.
68. Martinez-Lemus, L.A., The dynamic structure of arterioles. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012. 110(1): p. 5-11.
69. 44. Stenmark, K.R., et al., The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. Annu Rev Physiol, 2013. 75: p. 23-47.
70. Saren, P., H.G. Welgus, and P.T. Kovanen, TNF-alpha and IL-1beta selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. J Immunol, 1996. 157(9): p. 4159-65
71. Kovanen, P.T., M. Kaartinen, and T. Paavonen, Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. Circulation, 1995. 92(5): p. 1084-8.
72. Navab, M., et al., High density associated enzymes: their role in vascular biology. Curr Opin Lipidol, 1998. 9(5): p. 449-56.
73. Carlson, M., et al., Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pMCT108.2) on chromosome 18 [D18S24]. Nucleic Acids Res, 1988. 16(9): p. 4188.
74. Katz, F.E., et al., Chromosome mapping of cell membrane antigens expressed on activated B cells. Eur J Immunol, 1985. 15(1): p. 103-6.
75. Pober, J.S., et al., Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. J Immunol, 1986. 137(6): p. 1893-6.
76. Dustin, M.L., et al., Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). J. Immunol. 1986. 137: 245-254. J Immunol, 2011. 186(9): p. 5024-33.
77. Sampath, R., et al., Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. Ann Biomed Eng, 1995. 23(3): p. 247-56.
78. Cronstein, B.N., et al., A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(21): p. 9991-5.
79. Renkonen, R., et al., IL-4 decreases IFN-gamma-induced endothelial ICAM-1 expression by a transcriptional mechanism. Scand J Immunol, 1992. 35(5): p. 525-30.
80. Wolf S.I. , L.C., ICAM-1: Contribution to Vascular Inflammation and Early Atherosclerosis, in Coronary Artery Disease - New Insights and Novel Approaches. 2012, IntechOpen. p. 65-90
81. Blankenberg, S., S. Barbaux, and L. Tiret, Adhesion molecules and atherosclerosis. Atherosclerosis, 2003. 170(2): p. 191-203.
82. Greenwood, J., Y. Wang, and V.L. Calder, Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. off. Immunology, 1995. 86(3): p. 408-15.

83. Reiss, Y. and B. Engelhardt, T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2. Int Immunol, 1999. 11(9): p. 1527-39.
84. Lehmann, J.C., et al., Overlapping and selective roles of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in lymphocyte trafficking. J Immunol, 2003. 171(5): p. 2588-93.
85. Barreiro, O., et al., Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. J Cell Biol, 2002. 157(7): p. 1233-45.
86. Van Buul, J.D. and P.L. Hordijk, Signaling in leukocyte transendothelial migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004. 24(5): p. 824-33.
87. Springer, T.A., Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annu Rev Physiol, 1995. 57: p. 827-72.
88. Grakoui, A., et al., The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. Science, 1999. 285(5425): p. 221-7.
89. Chen, C., et al., High affinity very late antigen-4 subsets expressed on T cells are mandatory for spontaneous adhesion strengthening but not for rolling on VCAM-1 in shear flow. J Immunol, 1999. 162(2): p. 1084-95.
90. Nakashima, Y., et al., Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the Apo-E-deficient mouse. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. 18(5): p. 842-51.
91. O'Brien, K.D., et al., Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. J Clin Invest, 1993. 92(2): p. 945-51.
92. Ramos, C.L., et al., Direct demonstration of P-selectin- and VCAM-1-dependent mononuclear cell rolling in early atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. Circ Res, 1999. 84(11): p. 1237-44.
93. Gurtner, G.C., et al., Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. Genes Dev, 1995. 9(1): p. 1-14.
94. Ley, K. and Y. Huo, VCAM-1 is critical in atherosclerosis. J Clin Invest, 2001. 107(10): p. 1209-10.
95. Gilmore, T.D., Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. Oncogene, 2006. 25(51): p. 6680-4.
96. Brasier, A.R., The NF-kappaB regulatory network. Cardiovasc Toxicol, 2006. 6(2): p. 111-30.
97. Perkins, N.D., Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. 8(1): p. 49-62.
98. Gilmore, T.D., The Rel/NF-kappaB signal transduction pathway: introduction. Oncogene, 1999. 18(49): p. 6842-4.
99. Albensi, B.C. and M.P. Mattson, Evidence for the involvement of TNF and NF-kappaB in hippocampal synaptic plasticity. Synapse, 2000. 35(2): p. 151-9.
100. Meffert, M.K., et al., NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. Nat Neurosci, 2003. 6(10): p. 1072-8.

101. Levenson, J.M., et al., A bioinformatics analysis of memory consolidation reveals involvement of the transcription factor c-rel. J Neurosci, 2004. 24(16): p. 3933-43.
102. Merlo, E., R. Freudenthal, and A. Romano, The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab Chasmagnathus. Neuroscience, 2002. 112(1): p. 161-72.
103. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 621-63.
104. Senftleben, U., et al., Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. Science, 2001. 293(5534): p. 1495-9.
105. Plaksin, D., P.A. Baeuerle, and L. Eisenbach, KBF1 (p50 NF-kappa B homodimer) acts as a repressor of H-2Kb gene expression in metastatic tumor cells. J Exp Med, 1993. 177(6): p. 1651-62.
106. Guan, H., S. Hou, and R.P. Ricciardi, DNA binding of repressor nuclear factor-kappaB p50/p50 depends on phosphorylation of Ser337 by the protein kinase A catalytic subunit. J Biol Chem, 2005. 280(11): p. 9957-62.
107. Sen, R. and D. Baltimore, Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. Cell 1986. 46: 705-716. J Immunol, 2006. 177(11): p. 7485-96.
108. Doyle, S.L. and L.A. O'Neill, Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. Biochem Pharmacol, 2006. 72(9): p. 1102-13.83
109. Collins, T., et al., Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. FASEB J, 1995. 9(10): p. 899-909.
110. Hoffmann, A., G. Natoli, and G. Ghosh, Transcriptional regulation via the NF-kappaB signaling module. Oncogene, 2006. 25(51): p. 6706-16.
111. Srivastava, S.K. and K.V. Ramana, Focus on molecules: nuclear factor-kappaB. Exp Eye Res, 2009. 88(1): p. 2-3.
112. Scott, M.L., et al., The p65 subunit of NF-kappa B regulates I kappa B by two distinct mechanisms. Genes Dev, 1993. 7(7A): p. 1266-76.
113. Kearns, J.D., et al., IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. J Cell Biol, 2006.
114. Barath, P., et al., Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. Am J Pathol, 1990. 137(3): p. 503-9.
115. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature, 1993. 362(6423): p. 801-9.
116. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, Function and activation of NF-kappa B in the immune system. Annu Rev Immunol, 1994. 12: p. 141-79.
117. Qwarnstrom, E.E., et al., Fibronectin attachment activates the NF-kappa B p50/p65 heterodimer in fibroblasts and smooth muscle cells. J Biol Chem, 1994. 269(49): p. 30765-8.

118. Witztum, J.L. and D. Steinberg, Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. J Clin Invest, 1991. 88(6): p. 1785-92.
119. Parhami, F., et al., Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. J Clin Invest, 1993. 92(1): p. 471-8.
120. Peng, H.B., et al., Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. J Biol Chem, 1995. 270(28): p. 17050-5.
121. Collins, T., Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. Lab Invest, 1993. 68(5): p. 499-508.
122. Idriss HT1, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). Microsc Res Tech. 2000 Aug 1;50(3):184-95.
123. Toshio Tanaka et al., IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease, Cold Spring Harb Perspect Biol. 2014 Oct; 6(10): a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295 PMCID: PMC4176007 PMID: 25190079
124. Bickel M1. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. J Periodontol. 1993 May;64(5 Suppl):456-60.
125. Ahmet KAHRAMAN et al., Afyon Kocatepe Universitesi Flavonoids The Medical Journal of Kocatepe (2002), 3, 01-08 2002
126. Calvo, T.R.; Lima, Z.P.; Silva, J.S.; Ballesteros, K.V.; Pellizzon, C.H.; Hiruma-Lima, C.A.; Tamashiro, J.; Brito, A.R.; Takahira, R.K.; Vilegas,W. Constituents and antiulcer effect of Alchornea glandulosa: Activation of cell proliferation in gastric mucosa during the healing process. Biol. Pharm. Bull. 2007, 30, 451–459.
127. Calvo, T.R.; Demarco, D.; Santos, F.V.; Moraes, H.P.; Bauab, T.M.; Varanda, E.A.; Cólus, I.M.; Vilegas,W. Phenolic compounds in leaves of Alchornea triplinervia: Anatomical localization, mutagenicity, and antibacterial activity. Nat. Prod. Commun. 2010, 5, 1225–1232.
128. Li, L.Z.;Wang, M.H.; Sun, J.B.; Liang, J.Y. Flavonoids and other constituents from Aletris spicata and their chemotaxonomic significance. Nat. Prod. Res. 2014, 28, 1214–1217.
129. Azebaze, A.G.; Dongmo, A.B.; Meyer, M.; Ouahouo, B.M.; Valentin, A.; Nguemfo, E.L.; Nkengfack, A.E.; Vierling,W. Antimalarial and vasorelaxant constituents of the leaves of Allanblackia monticola (Guttiferae). Ann. Trop. Med. Parasitol. 2007, 101, 23–30.
130. Wang, W.J.; Lei, J.; Xiao, Y.C.; Xi, Z.; Yu, M.; Huang, J. The separation and indentification of biflavonoids from Androsace umbellata. West China J. Pharm. Sci. 2011, 26, 420–423.
131. Trang, D.T.; Huyen, L.T.; Nhiem, N.X.; Quang, T.H.; Hang, D.T.T.; Yen, P.H.; Tai, B.H.; Anh, H.L.T.; Binh, N.Q.; Minh, C.V.; Kiem, P.V. Tirucallane glycoside from the leaves of Antidesma bunius and inhibitory NO production in BV2 cells and RAW264.7 macrophages. Nat. Prod. Commun. 2016, 11, 935–937.

132. Tchinda, A.T.; Teshome, A.; Dagne, E.; Arnold, N.; Wessjohann, L.A. Squalene and amentoflavone from Antidesma laciniatum. Bull. Chem. Soc. Ethiop. 2006, 20, 325–328
133. Bucar, F.; Jackak, S.M.; Noreen, Y.; Kartnig, T.; Perera, P.; Bohlin, L.; Schubert-Zsilavecz, M. Amentoflavone from Biophytum sensitivum and its effect on COX-1/COX-2 catalysed prostaglandin biosynthesis. Planta Med. 1998, 64, 373–374.
134. Sajjad, A.; Andrabi, S.M.A.; Qureshi, M. Flavonoids from Biota semipervirens. Indian J. Heterocycl. Chem. 2001,11, 87.
135. Sannomiya, M.; Fonseca, V.B.; da Silva, M.A.; Rocha, L.R.M.; dos Santos, L.C.; Hiruma-Lima, C.A.; Brito, A.R.M.S.; Vilegas,W. Flavonoids and antiulcerogenic activity from Byrsonima crassa leaves extracts. J. Ethnopharmacol. 2005, 97, 1–6.
136. Sannomiya, M.; Cardoso, C.R.; Figueiredo, M.E.; Rodrigues, C.M.; dos Santos, L.C.; dos Santos, F.V.; Serpeloni, J.M.; Cólus, I.M.; Vilegas, W.; Varanda, E.A. Mutagenic evaluation and chemical investigation of Byrsonima intermedia A. Juss. leaf extracts. J. Ethnopharmacol. 2007, 112, 319–326.
137. Bahia, M.V.; David, J.P.; David, J.M. Occurrence of biflavones in leaves of Caesalpinia pyramidalis specimens. Quim. Nova 2010, 33, 1297–1300.
138. Prasad, J.S.; Krishnamurty, H.G. 4-Epiisocommunic acid and amentoflavone from Callitris rhomboidea. Phytochemistry 1977, 16, 801–803
139. Chien, S.C.; Liu, H.K.; Kuo, Y.H. Two new compouuds from the leaves of Calocedrus microlepic var. formosana. Chem. Pharm. Bull. 2004, 52, 762–763.
140. Da Silva, K.L.; dos Santos, A.R.S.; Mattos, P.E.O.; Yunes, R.A.; Delle-Monache, F.; Cechinel, V. Chemical composition and analgesic activity of Calophyllum brasiliense leaves. Therapie 2001, 56, 431–434.
141. Ndongo, J.T.; Issa, M.E.; Messi, A.N.; Mbing, J.N.; Cuendet, M.; Pegnyemb, D.E.; Bochet, C.G. Cytotoxic flavonoids and other constituents from the stem bark of Ochna schweinfurthiana. Nat. Prod. Res. 2015, 29, 1684–1687.
142. Pei, J.S.; Liu, C.C.; Hsu, Y.N.; Lin, L.L.;Wang, S.C.; Chung, J.G.; Bau, D.T.; Lin, S.S. Amentoflavone induces cell-cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells via mitochondria-dependent pathway. In Vivo 2012, 26, 963–970.
143. Siveen, K.S.; Kuttan, G. Effect of Amentoflavone, a phenolic component from Biophytum sensitivum, on cell cycling and apoptosis of B16F-10 melanoma cells. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 2011, 30, 301–309.
144. Park, N.H.; Lee, C.W.; Bae, J.H.; Na, Y.J. Protective effects of amentoflavone on Lamin A-dependent UVB-induced nuclear aberration in normal human fibroblasts. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011, 21, 6482–6484.
145. Lee, C.W.; Na, Y.; Park, N.H.; Kim, H.S.; Ahn, S.M.; Kim, J.W.; Kim, H.K.; Jang, Y.P. Amentoflavone inhibits UVB-induced matrix metalloproteinase-1 expression through the modulation of AP-1 components in normal human fibroblasts. Appl. Biochem. Biotechnol. 2012, 166, 1137–1147.

146. Zheng, X.K.; Su, C.F.; Zhang, L.; Gao, A.S.; Ke, Y.Y.; Yuan, P.P.;Wang, X.L.; Zhang, X.; Feng,W.S. Anti-diabetic activity of amentoflavone in Selaginella tamariscina in diabetic mice. Chin. J. Exp. Tradit. Med. Formuae 2013, 19, 198–202.
147. Coulerie, P.; Nour, M.; Maciuk, A.; Eydoux, C.; Guillemot, J.C.; Lebouvier, N.; Hnawia, E.; Leblanc, K.; Lewin, G.; Canard, B.; et al. Structure-activity relationship study of biflavonoids on the Dengue virus polymerase DENV-NS5 RdRp. Planta Med. 2013, 79, 1313–1318.
148. Lin, Y.M.; Anderson, H.; Flavin, M.T.; Pai, Y.H.; Mata-Greenwood, E.; Pengsuparp, T.; Pezzuto, J.M.; Schinazi, R.F.; Hughes, S.H.; Chen, F.C. In vitro anti-HIV activity of biflavonoids isolated from Rhus succedanea and Garcinia multiflora. J. Nat. Prod. 1997, 60, 884–888
149. Ma, S.C.; But, P.P.H.; Ooi, V.E.C.; He, Y.H.; Lee, S.H.S.; Lee, S.F.; Lin, R.C. Antiviral amentoflavone from Selaginella sinensis. Biol. Pharm. Bull. 2001, 24, 311–312.
150. Jung, H.J.; Sung, W.S.; Yeo, S.H.; Kim, H.S.; Lee, I.S.; Woo, E.R.; Lee, D.G. Antifungal effect of amentoflavone derived from Selaginella tamariscina. Arch. Pharm. Res. 2006, 29, 746–751.
151. Hwang, I.S.; Lee, J.; Jin, H.G.; Woo, E.R.; Lee, D.G. Amentoflavone stimulates mitochondrial dysfunction and induces apoptotic cell death in Candida albicans. Mycopathologia 2012, 173, 207–218.
152. Cybulsky, M.I., et al., A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. J Clin Invest, 2001. 107(10): p. 1255-62.
153. Zhong, X., et al., Omentin inhibits TNF-α-induced expression of adhesion molecules in endothelial cells via ERK/NF-kappaB pathway. Biochem Biophys Res Commun, 2012. 425(2): p. 401-6.
154. Baeuerle, P.A. and T. Henkel, Function and activation of NF-kappa B in the immune system. Annu Rev Immunol, 1994. 12: p. 141-79.
155. Collins, T., Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. Lab Invest, 1993. 68(5): p. 499-508.
156. Joddar, B., et al., Protandim attenuates intimal hyperplasia in human saphenous veins cultured ex vivo via a catalase-dependent pathway. Free Radic Biol Med, 2011. 50(6): p. 700-9.
157. Zhang, W., et al., Sphingosine-1-phosphate receptor-2 mediated NFkappaB activation contributes to tumor necrosis factor-alpha induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in endothelial cells. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2013. 106: p. 62-71.
158. Valen, G., Z.Q. Yan, and G.K. Hansson, Nuclear factor kappa-B and the heart. J Am Coll Cardiol, 2001. 38(2): p. 307-14.
159. Pober, J.S., et al., Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. J Immunol, 1986. 137(6): p. 1893-6.
160. Sampath, R., et al., Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro. Ann Biomed Eng, 1995. 23(3): p. 247-56.

161. Springer, T.A., Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annu Rev Physiol, 1995. 57: p. 827-72.
162. Libby, P., Inflammation in atherosclerosis. Nature, 2002. 420(6917): p. 868-74.
163. Gökhan Terzioğlu et. Al., Turk J Immunol 2013;1(3):74-89 Turkish Journal of Immunology Measurement Methods of Cell Proliferation and a Comparison of Various Commercial Proliferation Kits
164. Clinton, S.K., et al., Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. Am J Pathol, 1992. 140(2): p. 301-16.
165. Rosenfeld, M.E., et al., Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. Am J Pathol, 1992. 140(2): p. 291-300.
166. Smith, J.D., et al., Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(18): p. 8264-8.
167. Rajavashisth, T., et al., Heterozygous osteopetrotic (op) mutation reduces atherosclerosis in LDL receptor- deficient mice. J Clin Invest, 1998. 101(12): p. 2702-10.
168. Sugiyama, S., et al., Macrophage myeloperoxidase regulation by granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human atherosclerosis and implications in acute coronary syndromes. Am J Pathol, 2001. 158(3): p. 879-91.
169. Virmani, R., et al., Pathology of the unstable plaque. Prog Cardiovasc Dis, 2002. 44(5): p. 349-56.
170. Brogi, E., et al., Distinct patterns of expression of fibroblast growth factors and their receptors in human atheroma and nonatherosclerotic arteries. Association of acidic FGF with plaque microvessels and macrophages. J Clin Invest, 1993. 92(5): p. 2408-18.
171. Ramos, M.A., et al., Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. 18(7): p. 1188-96.
172. Moulton, K.S., et al., Angiogenesis inhibitors endostatin or TNP-470 reduce intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation, 1999. 99(13): p. 1726-32.
173. Sukhova, G.K., et al., Evidence for increased collagenolysis by interstitial collagenases-1 and -3 in vulnerable human atheromatous plaques. Circulation, 1999. 99(19): p. 2503-9.

HAM VERİLER

Tablo 35: Tüm ELISA Sonuçları Ham Veriler

SIRA	GRUP	ICAM-1 (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	NF-KB (ng/mL)	VCAM-1 (ng/mL)
1	KONTROL	238,40	20,99	100,24	0,50	5,09
2	KONTROL	247,46	20,78	96,25	0,52	5,18
3	AMF	255,73	19,91	88,32	0,51	4,88
4	AMF	240,20	20,58	93,27	0,53	4,76
5	AMF+TNF	364,34	23,98	106,26	0,74	6,23
6	AMF+TNF	349,29	24,50	109,80	0,78	6,45
7	TNF	762,24	63,40	142,73	2,36	21,67
8	TNF	773,00	61,94	146,41	2,29	20,96
9	preTNF+postAMF	606,67	36,25	114,87	1,70	15,31
10	preTNF+postAMF	590,28	34,97	117,41	1,74	14,98
11	preAMF+postTNF	366,51	25,56	102,25	0,81	12,11
12	preAMF+postTNF	343,99	26,10	110,30	0,82	11,96

Tablo 36: ICAM-1 ELISA Sonuçları Ham Veriler

İSİM	ABS	ABS-BLK	PredictSTD	ICAM-1 (pg/mL)
STD1	2,241	2,188	5000	4948,154748
STD2	1,546	1,493	2500	2641,474469
STD3	0,935	0,882	1250	1200,914118
STD4	0,434	0,381	625	429,7529288
STD5	0,333	0,280	312,5	319,041392
STD6	0,217	0,164	156,25	210,4148949
STD7	0,172	0,119	78,13	173,6078428
BLK	0,053	0,000	*	*
KONTROL	0,249	0,196	*	238,4023765
KONTROL	0,259	0,206	*	247,4575971
AMF	0,268	0,215	*	255,7331568
AMF	0,251	0,198	*	240,2016441
AMF+TNF	0,376	0,323	*	364,3403479
AMF+TNF	0,362	0,309	*	349,2930224
TNF	0,680	0,627	*	762,2357639
TNF	0,687	0,634	*	773,0001667
preTNF+postAMF	0,573	0,520	*	606,672272
preTNF+postAMF	0,561	0,508	*	590,2769499
preAMF+postTNF	0,378	0,325	*	366,5135188
preAMF+postTNF	0,357	0,304	*	343,9889005

Tablo 37: IL-6 ELISA Sonuçları Ham Veriler

	İSİM	ABS	ABS-BLK	PredictSTD	IL-6 (pg/mL)
1	STD1	2,392	2,333	500	490,30366
2	STD2	1,68	1,621	250	275,355525
3	STD3	0,873	0,814	125	106,518035
4	STD4	0,489	0,43	62,5	54,0824788
5	STD5	0,182	0,123	31,25	25,1042465
6	STD6	0,125	0,066	15,63	20,9898003
7	STD7	0,108	0,049	7,81	19,8394378
8	BLK	0,059	0	*	*
9	KONTROL	0,125	0,066	*	20,9898003
10	KONTROL	0,122	0,063	*	20,7842326
11	AMF	0,109	0,05	*	19,90613
12	AMF	0,119	0,06	*	20,5797632
13	AMF+TNF	0,167	0,108	*	23,98306
14	AMF+TNF	0,174	0,115	*	24,5028637
15	TNF	0,568	0,509	*	63,399918
16	TNF	0,556	0,497	*	61,9355571
17	preTNF+postAMF	0,315	0,256	*	36,2463944
18	preTNF+postAMF	0,301	0,242	*	34,9718908
19	preAMF+postTNF	0,188	0,129	*	25,5604087
20	preAMF+postTNF	0,195	0,136	*	26,09815

Tablo 38: IL-8 ELISA Sonuçları Ham Veriler

	İSİM	ABS	ABS-BLK	PredictSTD	IL-8 (pg/mL)
1	STD1	2,53	2,477	2000	1986,85812
2	STD2	1,605	1,552	1000	1043,90236
3	STD3	0,874	0,821	500	471,177521
4	STD4	0,398	0,345	250	180,093992
5	STD5	0,339	0,286	125	148,511376
6	STD6	0,198	0,145	62,5	77,0519318
7	STD7	0,165	0,112	31,25	61,1454437
8	BLK	0,053	0	*	*
9	KONTROL	0,245	0,192	*	100,242314
10	KONTROL	0,237	0,184	*	96,2505643
11	AMF	0,221	0,168	*	88,3217733
12	AMF	0,231	0,178	*	93,2687195
13	AMF+TNF	0,257	0,204	*	106,264132
14	AMF+TNF	0,264	0,211	*	109,795807
15	TNF	0,328	0,275	*	142,732794
16	TNF	0,335	0,282	*	146,406084
17	preTNF+postAMF	0,274	0,221	*	114,865277
18	preTNF+postAMF	0,279	0,226	*	117,410698
19	preAMF+postTNF	0,249	0,196	*	102,245028
20	preAMF+postTNF	0,265	0,212	*	110,301472

Tablo 39: NF-KB ELISA Sonuçları Ham Veriler

	İSİM	ABS	ABS-BLK	PredictSTD	NF-KB (ng/mL)
1	STD1	2,411	2,349	10	9,848876183
2	STD2	1,674	1,612	5	5,407950686
3	STD3	0,934	0,872	2,5	2,26391239
4	STD4	0,459	0,397	1,25	0,940118788
5	STD5	0,274	0,212	0,63	0,571434526
6	STD6	0,199	0,137	0,32	0,445428384
7	STD7	0,158	0,096	0,16	0,38226697
8	BLK	0,062	0	*	*
9	KONTROL	0,231	0,169	*	0,497535539
10	KONTROL	0,242	0,18	*	0,51601644
11	AMF	0,238	0,176	*	0,509262426
12	AMF	0,249	0,187	*	0,527928604
13	AMF+TNF	0,364	0,302	*	0,740507932
14	AMF+TNF	0,384	0,322	*	0,78072662
15	TNF	0,961	0,899	*	2,355466423
16	TNF	0,943	0,881	*	2,294235499
17	preTNF+postAMF	0,756	0,694	*	1,704235072
18	preTNF+postAMF	0,769	0,707	*	1,742529732
19	preAMF+postTNF	0,397	0,335	*	0,807384898

Tablo 40: VCAM-1 ELISA Sonuçları Ham Veriler

	İSİM	ABS	ABS-BLK	PredictSTD	VCAM-1 (ng/mL)
1	STD1	2,411	2,359	100	98,37093492
2	STD2	1,676	1,624	50	54,38581322
3	STD3	0,912	0,86	25	22,2259636
4	STD4	0,468	0,416	12,5	9,887152096
5	STD5	0,242	0,19	6,25	5,3995501
6	STD6	0,187	0,135	3,13	4,490437225
7	STD7	0,134	0,082	1,56	3,682160884
8	BLK	0,052	0	*	*
9	KONTROL	0,224	0,172	*	5,094136144
10	KONTROL	0,229	0,177	*	5,178203689
11	AMF	0,211	0,159	*	4,878331321
12	AMF	0,204	0,152	*	4,763786464
13	AMF+TNF	0,289	0,237	*	6,233194129
14	AMF+TNF	0,301	0,249	*	6,454422841
15	TNF	0,895	0,843	*	21,66757781
16	TNF	0,873	0,821	*	20,95512048
17	preTNF+postAMF	0,684	0,632	*	15,30667158
18	preTNF+postAMF	0,672	0,62	*	14,9766004
19	preAMF+postTNF	0,562	0,51	*	12,1098541
20	preAMF+postTNF	0,556	0,504	*	11,96172746

Tablo 41: ICAM-1 qRTPCR Sonuçları Ham Veriler

Sample Name	Target Name	Cт Mean	Sample Name	Target Name	Cт Mean	ΔCt	ΔΔCt	Fold Change
KONTROL	ICAM	22,53	KONTROL	GAPDH	24,59	-2,06	0,00	1,00
AMF	ICAM	22,71	AMF	GAPDH	25,59	-2,89	-0,83	1,78
AMF+TNF	ICAM	27,74	AMF+TNF	GAPDH	28,02	-0,29	1,77	0,29
TNF	ICAM	24,01	TNF	GAPDH	31,65	-7,64	-5,58	47,89
preTNF+postAMF	ICAM	24,07	preTNF+postAMF	GAPDH	30,55	-6,48	-4,42	21,37
preAMF+postTNF	ICAM	27,63	preAMF+postTNF	GAPDH	29,45	-1,82	0,24	0,85

Tablo 42: IL-6 qRTPCR Sonuçları Ham Veriler

Sample Name	Target Name	Cт Mean	Sample Name	Target Name	Cт Mean	ΔCt	ΔΔCt	Fold Change
KONTROL	IL-6	24,48	KONTROL	GAPDH	24,59	-0,11	0,00	1,00
AMF	IL-6	27,10	AMF	GAPDH	25,59	1,51	1,61	0,33
AMF+TNF	IL-6	26,03	AMF+TNF	GAPDH	28,02	-2,00	-1,89	3,71
TNF	IL-6	26,03	TNF	GAPDH	31,65	-5,62	-5,51	45,54
preTNF+postAMF	IL-6	27,13	preTNF+postAMF	GAPDH	30,55	-3,41	-3,30	9,87
preAMF+postTNF	IL-6	28,06	preAMF+postTNF	GAPDH	29,45	-1,39	-1,29	2,44

Tablo 43: IL-8 qRTPCR Sonuçları Ham Veriler

Sample Name	Target Name	Cт Mean	Sample Name	Target Name	Cт Mean	ΔCt	ΔΔCt	Fold Change
KONTROL	IL-8	27,15	KONTROL	GAPDH	24,59	2,56	0,00	1,00
AMF	IL-8	29,93	AMF	GAPDH	25,59	4,34	1,78	0,29
AMF+TNF	IL-8	31,10	AMF+TNF	GAPDH	28,02	3,08	0,52	0,70
TNF	IL-8	32,42	TNF	GAPDH	31,65	0,77	-1,79	3,46
preTNF+postAMF	IL-8	33,28	preTNF+postAMF	GAPDH	30,55	2,73	0,17	0,89
preAMF+postTNF	IL-8	35,47	preAMF+postTNF	GAPDH	29,45	6,01	3,45	0,09

Tablo 44: NF-KB qRTPCR Sonuçları Ham Veriler

Sample Name	Target Name	Cт Mean	Sample Name	Target Name	Cт Mean	ΔCt	ΔΔCt	Fold Change
KONTROL	NF-KB	29,95	KONTROL	GAPDH	24,59	5,36	0,00	1,00
AMF	NF-KB	30,32	AMF	GAPDH	25,59	4,72	-0,64	1,56
AMF+TNF	NF-KB	30,58	AMF+TNF	GAPDH	28,02	2,55	-2,81	7,03
TNF	NF-KB	32,00	TNF	GAPDH	31,65	0,35	-5,01	32,28
preTNF+postAMF	NF-KB	32,55	preTNF+postAMF	GAPDH	30,55	2,00	-3,36	10,28
preAMF+postTNF	NF-KB	33,67	preAMF+postTNF	GAPDH	29,45	4,22	-1,14	2,21

Tablo 45: VCAM-1 qRTPCR Sonuçları Ham Veriler

Sample Name	Target Name	Cт Mean	Sample Name	Target Name	Cт Mean	ΔCt	ΔΔCt	Fold Change
KONTROL	VCAM	25,94	KONTROL	GAPDH	24,59	1,35	0,00	1,00
AMF	VCAM	27,17	AMF	GAPDH	25,59	1,57	0,22	0,86
AMF+TNF	VCAM	27,13	AMF+TNF	GAPDH	28,02	-0,90	-2,25	4,76
TNF	VCAM	28,87	TNF	GAPDH	31,65	-2,78	-4,13	17,51
preTNF+postAMF	VCAM	28,35	preTNF+postAMF	GAPDH	30,55	-2,20	-3,55	11,72
preAMF+postTNF	VCAM	28,13	preAMF+postTNF	GAPDH	29,45	-1,32	-2,67	6,37

ETİK KURUL KARARI

Bu çalışmada herhangi bir etik kurul kararı aranmamaktadır.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

TNF-ALFA İLE İNDÜKLENMİŞ İNSAN UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRE KÜLTÜRÜNDE (HUVEC) AMENTOFLAVON'UN ANTİİNFLAMATUAR ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%16	%12	%6	%13
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	%1
2	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
3	flaptour.com.tr İnternet Kaynağı	%1
4	Submitted to University of Nottingham Öğrenci Ödevi	%1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
6	www.bvtwhue.com.vn İnternet Kaynağı	%1
7	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	%1
8	www.acikders.org.tr	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatih Can	**Soyadı**	Türk
Doğ.Yeri	Keçiören	**Doğ.Tar.**	10.06.1987
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	**TC Kim No**	30410112024
Email	turkfatihcan@gmail.com	**Tel**	05319976687

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji ABD	2020
Yük.Lis.		
Lisans	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi	2010
Lise	Kırıkkale Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Tanıtım ve Pazarlama Müdürü	TAB İLAÇ San.Tic. Aş	2019-2019
2.	Sağlık Çözümleri Müdürü	Johnson& Johnson Medikal San. Tic. A.Ş.	2016-2018
3.	Medikal Müdür	Glaxosmithkline İlaç San. Tic. A.Ş.	2013-2016
4.	Medikal Müdür	Eczacıbaşı – Baxter İlaç San. Tic. A.Ş.	2012-2013

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	87.5	

*****Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	89.465	88.115	69.268

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
MS Office	Çok iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri: Herhangi bir yayınım bulunmamaktadır.

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Gitar, ud, bağlama, cümbüş, bateri çalmak, su altı fotoğrafçılığı ve dalış, enstruman yapımı ve ahşap işçiliği.