T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TNF-α İLE OLUŞTURULAN İNSAN SAFEN VEN ATEROSKLEROZ MODELİNDE ATORVASTATİN VE PİTAVASTATİNİN ANTİ-İNFLAMATUVAR ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

DENİZ ÖZEN

DANIŞMAN
PROF. DR. AHMET GÖKHAN AKKAN

II. DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYE. BURAK ÖNAL

TIBBİ FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ FARMAKOLOJİ VE KLİNİK FARMAKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

Bu çalışma 19.12.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından
Tıbbi Farmokoloji Anabilim Dalı, Tıbbi Farmakoloji ve Kilinik Farmakoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Ahmet Gökhan Akkan
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Sibel Özyazgan
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Mustafa Aydın Barlas
Altınbaş Üniversitesi
Tıp Fakültesi

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.

Deniz Özen

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Desteğini her zaman hissettiğim, yüksek lisans hayatımın her aşamasında ihtiyaç duyduğum bütün olanakları bana sağlayan, kendimi hayatım boyunca nasıl geliştirebileceğimi bana öğreten saygıdeğer hocam Prof. Dr. A. Gökhan Akkan'a; henüz lisans eğitimimi alırken akademiyi bana öğreten, aldığım her kararda her zaman bana güvenen ve arkamda duracağını bildiğim, hiçbir konuda yardımı esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Burak Önal'a; yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan, ihtiyaç duyduğumda benden nasihatlerini esirgemeyen, bana olan güvenini her zaman hissettiğim Prof. Dr. Sibel Özyazgan'a; deneyimleri ile bana her zaman ışık tutan Prof. Dr. M. Aydın Barlas'a ve Prof. Dr. D. Okan Yıllar'a; akademik ve sosyal hayattaki duruşu ile bana örnek olan Prof. Dr. Zeliha Yazıcı'ya, anabilim dalımızdaki diğer öğretim üyeleri, asistanlar ve personellere;

Tez çalışmam sırasında benden hiçbir yardımı ve olanağı esirgemeyen, bilgi birikimleri ile beni geliştiren ve akademik hayatıma nasıl yön vermem konusunda bana ilham kaynağı olan Doç. Dr. Duygu Gezen Ak ve Doç. Dr. Erdinç Dursun'a; yine tez çalışmam sırasında daima yanımda olan, her türlü nazımı çeken, bana gösterdiği sabrı ve çalışma disiplini için Arş. Gör. Merve Alaylıoğlu'na; deneylerim sırasında hem fiziksel hem manevi yardımlarını esirgemeyen Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Laboratuvarı asistanlarına; bana nasıl düşünüleceğini ve nasıl çalışılacağını öğreten, gelecek kararlarım konusundaki fikirlerine her zaman değer verdiğim Uzm. Mol. Biy. Caner Demir'e;

Manevi desteklerini her zaman hissettiğim ve ihtiyaç duyduğum her an bana yardım etmeye hazır olan arkadaşlarım Hande Özkan, Doğu Yıldız, Beril Çalışkan, Cihan Uğur Otçu, Mert Tözün, Zeynep Todurga, ve Kübra Tombultürk'e;

Benim bu günlere gelmemde en büyük paya sahip olan ailem; hayatım boyunca olduğu gibi tez çalışmam sırasında da maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, bana her zaman güvenen ve her zaman benim için en iyisini isteyen kıymetli babam Arif Özen'e; hiçbir sıkıntılı süreçte elimi bırakmayan ve bana destek olan, en değerlim, annem Şerife Özen'e; hayattaki duruşuyla rol modelim olan, en yakın arkadaşım canım canım ablam Ayşe Özen'e;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32152

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... Xİİ
ABSTRACT ..... Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Ateroskleroz 4
2.1.1. Ateroskleroz Süreci 6
2.1.1.1. Yağlı Çizgi Oluşumu 6
2.1.1.2. Aterom Oluşumu 8
2.1.1.3. Aterosklerotik Plak Oluşumu 9
2.1.2. Aterosklerotik Risk Faktörleri ve Belirteçleri 10
2.1.3. Ateroskleroz ve İnflamasyon 13
2.2. Matriks Metalloproteinazlar 15
2.2.1. MMP Yapısı 17
2.2.2. MMP Aktivasyonu 18
2.2.3. MMP Substratları 18
2.2.4. MMP Aktivitesi 19
2.2.5. Jelatinazlar 21
2.2.5.1. MMP-2 21
2.2.5.2. MMP-9 22
2.2.6. MMP ve İnflamasyon 22
2.3. Statinler 23
2.4. Koroner Arter Bypass Grefti 24
2.4.1. Safen Ven 25

3. GEREÇ VE YÖNTEM 27
3.1. İnsan Safen Ven Endotelyal Hücre Kültürü 27
3.1.1. İnsan Safen Ven Endotelyal Hücreleri Büyüme Medyumunun Hazırlanması 27
3.1.2. Hücre Kültürü Flasklarının Hazırlanması 27
3.1.3. İnsan Safen Ven Endotelyal Hücrelerinin Ekimi 28
3.1.4. İnsan Safen Ven Endotelyal Hücrelerinin Pasajlanması 28
3.2. İnsan Safen Ven Endotelyal Hücrelerine Yapılan Uygulamalar 29
3.3. Laktat Dehidrogenaz Kiti ile Sitotoksisite Ölçümü 30
3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) 30
3.5. İstatistiksel Analiz 31
4. BULGULAR 32
4.1. LDH Sitotoksisite Ölçümü 32
4.2. Göreceli MMP-2 ve MMP-9 mRNA Ekspresyon Seviyeleri 33
5. TARTIŞMA 37
KAYNAKLAR 44
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 60
ÖZGEÇMİŞ 61

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: İnsan safen ven endotelyal hücrelerine uygulanan ilaçlar ve dozları..... 29
Tablo 4-1: İnsan safen ven endotelyal hücre gruplarından salınan LDH değerleri 32
Tablo 4-2: İnsan safen ven endotelyal hücrelerinde eksprese edilen göreceli MMP-2 mRNA seviyeleri 34

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Aterosklerozun patogenezi[24] 6
Şekil 2-2: Farklı MMP alt türlerinin patolojik durumlardaki rolleri[91] 17
Şekil 2-3: Temel MMP alt türleri ve yapıları[91] 18
Şekil 4-1: İnsan safen ven endotelyal hücre gruplarındaki LDH salınım yüzdeleri. (Atv, Atorvastatin; Ptv, Pitavastatin; TNF, TNF-α (10 ng/mL); Atv1: 10 µM; Atv2: 50 µm; Ptv1: 1 µM; Ptv2: 2 µM). 33
Şekil 4-2: qRT-PCR yöntemi ile belirlenen insan safen ven endotelyal hücreleri göreceli MMP-2 mRNA ekspresyon seviyeleri. (Atv, Atorvastatin; Ptv, Pitavastatin; TNF, TNF-α (10 ng/mL); Atv1: 10 µM; Atv2: 50 µm; Ptv1: 1 µM; Ptv2: 2 µM). 34
Şekil 4-3: qRT-PCR yöntemi ile belirlenen, atorvastatin uygulaması yapılan insan safen ven endotelyal hücreleri göreceli MMP-2 mRNA ekspresyon seviyeleri. (Atv, Atorvastatin; TNF, TNF-α (10 ng/mL); Atv1: 10 µM; Atv2: 50 µm;)..... 35
Şekil 4-4: qRT-PCR yöntemi ile belirlenen, pitavastatin uygulaması yapılan insan safen ven endotelyal hücreleri göreceli MMP-2 mRNA ekspresyon seviyeleri. (Ptv, Pitavastatin; TNF, TNF-α (10 ng/mL); Ptv1: 1 µM; Ptv2: 2 µM)..... 36

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACTB – Aktin beta

ApoB – Apoliporotein B

Atv – Atorvastatin

COX - Siklooksijenaz

CRP – C reaktif protein

ECM – Ekstraselüler matriks

EDHF - Endotel kökenli hiperpolarize edici faktör

eNOS – Nitrik oksit endotelyal sentaz

HDL – Yüksek dansiteli lipoprotein

HDL-C – Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol

IFN-γ – Interferon-gama

IL – Interlökin

İMA – İnternal mamriyaal arter

KAH – Koroner arter hastalığı

LDH – Laktat dehidrogenaz

LDL – Düşük dansiteli lipoprotein

LDL-C – Düşük dansiteli liporpotein kolesterol

MMP – Matriks metalloproteinaz

NF – Nükleer faktör

NO – Nitrik oksit

Ox-LDL – Okside düşük dansiteli lipoprotein

PAR – Proteaz aktive edici reseptör

Ptv – Pitavastatin

qRT-PCR – Kantitatif gerçek zamanlı reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

TGF-β – Dönüştürücü büyüme faktörü-beta

TNF – Tümör nekroz faktör

VSM – Vasküler düz kas

ÖZET

Özen, D. (2019). TNF-α ile oluşturulan insan safen ven ateroskleroz modelinde atorvastatin ve pitavastatinin anti-inflamatuvar etkilerinin karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Farmakoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Ateroskleroz, arteryal duvarda kolesterol içeren LDL parçacıklarının birikmesi ile tetiklenen, kolesterol, farklı tip hücreler ve ekstraselüler matriks birikiminin kalınlaşmaya sebep olduğu kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Aterosklerotik süreçte subendotelyumda alıkoyulan lipoproteinler düşük seviyeli inflamatuvar yanıtı tetikler. Bu yanıt, endotelyal aktivasyonuna, monositlerin bölgeye çağrılmasına, hücresel ve ekstraselüler yapıların intimada birikmesine sebep olur. Artan inflamasyon ile birlikte, hem düz kas hücreleri tarafından hasarlı kollajen sentezi hem de inflamatuvar hücrelerden salınan matriks metalloproteinazların (MMP) degradasyonu sonucunda koruyucu fibröz başlık incelir. Arteryal duvardaki inflamasyon; aterosklerotik lezyonların oluşumunda görev alan endotelyal hücreler, monositler/makrofajlar ve düz kas hücrelerindeki hücresel bileşenlerin aktivasyonu ile karakterizedir. Böylece, başta MMP'ler olmak üzere subendotelyal matriks modifikasyonuna dahil olan birçok yapısal proteinlerin ve enzimlerin sentezi ile salınımında artış görülür. Patolojik vasküler dokularda özellikle MMP-2, -3 ve -9 ekspresyonunda ve proteolitik aktivitelerinde artış meydana gelir.

Statinler, 3-hidroksi-3-metilglutaril-koenzim A redüktaz enzimini inhibe ederek kolesterol sentezini azaltır. Lipid düşürücü bu ajanlar ateroskleroz ve vasküler endotelyal hasara karşı koruyucu etkilere sahiptir. Statinler, direkt olarak vasküler ve immün hücrelerin, hepatositlerin ve adipositlerin inflamatuvar fonksiyonlarını etkileyerek pleiotropik olarak da adlandırılan anti-inflamatuvar etki de gösterirler.

Çalışmamızda, TNF-α ile uyararak aterosklerozun inflamatuvar sürecini oluşturduğumuz insan safen ven endotelyal hücrelerinde, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarının belirlenmesi ile bypass cerrahisi sonrası sıklıkla reçetelenen atorvastatin ve pitavastatinin anti-inflamatuvar etkilerini karşılaştırdık.

Külture edilen insan safen ven endotelyal hücrelerine farklı dozlarda atorvastatin ve pitavastatin uygulamalarının ardından, TNF-α ile inflamasyon oluşturulmasıyla; MMP-2 ve MMP-9 ekspresyon seviylerini qRT-PCR yöntemi ile belirlenmiştir. İlaç ve DMSO uygulamalarının hücreler için toksik bir etkiye sahip olmadığı bulunmuştur. Hiçbir grupta MMP-9 mRNA ekspresyon seviyeleri gözlemlenememiştir. Ancak; her iki ilacın her iki dozunun da MMP-2 mRNA ekspresyon seviyelerini, kontrol ve TNF-α gruplarına kıyasla anlamlı olarak artırdığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ateroskleroz, inflamasyon, safen ven, statin, MMP

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32152

ABSTRACT

Özen, D. (2019). Comparison of anti-inflammatory effects of atorvastatin and pitavastatin on TNF-α-induced atherosclerosis model of human saphenous vein. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Pharmacology. MSc Thesis. İstanbul.

Atherosclerosis is a chronic inflammatory disease, which is induced with cholesterol-containing LDL accumulation on arterial wall. In the atherosclerotic process, retained lipoproteins in the subendothelium induces low-grade inflammatory response. That response causes endothelial activation, monocyte recruitment, and accumulation of cellular and extracellular structures. With increasing inflammation, defective collagen synthesis by intimal smooth muscle cells and degradation of released matrix metalloproteinases (MMPs) by inflammatory cells lead to protective fibrous cap thinning. Inflammation in the arterial wall is characterized with activation of cellular components of endothelial cells, monocytes/macrophages and smooth muscle cells that play role in atherosclerotic lesion formation. This leads to increase in synthesis and release of several structural proteins and enzymes, involved in subendothelial matrix modification, including MMPs. Expression and proteolytic activity of MMP-2, -3, and -9 increase in pathologic vascular tissues.

Statins inhibit 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase enzyme and decrease cholesterol synthesis. These lipid-lowering agents have protective effects against atherosclerosis and vascular endothelial damage. Statins directly change inflammatory functions of vascular and immune cells, hepatocytes and adipocytes with their pleiotropic anti-inflammatory effects.

In our study, we compared anti-inflammatory effects of atorvastatin and pitavastatin, which are commonly prescribed after bypass surgery, by detecting MMP-2 and MMP-9 expressions on human saphenous vein endothelial cells upon TNF-α-induced inflammatory process of atherosclerosis.

TNF-α-induced inflammation model was generated after different doses of atorvastatin and pitavastatin applications on cultured human saphenous vein endothelial cells and then, MMP-2 and MMP-9 expression levels were detected by qRT-PCR method. It was found that drug and DMSO applications had no toxic effects on cells. No MMP-9 mRNA expression was observed in any of the groups. However, both doses of both drugs significantlyl increased the MMP-2 mRNA expression levels when compared with the control TNF-α groups.

Key Words: Atherosclerosis, inflammation, saphenous vein, statin, MMP

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 32152

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişmiş ülkelerde morbidite ve mortalitenin başlıca nedeni olan ateroskleroz; damar lümeninde oluşan bir hasara karşı, iyileşme sürecinde gelişen olayların bütünü olarak nitelendirilmektedir. Ateroskleroz, vasküler endotelyal disfonksiyona sebep olan karmaşık inflamatuvar bir süreçtir. Özellikle, hipertansiyon ile birlikte, dislipidemiye neden olan artan plazma LDL düzeyi aterosklerozun en temel risk faktörlerindendir. Kan akış hızının düştüğü ve salınımlı akışın gerçekleştiği arteryal dallanma noktalarında görülen aterogenezi başlatan olay; endotelyal hücre hasarıdır. Okside olmuş LDL, sitokinler veya akış bozukluğu gibi çeşitli uyaranlara yanıt olarak meydana gelen endotelyum aktivasyonu, aterosklerozun erken patogenez evresi olarak tanımlanabilir. Ardından, lökositlerin damar duvarına göçünü sağlayan ve pıhtı oluşumunu hızlandıran faktörler gibi spesifik adezyon reseptörleri ile sitokinler, aktif endotelyal doku tarafından eksprese edilir. İnflamasyon; vasküler endotelyal hücrelerde disfonksiyona veya hasara yol açan çeşitli stres faktörlerine yanıt olarak gelişir. Risk faktörleri arasında; okside LDL seviyelerinde artış, serbest radikallerin varlığı, hipertansiyon, diyabet ve genetik faktörler yer alır. Bu faktörlerin etkileşimi ile aterosklerozun gelişme olasılığı artabilir; ancak günümüzde bilindiği kadarıyla, en belirgin ve etkili faktör, artan plazma kolesterol seviyeleridir.

Aterosklerotik plak oluşum mekanizmasında immünitenin rolü; plaklarda makrofaj ve T hücreleri ile birlikte, IL-6, TNF-α gibi proinflamatuvar sitokinlerin, çeşitli adezyon moleküllerinin, kemokinlerin, CD40, CD40 ligand ve C reaktif proteinlerin varlığı ile açıklanabilir. Bununla birlikte; IL-1, TNF-α ve CD40L gibi proinflamatuvar sitokinlerin, matriks metalloproteinazların (MMP'lerin) ekspresyonunu ve aktivasyonunu düzenlediği de bilinmektedir. Aterosklerotik süreçte görev alan inflamatuvar yolakların açığa çıkarılması, güncel tedavilere ek olarak inflamasyonun da hedef alınmasını sağlayabilir.

Statinler; kolesterol sentezinde rol oynayan, 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz enziminin inhibitörleridir. Statinlerin; özellikle kardiyovasküler hastalıklara karşı hem primer hem sekonder koruma sağlayarak, plazma kolesterol seviyesini etkili derecede düşürdüğü konusunda fikir birliği mevcuttur ve etkilerinin sadece kolesterol azaltıcı yönde olmadığı da anlaşılmıştır. Statinler, direkt olarak vasküler

ve immün hücrelerin, hepatositlerin ve adipositlerin inflamatuvar fonksiyonlarını da etkiler. Böylece, aterojenik lipidlerin plazma değerlerini ve plak hacmini azaltmanın yanında; anti-inflamatuvar, antioksidan, immünmodülatör, endotelyal fonksiyonları geliştirici, matriks dengeleyici ve antitrombotik etkiler gibi pleiotropik etkilere de sahiptirler. İkinci nesil statinlerden olan atorvastatin; kalp yetmezliği hastalarında, hastaneye yatma oranını düşürdüğü kanıtlanan ilk HMG-CoA redüktaz inhibitörüdür. Aterogenez oluşumu sırasında görülen inflamatuvar süreçler ve endotelyal disfonksiyon üzerinde, atorvastatinin iyileştirici etkisi olduğu bilinmektedir. Pitavastatin ise üçüncü nesil statinlerdendir ve plazma LDL düzeylerini düşürmenin yanında, endotelyal hücreler üzerinde anti-inflamatuvar etkiye de sahiptir.

Statinler; fibrinolitik aktiviteyi, vasküler tonusu ve matriks döngüsünü kontrol eden endotelyal proteinlerin ekspresyonunu düzenler. MMP'ler, ekstraselüler matriks yeniden modellenmesinde ve degredasyonunda görev alan proteinazlardır. Kanser, artrit ve ateroskleroz gibi hastalıklarda MMP aktivitesinin bozulduğu gözlemlenmiştir. Kardiyovasküler hastalıklarda, arteryal intima hiperplazisinin oluşumunda ve gelişmiş aterosklerotik lezyonların zayıflaması ile bozulmasında MMP'ler önemli role sahiptir. Aterosklerotik arterlerin özellikle kopmaya yatkın uç bölgelerinde ve makrofajlar ile köpük hücrelerinin biriktiği bölgelerdeki plak dokusundaki MMP düzeyleri yüksektir. Özellikle MMP-2 ve MMP-9 metalloproteinazları, ateromatöz plakta aktif olarak sentezlenir. Aynı zamanda, önemli bir pro-inflamatuvar mediyatör olan TNF-α'nın proteolitik kesiminde görev alarak aktivitesini düzenleyen MMP-2 ve MMP-9; inflamatuvar hücre göçü üzerinde de etkilidir.

Vasküler hasar riskinin azalmasında etkili bir durum olan MMP'lerin matriks proteolitik aktivitelerinde düzenleyici rol oynayan statinler; iyi bilinen lipid düşürücü etkilerinin yanında, hücre-hücre etkileşiminde ve MMP üretiminde önemli olan etkilere de sahiptir. Statinler, aterosklerotik lezyonlarda T hücre aktivasyonu ve çoğalmasını azaltarak, adezyon moleküllerinin etkileşimlerini engellemekle birlikte, kemokinler ve MMP'lelrin üretimini de inhibe ederler. Aterosklerotik lezyonların progresyonu sırasında gerçekleşen doku yeniden modellenmesi ve MMP aktivitesindeki artış sebebi ile vasküler patolojinin iyileştirilebilmesi amaçlanarak yapılacak olan bir terapötik girişimde MMP'ler potansiyel tedavi hedefi olarak düşünülebilir. Statinler, MMP-2 ve MMP-9 da dahil olmak üzere birçok MMP'nin aterogenetik lezyonlarda rolü olan makrofajlardaki

ekspresyon ve işlevini azaltırlar. MMP düzeyindeki azalma, trombotik etkiyi olumsuz yönde etkiler ve bu antiinflamatuvar etki sayesinde, statinlerin ateroskleroz tedavisinde oldukça etkili oldukları düşünülmektedir.

Otolog insan safen veni kullanılarak yapılan koroner arter bypass cerrahisi, sıklıkla kullanılan ileri ateroskleroz tedavi yöntemidir. Koroner arter bypass greftinin bir yıl sonrasında gözlenen en dominant lezyonu, aterosklerozdur. Greft aterosklerozunun tedavisi olarak kullanılabilen tek seçenek ise yeniden koroner bypass cerrahisidir. Yaptığımız çalışmada; koroner bypass operasyonu sonrasında rutin olarak kullanılan statinlerin anti-inflamatuvar etkilerini incelemeyi hedefledik. TNF-α ile aterosklerozun inflamatuvar sürecini oluşturduğumuz insan safen ven endotelyal hücre kültürü modelinde, rutin tedavide sıklıkla kullanılan atorvastatin ve pitavastatinin ateroskleroz gelişimi üzerindeki anti-inflamatuvar etkilerini MMP-2 ve MMP-9 proteinazlarının mRNA seviyelerini tespit ederek karşılaştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Kardiyovasküler hastalıkların görülme sıklığının tüm dünyada artmaya devam ederek, 2030'da %40.5'e kadar yükselebileceği öngörülmektedir. Bu hastaların medikal bakım masraflarının ise 818 milyar dolar olacağı düşünülmektedir[1]. Kalp hastalıklarına sebep olan birçok etken arasında, ateroskleroz ise açık ara ile en yaygın olandır. Ateroskleroz; dünyadaki ölüm sebeplerinin başında gelir[2] ve kardiyovasküler morbidite ve mortalitenin büyük bir kısmından sorumlu olan koroner arter hastalığı, inme ve perifer arter hastalığı gibi birçok önemli vasküler olayda rol oynamaktadır[3]. Aterosklerozun temel risk faktörlerinden olan obezite ve tip 2 diyabet hastalıklarının da yaygınlaşması ile görülme sıklıkları artmaya devam etmektedir[4]. Bunun yanında, batı tipi yaşam biçiminin benimsenmesi ile birlikte; ateroskleroz, tüm dünyada gittikçe yaygınlaşmaktadır ve ilerde de salgın sayılabilecek düzeye geleceği düşünülmektedir[5].

Yunanca kökenli bir terim olan ateroskleroz, arterlerde intimal kalınlaşma ve yağ birikimi anlamına gelmektedir. Ateroskleroz terimi, ateroz (çeşitli makrofajlar ile birlikte yağ birikimi) ve skleroz (düz kas hücreleri, lökosit ve bağ dokuyu kapsayan fibröz tabaka) olmak üzere iki kısımdan oluşur[6,7].

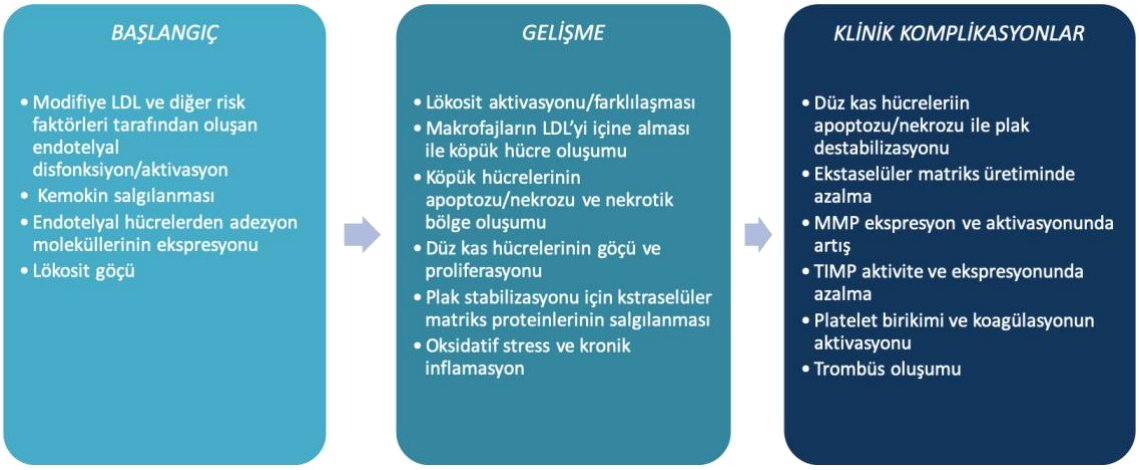
Ateroskleroz, hiperlipidemi ve lipid oksidasyonu sonucunda oluşur. Lipoprotein güdümlü, çözümlenemeyen kronik inflamatuvar bir arteryal subendotelyal alan (intima) hastalığıdır ve hem doğal hem edinilmiş bağışıklığın aktivasyonunu tetikler[8]. Kronik inflamasyon ve lipid yüklü plakların, geniş ve orta büyüklükteki arterlerde birikmesi ile birlikte yavaş ilerleyen bir hastalıktır[9]. Günümüzde, aterosklerozun arteryal duvarda gerçekleşen ve hem doğal hem de edinilmiş immün yanıtı stimüle eden modifiye edilmiş endojen yapılar ile kısmi okside olmuş lipoproteinlere (oxLDL gibi) karşı verilen bir yanıt olarak başlatılan kronik bir inflamatuvar hastalık olduğu net olarak bilinmektedir[10,11].

Bunun yanında; aorttan koroner arterlere kadar tüm vasküler sistemin dahil olabileceği vasküler intima hastalığı olarak da tanımlanabilir ve intimal plaklar ile karakterizedir[12,13]. Bu plakların oluşumu, küçük kolesterol kristallerinin intimada ve altındaki düz kasta birikmesi ile başlar. Ardından, fibröz dokular ile bu dokuyu çevreleyen düz kasın çoğalması ile birlikte plaklar büyür ve arterlerin içinde şişkinlik yaparak kan akışını azaltır. Fibroblastlar tarafından oluşturulan bağ doku ve lezyondaki

kalsiyum birikimi skleroza ya da arterlerin kalınlaşmasına yol açar. Son olarak da, düzgün olmayan arter yüzeyinde pıhtı oluşumu ve kan akışının blokajına sebep olan tromboz gözlenir[14]. Aterosklerotik plağın parçalanması veya kopması sonucunda oluşan pıhtı damarı tıkayarak, iskemik doku hasarına yol açana kadar, yani ortaya çıkmaya başladığı ilk yıllarda ateroskleroz genellikle fark edilemez[9].

Aterogenezin erken döneminde; lökositler toplanır ve proinflamatuvar sitokinler olaya dahil olur [15]. Bu patofizyolojik süreçte öncelikle inflamasyonun etkisi ile endotelyal hücreler aktive olur ve monositler ile diğer lökositlerin ateroma girişi başlar. Salınan kemokinler ve kemoatraktan proteinler, daha fazla inflamatuvar hücrenin intimaya çağrılmasına sebep olur[16]. Bu sırada kolesterol taşıyan LDL parçacıkları da, arteryal duvarda tutulur[5,17,18]. Arterlerdeki bu alıkoyma, makrofajlara farklılaşan monostilerin girişi ile lokal inflamasyonu daha da tetikler[19]. Makrofajlar, lipoprotein parçacıklarını fagosite ederek köpük hücrelerini oluşturur. Köpük hücrelerin varlığı; yeni oluşmaya başlayan ateromun ayırıcı özelliğidir. Hücre içinde kolesterol birikimi artar[9] ve köpük hücreleri tarafından inflamatuvar sitokinler, reaktif oksijen türleri ve diğer medyatörler salgılanır[16]. Aynı zamanda, Oluşan lezyona CD4+ T hücreleri göç eder[20]. LDL, yardımcı T1 hücreleri tarafından antijen olarak tanınır ve T hücreleri, interferon-gamma ile TNF gibi proinflamatuvar medyatörleri üretir[21,22]. Makrofajların apoptoz gibi olaylarla sahneden çekilmesiyle, olgun plağın yağ içeren “nekrotik” çekirdek bölgesi oluşur. Fagositlerin etkinliği, lokal inflamatuvar yanıtı artırır. Örneğin; plağın fibröz başlığının güçlenmesine sebep olan ekstraselüler matriks makrmoleküllerini parçalayan matriks metalloproteinazlar (MMP) üretilir. Zayıflayan fibröz başlıktaki çatlak yüzünden, plağın nekrotik çekirdek bölgesi kan ile etkileşime girer[23] (Şekil 2-1).

Aterosklerotik lezyona karşı devam eden inflamatuvar ve hemodinamik saldırı, lokal disfonksiyona ve endotelyal bütünlüğün bozulmasına yol açar. Endotelyal disfonksiyon, ileriki aşamalarda trombus oluşumunu başlatarak, miyokard enfarktüsü ve iskemik inmeye sebep olabilir[9].



Şekil 2-1: Aterosklerozun patogenezi[24]

2.1.1. Ateroskleroz Süreci

- Yağlı çizgi oluşumu
- Aterom oluşumu
- Aterosklerotik plak oluşumu

2.1.1.1. Yağlı Çizgi Oluşumu

Yağlı çizgiler, aterosklerozun ilk işaretidir ve neredeyse tamamen monositlerden farklılaşan makrofajlardan meydana gelir[25]. İlk lezyonlar genellikle, arterlerin intima tabakalarındaki lipoproteinlerin artması sonucunda oluşur[14]. Lipoprotein parçacıkları; proteinler, fosfolipidler ve kolesterol ile trigliserid gibi lipidlerden oluşur. En önemli aterojenik lipoproteinlerden biri kolesterol bakımından zengin, LDL'lerdir. Bu lipoprotein, endotelyumdan içeri sızabilme ya da proteoglikan gibi ekstraselüler matriks (ECM) bileşenlerine yapışabilme özellikleri sayesinde vasküler intimada birikebilir.

Lezyon bölgelerinde, matriksin farklı bileşenleri tarafından oluşturulan denge, genellikle zarar görmüştür. Örneğin, üç ana proteoglikan grubundan, heparin sülfat moleküllerinin, kondroitin sülfat ve keratan sülfata göre göreceli olarak artışı, lipoproteinlerin adezyonun ve intimadan çıkış sürecinin yavaşlaması sonucunda lipoprotein birikiminde artışa yol açar[26]. Aterom oluşumunun başlangıç basamaklarında, plaklar genellikle damarların tersi yönünde büyür. Bir plak, damarın internal elastik tabakasının %40'ından fazlasını kapladığında, arteryal kanal kapanmış olarak düşünülebilir. Ateroskleroz, intima hasarı ile monositler, düz kas hücreleri ve lenfositleri içeren çeşitli hücre yanıtları sonucu gerçekleşen bir süreçtir. Başlangıçtaki yumuşak lezyon; köpük hücreleri, ekstraselüler

yağ birikimi ve az miktarda plateletlerden oluşur. Süreç gelişirken, düz kas hücreleri çoğalır ve sonunda plaklara doğru gerçekleşen kan akışı yoğunlaşır[27].

Yağlı çizgi oluşumun başlıca 4 basamağı vardır:

a. LDL kolesterol tutulumu

   Aterogenezin ilk adımı lipoproteinin lezyon bölgesinde tutulmasıdır. LDL kolesterol (LDL-C) sıkı endotelyal bağlanma bölgelerinden geçememesine rağmen; endositoz ile endotelyal hücrelerin içine kolaylıkla geçebilir[27]. LDL tutulumu, intimadaki LDL konsantrasyonunun ve lezyonda kaldığı sürenin artmasına sebep olur. Bu faktörler tutulan maddelerin oksidasyonuna yol açar[14].

b. Endotelyal hücre aktivasyonu

   Sitokinler ve okside lipidler, endotelyal hücrelerin aktivasyonunda önemli rol oynar. Erken aterosklerotik süreçte, monositler ve T lenfositler vasküler intimaya sızar[28]. Bu tür inflamatuvar hücrelerin hareketi; aktive olmuş endotelyal hücrelere, ICAM ve VCAM gibi hücresel adezyon molekülleri kullanarak tutunmaları ile başlar[29]. Üretilen bu adezyon molekülleri LDL oksidasyonu açısından da önemlidir. Monositlerin makrofajlara farklılaşması, ox-LDL gibi okside lipitlerden köpük hücre oluşumunu tetikler[30]. Bu süreç, enzimlerin ve çeşitli sitokinlerin salınmasında etkili olan reseptörlerin ekspresyonuna bağlıdır. Ox-LDL, T hücreler için antijen görevi görerek, aktivasyonlarını sağlar ve böylelikle, makrofaj aktivasyonunda etkili olan sitokinlerin salınması sonucunda endotelyal ve düz kas hücrelerinde değişiklikler meydana gelir.

c. Lökosit aktivasyonu

   Aterosklerozun başlangıç aşamalarında, mononükleer lökositler, monositler ve T hücreleri, vasküler duvardan geçerek sağlam endotelyuma girer[27]. Bu aşamada, monositlerin intimaya transmigrasyonu kemokinler tarafından kontrol edilir[31]. Sürecin gerçekleşmesi için, nükleer faktör (NF)-αβ tarafından lökosit ve kemokin adezyon moleküllerinin ekspresyonunun tetiklenmesi gerekir. Bu transkripsiyon faktörü, pro-inflamatuvar sitokinlerin, endotelyal yüzeydeki reseptörlere bağlanması ile aktive olur. Lökosit adezyon molekülleri, aterosklerozun ilk aşamalarına dahil olur. Endotelyal hücreler, lökositlerdeki adezyon moleküllerinin üretilmesi için önemli kaynaklardır. Adezyon molekül reseptörleri; belirli lökositler, düz kas hücreleri ya da vasküler endotelyal hücreler tarafından eksprese edilir. Adezyon molekülleri; atraktan moleküllerin ve/veya

kemokinlerin üretimi ve salınmasında önemli rol oynar. Ox-LDL de adezyon molekül ekspresyonunu artırır[27].

d. Köpük hücre oluşumu

Mononükleer fagositler, intimaya girerek makrofajlara farklılaşır. Lipid biriktirmiş olan bazı fagositler, arteryal duvarı terk ederek, lipidlerin arterden atılmasını sağlayabilir. Eğer arteryal duvara lipid girişi, fagositoz veya başka yollar ile çıkışından daha fazla olursa, lipid birikimi meydana gelir ve aterom oluşumuna yatkınlık artar. Makrofajlar, çöpçü reseptörleri sayesinde; daha sonra köpük hücrelerine dönüşebilecek Ox-LDL'nin alımını ve birikimini gerçekleştirir[32]. Bu reseptörler, makrofaj yüzeyinin yanı sıra; endotelyal hücreler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri tarafından da eksprese edilir[33] ve sitokinler ile ox-LDL'lerin sebep olduğu monositlerin makrofajlara farklılaşması sırasında çöpçü reseptörlerin ekspresyonu artar[32]. Makrofajların çöpçü reseptörlerine bağlanan Ox-LDL'nin yapısındaki fosfolipidler okside olarak; apolipoprotein B'nin (ApoB) lizin aminoasidine hücum edebilen aldehitleri oluşturur[33,34]. Bu sarı köpük hücrelerinin arteryal duvarda birikmesi de, yağlı çizgi oluşumunu sağlar[35]. Monositler; köpük hücreleri dışında, TNF-α, büyüme faktörü, doku faktörünü de kapsayan prekoagülasyon faktörleri ve serbest radikaller gibi sitotoksik maddeleri de üretebilir. Bu maddeler, hem endotelyal hasarı hem de LDL oksidasyonunu artırarak, daha çok metabolik değişikliğe sebep olur[35].

2.1.1.2. Aterom Oluşumu

Komşu düz kas hücreleri ve endotelyal hücreler; sitokinler gibi küçük peptidler, interlökin (IL)-1 gibi büyüme faktörleri ve hücre büyümesinde etkili olan TNF-α salgıladığında; damar dokuda ciddi hasar meydana gelmiş demektir. Bu faktörler, düz kas hücrelerinin damar lümenine göçüne yol açar[27]. T hücrelerinin, mast hücrelerinin ve diğer inflamatuvar hücrelerin intimaya geçişi ile de aterom gelişimi devam eder[5]. T hücreleri, IFN-γ ve lenfotoksin gibi çeşitli sitokinleri salgılayarak düz kas hücrelerini ve endotelyal hücreleri stimüle eder. Matriks degrade edici proteazların ekspresyonunu başlatan çeşitli sitokinler ise mast hücreleri tarafından salınır[36]. Bütün bu inflamatuvar hücreler, düz kas hücrelerinin çoğalması ve ECM'nin yeniden modellenmesinde ortaklaşa bir çalışma gerçekleştirerek; lezyon büyüklüğünün artmasına sebep olur[6].

Bu şartlarda, düz kas hücre migrasyonu ve sentezlenen ECM fibröz başlığı meydana getirir. Fibröz başlık; kolajen bakımından zengin lif dokular, düz kas hücreleri, makrofajlar ve T lenfositlerinden oluşur. Bu yapılar hep birlikte olgun aterosklerotik plağı oluşturur, kanalda birikir ve damarlardaki kan dolaşımını azaltır[32]. Makrofajlar ve T lenfositler, gelişmiş plağın uç bölgelerinde bulunur. Makrofajlar, ECM lizizinde görev alan proteinazları salgılar. T hücreleri ise, düz kas hücrelerinde kolajen sentezini önleyen TNF-α'yı üretir. Bütün bu süreçler plak şeklindeki fibröz başlık oluşumunu yavaşlatabilir ve yıkımına sebep olabilir[32-35]. Aktive edilmiş inflamatuvar hücrelerde üretilen ve salınan çeşitli faktörlerin etkisi ile plağın zarar görerek parçalanması, aterosklerozun en çok korkulan sonuçlarından biridir [37]. T lenfositleri ve makrofajlar tarafından üretilen faktörler aynı zamanda hem kolajeni parçalarken hem de kolajen üretimini inhibe eder. Böylece, fibröz başlığın incelmesine sebep olarak, plak stabilitesini bozar[38,39]. Plaklardaki makrofajlar tarafından prokoagülan bir protein olan doku faktörü üretilir. Bu sebeple, fibröz başlığın yıkımı ve plak rüptürü durumunda, kolajen ve lipidlerin kan dolaşımına geçerek; plateletlerin birikimi ile adezyonuna sebep olabilir[32-35]. Bu şekilde; trombus oluşumu ve buna bağlı komplikasyonlar meydana gelir[40].

2.1.1.3. Aterosklerotik Plak Oluşumu

Aterosklerotik plak büyüdükçe daha karmaşık bir yapıya sahip olur. Yağlı çizgiler; fibröz başlık ile kaplı nekrotik çekirdeğe sahip gelişmiş plaklar olan lifli yağ lezyonlarına dönüşür. Fibröz başlığın uç bölgelerinde, T hücreleri gibi immün hücreleri birikir[41]. Başlık, kan basıncından kaynaklanan kuvvete karşı koyamadığı zaman, aterosklerotik semptomlar görülmeye başlar ve genellikle plağın kenarlarına yakın yerlerde yüzeysel çatlaklar oluşur[42]. Parçalanmaya karşı hassas olan plaklar; ince fibröz başlık, lipid içeren geniş bir çekirdek ve süregelen inflamasyon ile karakterizedir[43,44]. Dünyadaki koroner tromboz olaylarının yaklaşık %70'i plaklardan kopan parçaların bir sonucu olarak meydana gelmektedir[45]. Kalan %30'unun altında yatan sebebin ise; endotelyal erozyon ve hastalığı tetikleyebilecek diğer patolojiler olabileceği düşünülmektedir. Endotelyal erozyon veya hasar; endotelyal tabakanın yok olarak, akut tromboz oluşumuna sebebiyet vermesi olarak tanımlanabilir[46]. Endotelyumun altındaki intima tabakası düz kas hücreleri ve proteoglikan matriks bakımından zengindir[47].

Düz kas hücreleri ve kolajen, plak yapısının sağlam olmasında önemli rol oynamaktadır. Dönüştürücü büyüme faktörü (TGF-β), ekstraselüler kolajenin olgunlaşmasını tetikler ve

kolajenin düz kas hücreleri tarafından sentezlenmesini düzenler[48]. Olgunlaşmış kolajen, fibröz başlığın mekanik olarak güçlenmesini sağlarken; IFN-γ hem kolajen üretimini ve olgunlaşmasını inhibe eden hem de düz kas hücrelerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını engelleyen güçlü bir denge bozucu ajandır[49]. MMP'ler, kolajen lifleri parçalayarak, plakların hassaslaşmasını tetikler[50]. Plak hasar bölgelerinde yaygın olarak bulunan mast hücreleri, matriksi parçalayan proteazları salgılar ve MMP'leri aktive eder[51]. Bunun yanında, makrofajlar, düz kas hücreleri ve endotelyal hücreler de, plaklardaki metalloproteinazların önemli kaynaklarındandır[50].

Aterosklerotik kalsifikasyon, plaklara sağlamlık kazandırırken; küçük kalsifikasyon nodüllerinin oluşumu ise dayanıksızlığa sebep olur ve bu nodüllerin kardiyovasküler olaylar ile ilişkili olduğu düşünülmektedir[52].

2.1.2. Aterosklerotik Risk Faktörleri ve Belirteçleri

Aterosklerozun kesin sebebi ve risk faktörleri tam olarak bilinmemektedir; ancak belli şartlar, davranışlar ya da alışkanlıklar aterosklerozun gelişme ihtimalini artırmaktadır. Yüksek kolesterol ve LDL düzeyleri, kandaki düşük yüsek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyi, hipertansiyon, tütün kullanımı, diabetes mellitus, obezite, hareketsiz yaşam biçimi, yaş gibi risk faktörlerinin birçoğu kontrol altına alınarak, ateroskleroz geciktirilebilir ya da önlenebilir[53].

- **Kolesterol artışı:** Kolesterol; kortikosteroidler, cinsiyet hormonları, safra asidi ve D vitamini gibi steroid hormonlarının öncülü olan bir hidrofilik lipiddir[54]. Kolesterol, hücre içinde üretilir ve fazla miktardaki kolesterol 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA redüktaz inhibitörü kullanımı ile inhibe edilebilir. Hiperkolesterolemi, damarlarda süperoksit serbest radikal üretimini artırır ve endotelyumdan salınan vazodilatörlerin sentezi ile salınımını azaltır. Aynı zamanda endotelyal hücrelerden salınan NO'nun deaktivasyonunu da sağlar[32].
- **Apolipoproteinler ve lipoproteinler:** ApoB, vücudun çeşitli bölgelerine kolesterol taşıyan temel taşıyıcıdır ve LDL reseptörlerinin ligandı olarak görev alır. Yüksek düzeydeki ApoB, ateroskleroza yol açan plakları oluşturabilir ve bunun sonucunda, mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olan kalp hastalığına sebep olabilir. Total serum kolesterolü ve LDL-C'nin tayini, ateroskleroz riskinin belirlenmesi için kullanılan birincil test olmasına rağmen; plazma ApoB seviyelerinin, serum LDL ve total kolesterol düzeylerine kıyasla,

daha geçerli bir kalp hastalığı risk belirleyicisi olduğu da düşünülmektedir. Artan sistemik inflamasyon ya da oksidatif stres, trigliserid bakımından zengin lipoproteinler ve artıklarının plazmada yüksek seviyede bulunması, aşırı miktarda okside lipoA fosfolipidleri; kardiyometabolik riskin temelindeki faktörlerdir.

- **Lipid oksidasyonu:** LDL, oksidasyon tepkimesi sonucunda ox-LDL'ye dönüşür. Ox-LDL, T hücreleri ve makrofajları aktive ederek, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu tetikler, makrofajları sarkoplazmik retikuluma çeker ve köpük hücrelerini oluşturur. LDL oksidasyonu ve içerdiği kolesterol, aterosklerotik plak oluşumunda önemli rol oynar. Bu sürecin başlangıç noktası ise, plazmadaki ya da arteryal membrandaki lipidlerin oksijen ya da yan ürünler ile doymamış olması ve bu lipidlerin oksidasyonudur[6]. Eğer lipid oksidasyonu ürünleri, LDL parçacıklarında birikirse, bu maddeler ApoB-100 proteinin aminoasitleri ile etkileşime girmeye başlar ve kovalent bağları bozarak; LDL'nin negatif yükünün artmasına ve protein kısmının degredasyonuna sebep olur.

  Ox-LDL, nitrik oksit (NO) salınımını ve vasküler düz kasları (VSM) etkileyerek, vasküler kasılmaya yol açar[6]. Bunun yanında ox-LDL; aterosklerozun başlangıç sürecinde görülen monosit kemotaksisi, makrofaj hareketinin inhibisyonu, yağ hücrelerinin oluşumu, endotelyal adezyon moleküllerinin ekspresyonunda artış, büyüme faktörü stimülasyonu, kemokin ekspresyonu, monositlerin çoğalması, yağlı çizgilerin oluşumu ve intimanın kalınlaşması üzerinde etkilidir.
- **Hipertansiyon:** Hipertansiyon; endotelyum üzerindeki hemodinamik baskıyı artırarak endotelyum hasarına sebep olur ve arteryal duvarların lipoprotein geçirgenliğini artırabilir[55]. Hipertansiyonun aterosklerozu nasıl hızlandırdığına dair mekanizma henüz aydınlatılamamıştır; ancak yüksek yağ içerikli beslenen farelerde hipertansiyonun, arteryal duvarlarda yağlı maddelerin birikimini artırdığı gözlemlenmiştir[55,56].
- **Nitrik oksit üretimi ya da işlevinde bozulma:** NO; stres durumları ile bradikinin ve asetilkolin gibi agonistler tarafından stimüle edildiğinde, damarlarda NO endotelyal sentaz (eNOS) tarafından üretilir. NO'nun çeşitli görevleri vardır, ama en önemlisi homeostazı sağlamak için endotelyum kaynaklı vazodilatasyon rolüdür.

  Aterosklerotik damarlarda, düşük eNOS'un bir göstergesi olarak; vasküler yapıdaki bozulmadan da önce endotelyum ile ilişkili vazodilatasyonun meydana

geldiği görülmüştür. Ciddi hiperkolesterolemi gibi bazı patolojik durumlarda, NO yerine hasarlı eNOS ve peroksinitrit üretilmektedir[27]. eNOS disfonksiyonu, ateroskleroz gibi vasküler disfonksiyonlara sebep olmaktadır. Hiperlipidemi, diabetes mellitus, hipertansiyon ve sigara kullanımı gibi bütün ateroskleroz risk faktörleri; hasarlı endotelyum ile ilişkilendirilmiştir. Enzimatik eNOS aktivitesi, ateroskleroz ve hiperlipidemi ile ilişkili farklı mekanizmalar tarafından inhibe edilebilir. Örneğin; ox-LDL ve lipofosfatidilkolin gibi proaterojenik lipidler, aktive reseptörden eNOS'a sinyal iletimini önler[57,58].

Önemli aterojenik basamaklar olan endotelyal ve lökosit adezyonu, VSM hücrelerinin göçü ve platelet agregasyonu; NO tarafından inhibe edilebilir ve eNOS inhibisyonu ateroskleroz gelişimine sebep olabilir[59]. NO'nun vasküler tonus ayarlayabilme yeteneğinin yanında, anti-aterojenik özelliği de bulunmaktadır. NO, antiplatelet etkiye sahiptir ve plateletlerin adezyonu ile göçünü inihibe eder. Aynı zamanda, platelet aktive edici faktörün tetikleyicisi olan trombinin ekspresyonunu da inhibe eder[60]. NO'nun anti-proliferatif etkisi; çoğalmayı, göçü ve ECM sentezini inhibe edebilir. Bununla birlikte, anti-inflamatuvar etkiye de sahiptir[61].

- **İmmün ve enfeksiyon aracılı ateroskleroz:** Doğal ve edinilmiş bağışıklığın aracıları; kronik inflamatuvar bir süreçte öngörüleceği üzere, aterosklerozda görev alır[62]. Kronik durumda; aktive edilmiş makrofajları, T lenfositleri ve mast hücreleri ateromada bulunur. Virüslere ve bakterilere karşı verilen doğal immün reaksiyonlar, aterosklerozda patojenik faktörlerin etkisini belirleyici faktörlerdir. İmmün yanıt, inflamatuvar süreci destekler ve aterosklerozda makrofajların arteryal duvara geçişinin artması ile ilişkilidir[63]. İmmün reaksiyon ve enfeksiyon endotelyal disfonksiyona, hücre hasarına ve pro-inflamatuvar bir çevrenin oluşmasına sebep olur[64].
- **Homeostatik faktörler:** Fibrinojen ve faktör VII (homeostatik faktörler), kardiyovasküler hastalıklardaki risk faktörlerindendir. Fibrinojen, doku ve vasküler hasara karşı gerçekleşen koagülasyon basamaklarında rol oynayan dolaşımdaki bir glikoproteindir[65]. Trombotik etkisinin yanında, fibrinojen hücre çoğalması[66], hasarlı hücresel duvarların kasılması, platelet agregasyonunun tetiklenmesi[67] ve hücre adezyonunun düzenlenmesinde de rol oynar[68]. Faktör VII de trombogenezde önemli göreve sahip bir koagülatif proteindir.

Hiperkolesterolemi hastalarında IL-6 ve C reaktif protein (CRP) gibi inflamatuvar faktörler ile faktör VII arasında patofizyolojik bir etkileşim olduğu, çeşitli çalışmalarda gösterilmektedir[69].

- **İnflamasyon:** İnflamatuvar mekanizmalar, aterosklerozun bütün basamaklarında oldukça önemli rol oynamaktadır. TNF-α, IL-6, IL-8 gibi sitokinler, CRP, ICAM-1 gibi adezyon moleküllerini de içeren çok sayıda belirtecin plazma seviyesinde; kronik inflamasyonu takiben artış görülür[70]. Tromboz da aterosklerotik hasarın gelişmesinde ve kardiyovasküler olayların artışında etkilidir. CRP'nin pro-trombotik aşamanın yürütülmesindeki etkinliği, prekoagülatif etkinin desteklenmesini ya da fibrinolizisin azaltılmasını kapsar[71]. CRP, aterosklerotik plaklarda lipoprotein birikimi ve komplement sistemin aktivasyonu ile ilişkili bir faktördür. Özellikle aterosklerozun ilk basamaklarında, komplementer sistem aktivitesini artırarak aterosklerotik hasarın gelişmesine ve ilerlemesine katkıda bulunur[72]. MMP-9; makrofajlar ve diğer inflamatuvar hücreler tarafından salgılanır ve tümör metastazı, inflamasyon, solunum hastalıkları, vasküler anevrizma, MI veya yeniden biçimlendirme (remodelling) gibi birçok patolojik süreçte varlığı tanımlanmıştır. IL-18 ve MMP-9 varlığı ise hastaları yüksek risk grubuna sokmaktadır. Ancak IL-18'den bağımsız olarak, MMP-9 seviyeleri ile muhtemel kardiyovasküler ölüm riski arasında da güçlü bir bağlantı vardır[73,74].

2.1.3. Ateroskleroz ve İnflamasyon

19. yy'da; ateroskleroz Rudolf Virchow tarafından Almanca inflamasyon olarak tanımlanmıştır. Persistant inflamasyonun ateroskleroz oluşumu ve gelişimindeki rolü uzun zamandır bilinmektedir ve inflamatuvar süreçteki sorunlar, bu olayda etkilidir[75,76]. Akut inflamasyon, patojenlere karşı verilen fizyolojik konak savunması yanıtıdır. Akut inflamasyonun kontrol edilemediği veya çözülemediği durumlarda; otoimmün hastalık, astım, Alzheimer, diyabet, obezite ve kardiyovasküler hastalığın yanında[77,78]; organ disfonksiyonuna bile sebep olabilen kronik inflamasyon gelişir[79].

Akut inflamatuvar yanıt iki aşamadan oluşur: Başlama ve rezolüsyon.

1. Başlama aşaması sırasında; sitokinler, kemokinler ile prostaglandinler ve lökotrienler gibi lipid kaynaklı mediatörleri de içeren kimyasal aracılar, hasar bölgesine immün hücreleri çağırır[79]. Polimorfnükleer nötrofiller ortama ilk gelen hücrelerdir ve patojenlerin fagositozu ile nötralizasyonunu gerçekleştirir.

Eşzamanlı olarak, monositler de inflamasyon bölgesine gelere, makrofajlara farklılaşırlar. Makrofajların da patojenleri yok etmesi ile inflamasyonun rezolüsyon aşaması başlamış olur.

2. Rezolüsyon aşamasında; patojenler yok edilmeye devam ederken, inflamatuvar yanıt baskılanmaya başlar. Bu sırada gerçekleşen ve eferositoz adı verilen süreçte apoptotik hücreler fagositoz yolu ile ortadan kaldırılır ve hasarlı doku tamir edilir. Bu evre; lökotrienler gibi proinflamatuvar mediatörlerde, rezolvin ve lipoksinler gibi özelleşmiş çözümleme mediatörlerinin üretimine geçiş olması ile karakterizedir[80,81].

Prostaglandinleri ve lökotrienleri içeren proinflamatuvar lipid mediatörleri, kan akışını, endotelyal hücre geçirgenliğini ve polimorfnükleer nötrofillerin göçünü artırır[82]. Bu proinflamatuvar aracılar, özelleşmiş rezolüsyon mediatörlerinin sentezini tetikleme özelliğine sahiptir. İnflamatuvar yanıtın başlangıç ve rezolüsyon evreleri arasındaki bağlantının bu şekilde kurulduğu düşünülmektedir.

Günümüzde; aterogenezin çeşitli hücresel ögeler arasında süregelen ilişkiler ile verilen oldukça spesifik hücresel ve moleküler yanıtları barındırdığı bilinmektedir. Yağlı çizgi oluşumundan başlayarak, plak erozyonu ve rüptürü ile sonuçlanan akut olayların meydana geldiği aterosklerotik bölgede inflamatuvar bir reaksiyon gerçekleşmektedir. İnflamasyonun plak gelişimini ve hassasiyetini etkilediğini gösteren çalışmalar hala devam etmektedir[83]. Ancak; inflamasyon ve aterogenezin bir sebep-sonuç ilişkisi içinde olup olmadığı veya inflamasyonun doku hasarına karşı verilen yanıt olarak mı oluştuğu henüz net değildir.

İnflamatuvar yanıtın kendisi, damar duvarında lipoprotein transferini etkileyebilir[84]. TNF-α, IL-1, M-CSF gibi proinflamatuvar sitokinler; hem LDL'nin endotelyuma ve düz kas hücrelerine bağlanmasını, hem de LDL-reseptör geni transkripsiyonunu artırır[85]. Aterosklerozun bütün evrelerinde yüksek miktarda ROS salınımı olduğu da bilinmektedir. ROS; NO'yu denature ederek endotelyal disfonksiyonu tetikler, inflamatuvar hücreler için kemoatraktan görevi görür, plateletleri active eder, düz kas hücresi proliferasyonunu indükler ve proaterojenik lipidleri okside eder[86]. Aktive olan lökositler de; endotelyum, düz kas hücresi ve monosit/makrofajlar üzerindeki çöpçü reseptörler ile alınan LDL-C'yi okside ederek ROS salgılar. Çöprçü reseptörlere bağlandıktan sonra; proteazların, proinflamatuvar sitokinlerin ve hücresel apopotozun tetiklenmesi gibi bir dizi intraselüler olay, ox-LDL tarafından başlatılır. Bu şekilde;

şiddetli bir inflamasyon döngüsü ve lipoproteinlerin modifikasyonu da başlamış olur. Modifiye lipoproteinlerin varlığı, arterlerde daha da fazla inflamasyon oluşumunu tetikler. Kısaca, inflamasyon daha fazla inflamasyonu meydana getirir ve döngü devam eder[87]. Yani; gelişmiş aterosklerotik plakların oluşumundaki en temel faktörlerden birinin çözümlemeyi tetikleyen aracılar ile proinflamatuvar mediatörler arasındaki dengesizlik olduğu anlaşılmıştır. Nekrotik çekirdek ve ince fibröz başlığa sahip insan aterosklerotik plak bölgelerinde; çözümleme mediatörlerinin ekspresyonunun düşük, proinflamatuvar aracı seviyelerinin ise yüksek olduğu tespit edilmiştir. Daha az nekroz ve daha kalın fibröz başlık olan plaklarda ise bu durum tam tersi olarak gösterilimiştir[75].

Arteryal duvardaki inflamasyon; aterosklerotik lezyonların oluşumunda görev alan endotelyal hücreler, monositler/makrofajlar ve düz kas hücrelerindeki hücresel bileşenlerin aktivasyonu ile karakterizedir. Bu hücresel aktivasyon ile; başta MMP'ler olmak üzere subendotelyal matriks modifikasyonuna dahil olan birçok yapısal proteinlerin ve enzimlerin sentezi ile salınımında artış görülür[88]. Ekstraselüler matriks yeniden modellemesini içeren bir patolojik sürece sahip olan doku tamiri, kutanöz iyileşme, embriyogenez ve anjiyogenez gibi bütün olaylarda MMP'ler görev alır[89]. MMP'ler; endotelyal hücreler ve makrofajlar da dahil olmak üzere bütün vasküler hücreler tarafından salınır[90]. MMP'lerin kardiyovasküler hastalıklardaki etkileri arasında aterosklerotik plak kopma eğiliminin artması da bulunur[88]. MMP aktivite düzeylerindeki farklılıklar ile stabil olmayan anjina ve plak bozulması gibi ateroskleroz ile ilgili birçok süreç ilişkilendirilmiştir. Bu bağlantının temelinde, aterosklerotik plak dış yüzeyindeki ekstraselüler matriks bileşenlerinin MMP-aracılı yıkımının olduğu düşünülmektedir[90].

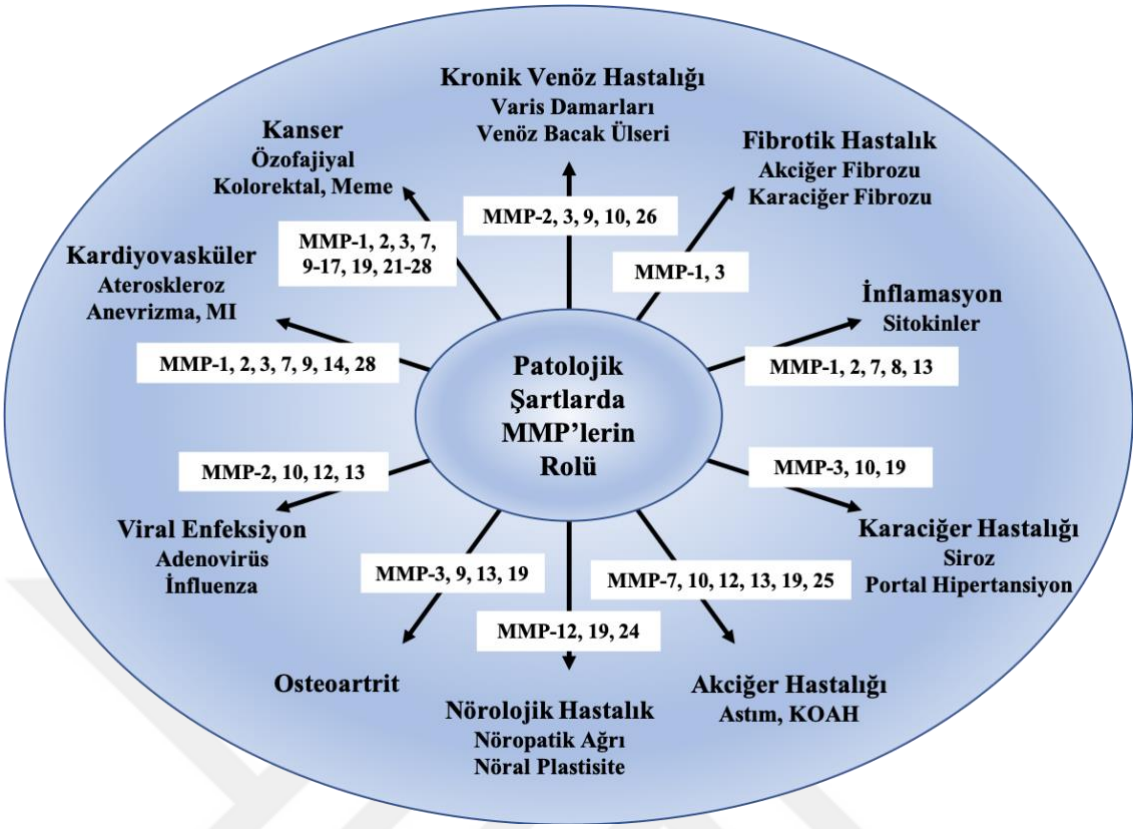
2.2. Matriks Metalloproteinazlar

MMP'ler; ECM'deki çeşitli proteinlerin degradasyonunda ve doku yeniden modellenmesinde primer role sahip çinkoya bağımlı endoproteaz ailesine mensup enzimlerdir[91]. MMP'ler ilk defa 1960'ların başında kara kurbağa larvası kuyruğunun metamorfozu sırasında, ECM protein degradasyonunu sağlayan kollajen proteolitik aktiviteleri izlenirken keşfedilmiştir. Kollajenaz adı verilen bu enzimin amfibilerin normal gelişme ve büyüme evrelerinde önemli rol oynayarak; doku sentezi ve yıkımı arasındaki dengeyi sağladığı fark edilmiştir[92]. Günümüzde ise MMP'ler, proteazların metzincin üst ailesine mensup matriksinler olarak tanımlanmaktadır. Metzincin üst ailesi, katalitik bölgesinde üç histidin amino asidi içeren ve Zn^{2+} iyonunu şelatlayan yüksek

derecede korunmuş bir motif ile karaterizedir[93]. MMP'ler geniş substrat spesifitesine sahiptir ve farklı hücre ve doku tiplerinde yaygın olarak eksprese edilen çinko-bağımlı endopeptidazlardır[94].

Farklı proteinleri ve ECM'nin proteoglikan bileşenlerini yıkabilme özelliğine sahip, çözünebilir veya hücre membranına bağlı proteinazlar olarak üretilirler. Bunun yanında; sitokinler, kemokinler, büyüme faktörleri, büyüme faktör reseptörleri ve hücre yüzey adezyon reseptörleri gibi çeşitli non-matriks substratların kesilmesinde veya yıkımında da MMP'ler görev almaktadır[95]. MMP ailesi üyelerinin dokuya spesifik ekspresyonlarında ve substrat spesifisitelerinde görülen farklılıklar; onları doku homeostazı, konak savunması ve doku tamiri gibi çeşitli fizyolojik durumlarda rol oynayan proteolitik enzimler haline getirmektedir. Fizyolojik işlevlerinin yanında; romatoid artrit, osteoartrit ve kronik kutanöz ülser ile kanser gelişimi gibi fokal doku yıkımının gözlendiği inflamatuvar hastalıklarda da birçok MMP'nin ekspresyonu ve aktivitesi görülmektedir[96,97] (Şekil 2-2). Fizyolojik duurmlarda, MMP ekspresyonu ve aktivitesi sıkı kontrol altında iken; MMP'lerin aşırı aktivitesi genellikle patolojik şartlarda görülmektedir[98]. MMP'ler, inflamatuvar fonksiyonları çeşitli seviyelerde yönetebilirler[95]. Örneğin; inflamatuvar hücrelerin vaskülatürden dokudaki inflamasyon bölgesine transmigrasyonunu düzenleyebilirler. ECM bileşenleri, büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler ile etkileşime girerek; inflamatuvar hücrelerin inflamasyon bölgesine çağrılmasında ve bölgeye alınmasında görev alabilirler[94].

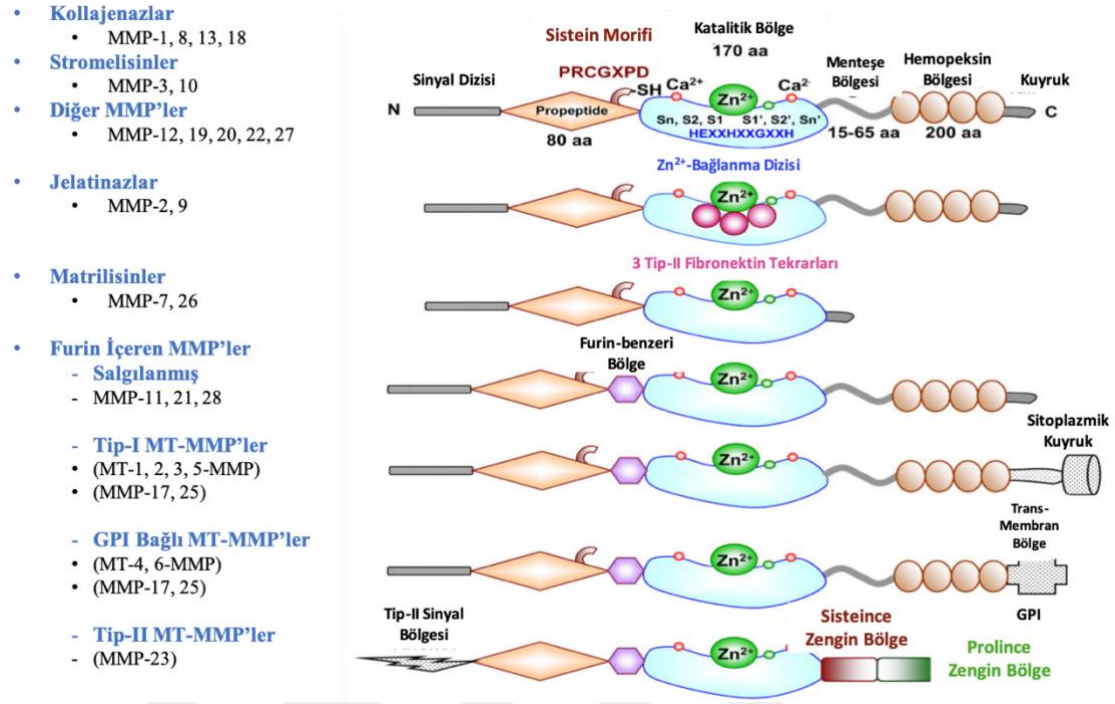
Günümüze kadar, insanlarda MMP ailesine mensup 23 adet metalloproteinaz tanımlanmıştır. Yapıları, substrat özgüllükleri ve fonksiyonları göz önünde bulundurulduğunda; MMP'ler farklı alt gruplarda sınıflandırılabilir: kollajenazlar (MMP-1, -8 ve -13), jelatinazlar (MMP-2 ve -9), stromelisinler (MMP-3 ve -10), stromelisin-benzeri MMP'ler (MMP-11 ve -12), matriliisnler (MMP-7 ve -26), transmembran MMP'ler (MMP-14, -15, -16 ve -24), glikozil fosfatidilinositol-tipi MMP'ler (MMP-17 ve -25), MMP-19 benzeri MMP'ler (MMP-19 ve -28) ve diğer MMP'ler (MMP-18, -20 ve -23)[99].



Şekil 2-2: Farklı MMP alt türlerinin patolojik durumlardaki rolleri[91]

2.2.1. MMP Yapısı

MMP ailesinin bütün üyeleri, yapıları bakımından homologdur ve neredeyse tamamı dört temel fonksiyonel bölge içerir: sinyal peptidi, propeptid, katalitik bölge ve hemopeksin-benzeri bölge. N-ucu sinyal peptidi farklı uzunluklarda olabilir ve MMP'lerin salgılanabilmesi için gereklidir[94]. Yaklaşık 170 amino asitten oluşan ve proteolitik aktiviteden sorumlu bir katalitik metalloproteinaz bölgesi ile yaklaşık 80 amino asitten oluşan ve korunmuş sistein amino asidi sayesinde katalitik cepteki Zn^{2+} iyonu ile etkileşime geçerek MMP aktivitesini düzenleyen bir propeptid, bütün MMP'lerde ortak olarak bulunur. 'Sistein switch' olarak da bilinen bu kovalent etkileşim, enzimin latent yani katalitik olarak inaktif halde kalmasını sağlar. Yaklaşık 200 amino asitten oluşan C-ucu hemopeksin-benzeri bölge, matrilisinler ile MMP-23 hariç bütün MMP'ler için ortaktır ve enzimin substratı tanımasını sağlar[99-101] (Şekil 2-3).



Şekil 2-3: Temel MMP alt türleri ve yapıları[91]

2.2.2. MMP Aktivasyonu

MMP'ler, pre-proMMP'ler olarak sentezlendikten sonra; translasyon sırasında sinyal peptidinin kesilmesi ile proMMP'lere dönüştürülürler. Proenzim olan proMMP'deki 'sistein switch' motifi, katalitik Zn^{2+} iyonu ile koordine olarak proMMP'nin inaktif halde kalmasını sağlar[100]. ProMMP'nin aktivasyonu, propeptiddeki sistein amino asidinin tiyol grubu ile katalitik bölgedeki çinko iyonu arasındaki kovalent bağın yıkımını gerektirir[99]. Yani, proMMP'nin aktif hale gelmesi için; 'sistein switch' bölgesi kesilir ve prodomain, serin proteazları, endopeptidaz furin, plazmin veya diğer MMP'ler gibi proteolitik enzimler tarafından ayrılarak aktif MMP formları üretilir[100]. Buna ek olarak; inflamatuvar süreçlerde lökositler tarafından üretilen reaktif oksijen ve hipokloröz asit de 'sistein switch' ile etkileşime girerek, MMP aktivitesini düzenleyebilir[102].

2.2.3. MMP Substratları

ECM; lifler, proteoglikanlar ve polisakkaridler olmak üzere üç temel bileşenden meydana gelir. Lifler; temel ECM proteini olan kollajen ile glikolize olmamış elastini içeren glikoproteinlerden oluşur ve arterler, akciğerler ile deri gibi belirli dokulara

plastisite ve fleksibilite sağlar. Laminin, epitelyumun bazal laminasında lokalize olan bir glikoproteindir. Fibronektin, ECM'ye bağlanan hücreler taraından kullanılan bir glikoproteindir ve hücre iskeletinin, hücre hareketini kontrol etmesini sağlar. Proteoglikanların yapısındaki karbohidrat miktarı proteinden daha fazladır ve ECM'yi hidrate halde tutabilmek için su çekme özelliğine sahip bileşenlerdir. Diğer ECM proteinleri ise; vitronektin, agrekan, entaktin, fibrin, tenaskin ve hyaluronik asit gibi polisakkaritleri de içeren glikoproteinlerdir[103]. MMP'lerin temel görevleri, çeşitli dokularda ECM'yi degrade etmektir ve substratları arasında kollajen, elastin, jelatin, matriks glikoproteinleri ve proteoglikanlar bulunur[104]. Çeşitli ECM proteinlerinin döngülerini kontrol ederek doku yeniden modellenmesinde önemli rol oynarlar. Kollajen ve elastin, vasküler duvarın yapısal bütünlüğü için gereklidir ve önemli MMP substratlarındandır. Farklı MMP türleri; kollajen tip I, II, III, IV, V, VI, VII, XI, X ve XIV'ü farklı efikasiteler ile yıkarlar. Bunun yanında, agrekan, entaktin, fibronektin, tenaskin, laminin, myelin ve vitronektin gibi diğer ECM protein substratlarının degradasyonunda da etkinlik gösterirler[91].

2.2.4. MMP Aktivitesi

Normal şartlarda sağlıklı ve hasar görmemiş dokularda MMP'lerin proteolitik aktiviteleri düşüktür[94]. MMP'ler normal fizyolojik şartlar altında temel seviyede eksprese edilirken; bazı durumlarda belirli hormon, büyüme faktörleri ve sitokinlere yanıt olarak belirli metalloproteinazların ekspresyon seviyeleri değişebilir[105]. *In vivo* üretimi birçok stimülan tarafından tetiklenen MMP'ler'in proteolitik aktivitesi, çeşitli aktivatörler ve inhibitörler tarafından düzenlenir. MMP ekspresyonu; TNF-α gibi inflamatuvar sitokinler ile epidermal büyüme faktörü ve TGF-β gibi büyüme faktörleri tarafından transkripsiyonel düzeyde artırılabilir. MMP ekspresyonu aynı zamanda; hormonlar, tümör promotörleri, hücre-hücre etkileşimi ve hücre-ECM etkileşimi ile de düzenlenebilir[106]. MMP-1, -3 ve -2 gibi belirli MMP'lerin ekspresyonu da post-transkripsiyonel düzeyde mRNA stabilitesinin değişmesiyle regüle edilebilir[107].

MMP'ler; bağ doku hücreleri, fibroblast proinflamatuvar hücreler, osteoblastlar, endotelyal hücreler, makrofajlar, nötrofiller ve lenfositler gibi çeşitli dokularda salgılanır[105]. ECM yeniden düzenlenmesinde temel rol oynayan MMP'ler özellikle bağ dokuda yoğun bir şekilde bulunmalarının yanında; birçok farklı hücre tiplerinde de lokalize olmaları sebebi ile, başka biyolojik görevleri olduğu da söylenebilir. MMP'ler;

hücre proliferasyonu, migrasyonu ile farklılaşmasını kontrol eder ve hücre apoptozu, anjiyogenez, doku tamiri ile immün yanıtta rol oynar. Aynı zamanda, hücre yüzeyindeki biyoaktif molekülleri etkileyerek, çeşitli hücresel süreçleri ve sinyal yolaklarını da düzenleyebilirler. Gebelik ve yara iyileşmesi gibi normal biyolojik süreçlerin yanında; ateroskleroz, anevrizma ve varisli damarlar gibi kardiyovasküler hastalıklarda, osteoartrit ve kemik erimesi gibi kas-iskelet hastalıklarında ve çeşitli kanser türlerinde, MMP ekspresyonu ile aktivitesinde değişiklikler görülür[91]. MMP substratlarından olan yapısal fibröz proteinlerinin birçoğu, damar duvarını çevreleyen ECM'de bulunmaktadır. ECM yapısındaki değişikliklerin baskın olduğu ateroskleroz, kalp yetmezliği, amfizem ve KOAH gibi birçok patolojik durumda MMP aktivitesinde bozulmalar gözlemlenmiştir [108,109]. MMP-1, -2, -3, -9 ve -12 genlerinde meydana gelen çeşitli polimorfizmler ile iskemik inme arasındaki ilişkiyi gösteren çalışmalar mevcuttur [110].

ECM degredasyonundaki görevlerine ek olarak; MMP'lerin farklı hücre tiplerindeki lokalizasyonu immünohistokimyasal yollarla gösterilmiştir. Buna bağlı olarak da, hem bu hücrelerin ECM'ye MMP salgılayabileceği, hem de MMP'lerin hücre sinyalizasyonu ile hücre içi yolaklarda rol alabileceği anlaşılmıştır. MMP ile indüklenen sinyal yolakları, kan damarları da dahil olmak üzere birçok doku ile yapılan çalışmalarda aydınlatılmaya çalışılmıştır[111].

Endotelyum; NO ve prostasiklin gibi gevşetici faktörler salgılayarak ve endotel kökenli hiperpolarize edici faktör (EDHF) aracılığı ile VSM hücrelerinin hiperpolarizasyonunu sağlayarak vasküler tonusu kontrol eder[112]. MMP'ler proteaz aktive edici reseptörleri (PAR) stimüle eder. PAR 1-4, insanlarda ve diğer canlılarda tanımlanmış G-protein kenetli reseptörlerdir. PAR-1; VSM hücrelerinde[113], endotelyal hücrelerde ve plateletlerde[114] eksprese edilir ve NO üretimi ile birlikte vazodilatasyona yardımcı olur[115]. Buna ek olarak; MMP-2, EDHF salınımı artırır ve Ca^{2+} ile aktive olan K^{+} kanallarından hücre dışına K^{+} akışını artırabilir. Böylece venöz dokunun hiperpolarizasyonuna ve gevşemesine yol açabilir[116].

Çeşitli patolojik şartlar altında ve damarların farklı bölgelerinde MMP ekspresyonlarında değişiklik olduğu bilinmektedir. Patolojik durumlarda, özellikle MMP-2 ve MMP-9 konsantrasyonlarında artış gözlemlenmektedir[105].

2.2.5. Jelatinazlar

Jelatinaz A (MMP-2) ve jelatinaz B'den (MMP-9) oluşan jelatinazlar; MMP ailesindeki diğer proteinazlara yapısal olarak benzerlik gösterir; ancak diğerlerinden farklı olarak jelatine bağlanabilmeleri için gerekli olan, katalitik bölgenin N-ucunda üç adet fibronektin tip II tandem tekrarlarından oluşan kollajen-bağlanma bölgelerine de sahiplerdir. MMP-2 ve MMP-9, proteolitik degradasyonun temel oyuncularındandır[91] ve varisli damarlarda yüksek oranda eksprese edilirler. Özellikle son zamanlarda, birçok non-matriks proteinin de jelatinaz substratı olduğu belirlenmiştir ve bu şekilde bu enzimlerin embryonik büyüme ve gelişme, anjiyogenez, vasküler hastalıklar, inflamasyon, bulaşıcı hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve tümör gelişimi gibi birçok fizyolojik ve patolojik durumda da proteolitik düzenleyici olarak görev aldıkları anlaşılmıştır[91]. MMP-2 ve MMP-9'un, sıçanlarda vena cava inferiorun; intima, media ve adventisya dahil farklı tabakalarında lokalize olması; endotelyal hücrelerdeki sinyal yolaklarının, VSM ve ECM ile ilişkisini göstermektedir[117]. Yapılan başka çalışmalarda da; MMP-2'nin adventisya tabakasında ve MMP-9'un endotelyal hücreler, medial VSM hücreleri ile adventisyal mikrodamarlarda bulunduğu belirtilmiştir[118]. MMP-2 ve MMP-9, mediadan intimaya düz kas hücre migrasyonu ile başlatılıan neointima oluşumunda rol oynar. Artan MMP-2 ekspresyonu ile başlık rüptürü, intraplak kanama ve ince fibröz başlık arasında bir korelasyon bulunmaktadır. Başlık rüptürü ve geniş lipid merkez ile artan MMP-9 ekspresyonu arasında da benzer bir ilişki mevcuttur[119].

2.2.5.1. MMP-2

Jelatinaz-A veya tip IV kollajenaz olarak da adlandırılan MMP-2'yi kodlayan genin lokusu kromozom 16q13-q21 bölgesidir. MMP-2'nin hücre yüzeyinde aktive edilmesi, ekstraselüler alanda bölgesel kollajenolitik aktivitesini gösterebileceği hücre çevresinde birikmesini sağlar[120]. MMP-2, kollajeni iki fazda keser; ilk kısım intersitisyel kollajenaz aktivitesi ile benzerlik gösterirken; bunu takip eden jelatinoliziz aşaması fibronektin-benzeri bölge tarafından gerçekleştirilir[121]. MMP-2'nin kollajenolitik aktivitesi, kollajenazlara göre çok daha zayıftır. Ancak; proMMP-2 hücre yüzeyine taşındıktan sonra, MT1-MMP/TIMP-2 kompleksinin de yardımı ile otokatalitik kesime uğrar ve hücre çevresinde birikerek bölgesel kollajenolitik aktivite gösterebilir[100]. MMP-2 birçok hücre ve dokuda yaygın olarak bulunur ve anjiyogenez, doku tamiri ile inflamasyon gibi çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçte görev alır[91]. MMP-2'den yoksun

ApoE-eksik farelerde, LDL-C'nin düzgün olarak işlenememesinden ve kan dolaşımında kalmasından dolayı aterogenezde azalma görüldüğü için, MMP-2nin aterosklerozu başlatmada görev aldığı düşünülmektedir[122].

2.2.5.2. MMP-9

Jelatinaz B olarak da adlandırılan MMP-9 da bir tip IV kollajenazdır ve enzimi kodlayan genin lokusu kromozom 20q11.2-q13.1 bölgesidir. MMP-9'un aktif forma dönüştürülmesinde bir MMP aktivatörü olan plazmin görev alır[103]. MMP-9; epitelyal hücreler, fibroblastlar, keratinositler, osteoblastlar, dendritik hücreler, makrofajlar, granülositler, T-hücreleri ve endotelyal hücreler olmak üzere farklı hücre tipleri tarafından eksprese edilir[91]. Akut hipertansiyona sahip sıçanlar ile yapılan bir çalışmada, mezenterik arterlerde yüksek MMP-9 aktivitesi olduğu görülmüştür[50]. Koroner arter hastalığına sahip bireylerde görülen düşük dereceli inflamasyon durumundaki ekspresyon profilinin incelendiği bir çalışmada da, MMP-9 düzeyinin arttığı ve potansiyel bir biyobelirteç olabileceği belirtilmiştir. Yüksek MMP-9 serum seviyeleri, artan intimal kalınlık ve plak dayanıksızlığı ile bağlantılıdır[123]. MMP-9-eksik fareler ile yapılan bir çalışmada, MMP-2 ve MMP-9'un, mediadan intimaya düz kas hücre migrasyonu ile başlatılan neointima oluşumunda rol oynadığı belirtilmiştir[124].

2.2.6. MMP ve İnflamasyon

Yapılan çalışmalarda, MMP'lerin, inflamasyonu birçok açıdan modüle ettiği gösterilmektedir[94]. MMP ekspresyonu/aktivitesi inflamatuvar süreçlerde artış gösterir. İnflamatuvar hücreler tarafından gerçekleştirilen MMP salınımı, pro-inflamatuvar sitokinlerin kontrolünde gerçekleşir[91]. MMP-eksik fareler ile yapılan çalışmalarda, inflamasyon içeren deneysel modellerde belirli MMP'lerin spesifik görevleri belirlenmiştir. MI, sererbral iskemi, astım ve MS modeli oluşturulmuş fare deneylerinde, MMP-9'un bu hastalıkların patofizyolojisinde rol aldığı kanıtlanmıştır[125]. Bunun yanında, deneysel otoimmün ensefalomyelitis modeli oluşturulan farelerde, MMP-2, -7 ve -8 düzeylerinin arttığı gözlemlenmiştir[126].

MMP'ler sitokinler ve kemokinler gibi inflamatuvar aracıların gerekli bölgede bulunması ile aktivite göstermesini yönetirler. Bununla birlikte, hasar veya inflamasyon bölgesine inflamatuvar hücrelerin çağrılması için dokuda kemokin gradyenti oluşturabilirler ve inflamatuvar hücrelerin hayatta kalmasına yardımcı olabilirler[95]. Kemokinler, inflamatuvar hücrelerin migrasyonunu ve aktivasyonunu kontrol ederler.

MMP'ler inflamasyonlu dokuda kemokin gradyentini düzenleyerek, inflamasyon veya hasar bölgesine inflamatuvar hücre göçünü sağlayabilir. Şartlara bağlı olarak; MMP'ler proteolitik aktivite göstererek sitokinler ile kemokinlerin biyolojik işlevlerlerini aktive, inaktive veya antagonize edebilirler ve bu yolla inflamasyonu artırabilir veya baskılayabilirler. Bunun yanında, inflamatuvar hücrelerin sitokinler ve kemokinler tarafından stimülasyonu, yine MMP üretimi tarafından indüklenebilir. TNF-α ve IL-1β; MMP'ler tarafından regüle edilen potent pro-inflamatuvar sitokinlerdir. MMP-1, -2, -3, -7, -9, -12, -13 ve -17 gibi birçok MMP, TNF-α'yı keserek aktive edebilir[127,128]. Kemokinler; inflamatuvar hücreleri dokudaki inflamasyon bölgesine çekerek inflamasyonda önemli rol oynarlar ve kemokin aktivitesi hedef hücre yüzeyinde spesifik reseptörlerin eksprese edilmesine bağlıdır. Kemokinlerin mobilizasyonunun kontrolünde de yine çeşitli MMP'ler görev almaktadır[129].

Alerjik akciğer inflamasyon modelinde, MMP-9-eksik farelerde inflamatuvar hücrelerin alveolar boşluğa giremediği gözlemlenmiştir. Aynı modelde, MMP-2'nin inflamasyon bölgesindeki lökosit migrasyonundaki görevi de gösterilmiştir. MMP-2-eksik farelerde, CCL11 kemokin gradyentinin ve eozinofillerin havayolu lümenine girişinin azaldığı belirtilmiştir. Bu modelde, MMP-9 eksikliğinin inflamasyon üzerinde MMP-2'ye göre daha potent bir etkisi olduğu bildirilmiştir. Bunun sebebi olarak da, MMP-9'un yokluğundan birçok kemokinin etkilenmesi sonucunda, nötrofiller ile eozinofillerin lümene girişindeki bozukluğun meydana gelmesi gösterilmiştir[130].

Ateroskleroz; MMP aktivasyonunun dahil olduğu inflamatuvar bir süreçtir. Aterosklerotik süreçte, MMP-1, -2, -3, -8 ve -9; intimayı mediadan ayıran matriksi degrade ederek, vasküler yeniden modellenmeyi ve mediadan intimaya doğru gerçekleşen düz kas hücre migrasyonunu sağlar. Bu düz kas hücre migrasyonu, damar duvarının oklüzyonuna ve ihtiyaç durumunda oksijen ile besini dokulara taşıyan kan akışının düşmesine sebep olur[105]. MMP'ler aynı zamanda fiziksel bariyerlerin bütünlüğünü ve lökositlerin vaskülatürden dokuya transmigrasyonunu da düzenleyebilirler[94].

2.3. Statinler

Ateroskleroz gelişimi, kompleks metabolik ve inflamatuvar süreçlerin karşılıklı etkileşimi sonucu gerçekleşir[131]. Özellikle LDL-C olmak üzere, ApoB içeren lipoproteinlerin aterogenezin temel sebebi olduğu kanıtlanmıştır[132]. 3-hidroksi-metilglutaril koenzim A (HMG-CoA) redüktaz inhibitörleri olarak da bilinen statinler;

kolesterol biyosentezini azaltır ve serum LDL-C ile trigliserid düzeylerini düşürür[133]. Hem LDL-C'ye bağlı hem de LDL-C'den bağımsız (peliotropik) etkileri olan statinler; koroner kalp hastalığından hem primer hem de sekonder korunmada oldukça etkilidir[134-136].

HMG-CoA redüktaz, mevalonat üretiminde görev alır ve karaciğerde kolesterol biiyosentezinde hız sınırlayıcı enzimdir. Statinler; HMG-CoA redüktazın yapısında lakton halkası ve yan zincirleri aracılığıyla enzimin aktif bölgesine bağlanarak, kompetetif ve reversibl olarak enzimi inhibe ederler[137]. 1987'den beri piyasada olan farklı tür statinler; lipofilite, eliminasyon yarı ömrü ve potens bakımından birbirlerinden farklıdır. Kolesterol sentezinin statinler tarafından inhibisyonu, kolesterol üretiminin azalmasına ve LDL reseptörünün ekspresyonunun artmasına sebep olur[133].

Statinlerin anti-inflamatuvar pleiotropik etkileri, perioperatif riski azaltmak amacı ile incelenmektedir. Atriyal fibrilasyonda ve koroner by-pass cerrahisi sonrasında, statinlerin faydalı etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur[138]. Statinlerin özellikle CRP üzerindeki olumlu etkileri, onların pleiotropik etkilerini gösterir niteliktedir. Akut koroner sendrom hastaları ile yapılan bir çalışmada, atorvastatinin yüksek ve düşük LDL-C seviyelerine sahip hastalarda primer sonlanımı azalttığı ve CRP seviyesini %83 oranında düşürdüğü gözlemlenmiştir[139].

Statinlerin LDL-C düşürücü etkilerini, potansiyel pleiotropik etkilerini ayırabilmek oldukça zordur. ApoB içeren lipoprotein seviyesini düşürmek, statinlerin en önemli etki mekanizmasıdır. Bu ilaçların insanlardaki pleiotropik etkilerinin varlığını kanıtlayan çalışmalar günümüzde hala devam etmektedir; ama LDL-C seviyelerini düşürmeye olan katkısı tam olarak aydınlatılamamaktadır[140]. Yüksek doz statin tedavisinin plak oluşumunu azaltmadaki etkisinin, LDL-C düşürücü etkisinin yanında anti-inflamatuvar etkisi ile de oldukça ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur[141,142].

2.4. Koroner Arter Bypass Grefti

Koroner arter hastalığı (KAH), aterosklerotik plağın epikardiyal koroner arter lümeninde patolojik olarak birikmesi sonucu, daralma ve oklüzyona sebep olması ile oluşur. KAH, miyokardiyuma antegrad kan akışını bozarak, doku hipoksisine yol açar. Bu süreç, klinikte stabil ve stabil olmayan anjina ile bazı durumlarda MI olarak kendini

gösterir. İskemik kalp hastalığı; anjina pektoris, MI ve sessiz MI gibi KAH sonucunda ortaya çıkan bütün klinik olayları kapsar[143].

Miyokardiyumu kurtarmak için, koroner arter açıklığının sağlanarak, kan akımının mümkün olduğu kadar erken bir şekilde düzenlenmesi gerekir. İskemik kalp hastalığının yönetilmesinde, farmakolojik veya girişimsel tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Otolog vasküler greft kullanılarak epikardiyal koroner arterin tıkanmış segmentinin bypass edilmesi sıklıkla uygulanan girişimsel tedavi seçeneklerinden biridir. Koroner arter bypass grefti olarak da adlandırılan bu prosedürün, iskemik kalp hastalarında en etkili tedavi yöntemi olduğu belirtilmiştir[144-146].

Miyokardiyumun revaskülarizasyonu için ideal yolu bulmak için farklı damar türleri ile çalışmalar yapılmıştır. Bunlar arasında, büyük safen ven, küçük safen ven, sefalik ven, bazilik ven, umbilikal ven, sol internal mamariyel arter, sağ gastro-epiploik arter, inferior epigastrik arter, radyal arter, splenik arter, gastro-duodenal arter, sol gastrik arter, interkostal arter ve bovin internal mamariyal arteri bulunmaktadır. Deneysel amaçlarla dakron ve politetrafloroetilendan yapılan sentetik greftlar da kullanılmıştır. Bütün bunların arasında safen ven ve internal mamariyal arter (İMA) ise en sık kullanılan iki damar türüdür[147].

2.4.1. Safen Ven

Her ne kadar İMA'nın patensi daha yüksek olsa da; safen ven, birçok hastada sarf edilebilir, çalışılması kolay, yeterli uzunlukta ve en önemlisi çıkarılması kolay olduğu için bypass cerrahisinde sıklıkla tercih edilmektedir[148,149]. Safen ven grefti, ihmal edilebilir bir dirence sahip, geniş bir damar olduğu için; kompetitif koroner akıştan etkilenmez[150]. Günümüzde safen veni çevreleyen yağ doku ile birlikte damarın kolayca çıkarılabilmesi, kısa ve uzun dönemde patensini geliştirmiştir[151].

Düşük patens oranı, safen venin en büyük dezavantajlarındandır[152]. Damarlar en verimli şekilde; düşük kesme gerilimi ve düşük mekanik gerilime sahip, düşük basınçlı ortamda iş görür. Böyle bir yapı, arteryal basınca ve pulsatil akıma maruz kaldığında, damar yapısında vasküler yeniden modellenme görülür. Bu yeniden modellenme, safen venin düzenini ve duvar yapısını bozarak, birçok klinik komplikasyona davetiye çıkarabilir[153,154]. Safen ven greftinin koroner by-pass cerrahisinde kullanımının ilk yılında, hastaların yaklaşık %20'sinde anjina görülür. Safen ven greft hastalığının

görülmesinde etkili olan sebepler arasında da; hedef damar yarıçapının 2 mm'den az olması, dislipidemi, hipertansiyon ve tütün kullanımı bulunmaktadır[143].

Koroner arter bypass cerrahisini takiben iki yıl içinde, gelişen intimal hiperplazi sebebi ile greftların büyük çoğunluğu revaskülarizasyona ihtiyaç duymaktadır. Cerrahi girişimin ardından iki yılı geçirdikten sonra uzun vadede görülebilen safen ven greft yetmezliği ise; artan intimal hiperplazi ve aterosklerotik lezyonların gelişimi ile kendini gösterir[155,156]. Greft yetmezliğine sebep olan ven greft hastalığının patofizyolojisi, birbirleri ile bağlantılı tromboz, intimal hiperplazi ve ateroskleroz süreçlerinden oluşur[157].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, atorvastatin ve pitavastatinin anti-inflamatuvar etkilerini, kültüre edilen insan safen ven endotelyal hücrelerinin TNF-α ile indüklenmesi ile oluşturulan inflamasyon modelinde gözlemlemek amacı ile insan safen ven endotelyal hücreleri kullanılmıştır. Protokollerine uygun şekilde kültüre edilen hücrelere ön ilaç uygulamaları yapıldıktan sonra, hücreler TNF-α ile uyarılmıştır. Ardından, ELISA yöntemi ile LDH miktarı tayini yapılmıştır ve qRT-PCR yöntemi ile de MMP-2 ve MMP-9 enzimlerinin ekspresyon miktarı tespit edilmiştir. Uygulamalar duplike olarak, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Beyin ve Nörodejeneratif Hastalıklar Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. İnsan Safen Ven Endotelyal Hücre Kültürü

Hücre kültürü deneylerinin bütün aşamaları laminar akışlı kabin altında yapıldı. Deneylerde PromoCell C-12231 katalog numaralı insan safen ven endotelyal hücreleri kullanıldı. Donmuş halde alınan hücreler, protokole uygun olarak çözüldü ve kültüre edildi.

1. Önceden dondurulmuş hücreler, çözünmesi için 37°C'deki su banyosunda 2 dk boyunca bekletildi.
2. Çözünen hücre süspansiyonu 220 g'de 3 dk boyunca santrifüj edildi.
3. Süpernatant atıldı ve hücre pelleti 1 mL PromoCell Endothelial Growth Medium (C-22010) içerisinde çözüldü.

3.1.1. İnsan Safen Ven Endotelyal Hücreleri Büyüme Medyumunun Hazırlanması

Promocell Endothelial Cell Growth Medium (C-22010), supplement mix ile karıştırılarak, büyüme medyumu hücre kültürüne hazır hale getirildi.

1. 500 mL bazal medyum içerisine, 12,2 mL supplement mix eklendi.
2. Karışım 0,20 µm filtreden geçirilerek büyüme medyumu hazırlanmış oldu.

3.1.2. Hücre Kültürü Flasklarının Hazırlanması

İnsan safen ven endotelyal hücrelerinin ekileceği 25 cm^2-flasklar, hücrelere uygun ortamı sağlayabilmek için Tip I Kollajen ile kaplandı.

1. 4950 µL 20 mM asetik asit içerisine 50 µL stok Tip I Kollajen çözeltisi eklenerek, kaplama çözeltisi hazırlandı.

2. Bir adet 25 cm^2-flask için cm^2'ye 100 µL Tip I Kollajen çözeltisi olacak şekilde 2,5 mL hazırlanan kaplama çözeltisi eklendi.
3. Hafifçe çalkalandıktan sonra, 1 saat boyunca laminar akışlı kabinde inkübasyona bırakıldı.
4. 1 saat sonra flasktaki Tip I Kollajen çözeltisi vakumla aspire edildi.
5. 3 kez 2,5 mL PBS ile yıkama yapıldı. Son yıkamanın ardından flaska 2,5 mL büyüme medyumu eklenerek, flask 37°C %5 CO_2 inkübatörde yaklaşık 30 dk bekletildi. Flasklar hücre ekimine hazır hale getirilmiş oldu.

3.1.3. İnsan Safen Ven Endotelyal Hücrelerinin Ekimi

Çözüldükten sonra 1 mL büyüme medyumu kullanılarak hazırlanan insan safen ven endotelyal hücre süspansiyonu, her bir flaskta $5x10^5$ hücre olacak şekilde iki adet 25 cm^2-flaska ekildi.

1. Daha önceden Tip I Kollajen çözeltisi ile kaplanmış ve içine 2,5 mL büyüme medyumu eklenmiş flaska 4,5 mL büyüme medyumu eklendi.
2. Yeterli büyüme medyumunu içeren flaska 0,5 mL hücre süspansiyonu da transfer edilerek; bir adet 25 cm^2-flaskta $5x10^5$ hücre olacak şekilde flasklar hazırlanmış oldu.
3. Hücreler invert mikroskopta kontrol edildikten sonra, flasklar 37°C %5 CO_2 inkübatöre kaldırıldı.
4. 24 saat sonra invert mikroskop altında tutundukları gözlenen hücrelerin medyumu değiştirildi.
5. 72 saat sonra yaklaşık %70 konfluense ulaşan hücrelerin medyumu tekrar değiştirildi.
6. Bir haftanın sonunda hücreler %100 konfluense ulaştı ve ilaç uygulamalarının yapılması için gerekli pasajlanmaya hazır hale gelmiş oldu.

3.1.4. İnsan Safen Ven Endotelyal Hücrelerinin Pasajlanması

25 cm^2-flasklarda %100 konfluense ulaşan hücreler, ilaç uygulamalarının yapılacağı 6-well plate'lere pasajlandı. Hücrelerin çoğaltıldığı flasklardan kaldırılmaları için gerekli olan ve -20°C'de muhafaza edilen PromoCell Detach Kit çözeltileri önceden ısıtılmış 37°C su banyosunda bekletilerek, kullanıma hazır hale getirildi.

1. İnkübatörden alınan flaskın içindeki medyum, vakumla aspire edildi.

2. Her bir flaska cm^2 başına 100 µL olacak şekilde HepesBSS solüsyonu eklenerek, 15 sn bekletildikten sonra vakumla aspire edildi.
3. Her bir flaska cm^2 başına 100 µL olacak şekilde Tripsin/EDTA (%0.04/%0.03) solüsyonu eklendi ve 4,5 dk boyunca bekletildi. Bu aşamada, flaskların kenarlarına hafifçe vurularak hücrelerin kaldırılması sağlandı.
4. Hücrelerin flasktan tamamen ayrıldığından emin olmak için invert mikroskop altında kontrol edildi.
5. Her bir flaska cm^2 başına 100 µL olacak şekilde Tripsin Neutralization solüsyonu eklendi.
6. Elde edilen hücre süspansiyonu 220 g'de 3 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant atıldı ve hücre pelleti büyüme medyumunda çözüldü.
8. Hücreler, önceden Tip I Kollajen ile kaplanmış 6-well plate kuyucuklarına yaklaşık %5-6 konfluens ile ekildi.
9. 24 saat sonra invert mikroskop altında tutundukları gözlemem hücrelerin medyumu değiştirildi.

3.2. İnsan Safen Ven Endotelyal Hücrelerine Yapılan Uygulamalar

6-well plate'lere ekilmiş olan hücreler %70-80 konfluense ulaştığında, atorvastatin, pitavastatin ve TNF-α uygulamalarına hazır hale gelmiş oldu. Deney grupları ve uygulanan ilaç dozları ile süreleri Tablo 3-1'de gösterilmektedir. Atorvastatin ve pitavastatin uygun dozlarda hazırlanırken, çözücü olarak DMSO kullanılmıştır.

Tablo 3-1: İnsan safen ven endotelyal hücrelerine uygulanan ilaçlar ve dozları

Grup Adı	Atorvastatin (Atv)	Pitavastatin (Ptv)	TNF-α
Kontrol	-	-	-
DMSO	-	-	-
TNF	-	-	6 sa (10ng/mL)
Atv1	24 sa (10 µM)	-	-
Atv2	24 sa (50 µM)	-	-
Ptv1	-	24 sa (1 µM)	-
Ptv2	-	24 sa (2 µM)	-
Atv1+TNF	24 sa (10 µM)	-	6 sa (10ng/mL)
Atv2+TNF	24 sa (50 µM)	-	6 sa (10ng/mL)
Ptv1+TNF	-	24 sa (1 µM)	6 sa (10ng/mL)
Ptv2+TNF	-	24 sa (2 µM)	6 sa (10ng/mL)

3.3. Laktat Dehidrogenaz Kiti ile Sitotoksisite Ölçümü

İnsan safen ven endotelyal hücre kültüründeki, ölmüş veya hasarlı membrana sahip hücrelerden salınan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarının belirlenmesi ile yapılan sitotoksisite ölçümü için Roche Cytotoxicity Detection Kit (LDH – 11644793001) kullanıldı. Bu şekilde ELISA yöntemi ile LDH tayini yapılana kadar, endotelyal hücreleri üzerine yapılan uygulamalar tamamlandıktan sonra, her bir gruba ait kuyucuktaki üst sıvılar -80°C'de muhafaza edildi. Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu, düşük konsantrasyonlu kontrol grubu olarak kullanılarak, normal koşullardaki LDH salınımı belirlendi. Yüksek konsantrasyonlu kontrol grubu olarak ise, %2 Triton X-100 uygulaması yapılan hücreler kullanıldı.

1. Her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde, her bir örnek 96-well plate'lere yüklendi.

2. Her bir örneğin üzerine, 100 µL reaksiyon karışımı eklendi ve plate, oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk inkübe edildi.

3. 492 nm dalga boyunda her bir kuyucuktaki örneğin abzorbans ölçümü yapılarak, sitotoksisite ölçümü yapılmış oldu. Her bir plate için ölçümler iki kez tekrarlandı.

3.4. Kantitatif Gerçek Zamanlı Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR)

Ön ilaç uygulamaları yapılmış insan safen ven endotelyal hücreleri inflamasyon modelinde, MMP-2 ve MMP-9 ekspresyonlarının miktarını tayin edebilmek için qRT-PCR metodu uygulanmıştır. RNA izolasyonu, her bir gruptan elde edilen örnekler kullanılarak, ThermoFisher PureLink RNA Mini Kit (12183018A) protokolüne göre yapıldı. İzole edilen RNA'ların saflık ve miktarının spektrofotometrik tayini, NanoDrop One UV-Vis Spectrophotometer ile yapıldı. Yeterli saflıkta ve miktarda izole edilmiş olan RNA örnekleri, RT-PCR metodu ile ThermoFisher High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (4387406) kullanılarak; 37°C'de 60 dk'lık inkübasyonun ardından, 95°C'de 5 dk boyunca bekletilip cDNA'ya dönüştürüldü ve ekspresyon tayini yapılana kadar -20°C'de saklandı.

Hedef proteinleri kodlayan genlere ait mRNA miktarlarındaki değişimlerin saptanması için qRT-PCR metodu kullanıldı. MMP-2 ve MMP-9 hedef genlerinin ekspresyon seviyeleri, aktin beta (ACTB) housekeeping gen ile karşılaştırılarak belirlendi.

qRT-PCR uygulamasında kullanılan ThermoFisher TaqMan probları aşağıdaki gibidir:

- TaqMan Gene Expression Assay Human MMP2 Hs01548727_m1 – 4331182
- TaqMan Gene Expression Assay Human MMP9 Hs00957562_m1 – 4331182
- TaqMan Gene Expression Assay Human ACTB Hs01060665_g1 – 4331182

Öncelikle elde edilen cDNA'lar aynı konsantrasyona sahip olacak şekilde dH2O ile dilüe edildi. Her bir 96-well plate kuyucuğuna, 5 µL ThermoFisher TaqMan Gene Expression Master Mix (4370048), 0,5 µL assay mix, 4,5 µL cDNA olacak şekilde toplam 10 µL qRT-PCR karışımı eklenmiştir. qPCR döngüsünün ilk aşaması olan başlangıç denatürasyonu 95°C'de 10 dk yapıldı. Ardından 35 döngü halinde denatürasyon, primer bağlanması ve uzama aşamaları gerçekleştirildi. Bunun için döngü birbiri ardına 95°C'de 15 sn ve 60°C'de 60 sn olacak şekilde ayarlandı. Döngü tamamlandıktan sonra son uzama aşaması 60°C'de 5 dk sürdü. Böylece hedef genler Roche LightCycler 480 Instrument II cihazı kullanılarak çoğaltılmış oldu.

3.5. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi, Graphpad Prism 8 yazılımı kullanılarak yapılmıştır ve $p<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir. Tanımlayıcı istatistiklerde; standart sapma, ortalama, medyan değerleri kullanılmıştır. Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U test kullanılarak nicel verilerin analizi yapıldı. Kolmogorov Simirnov test ile de değişkenlerin dağılımı ölçüldü.

4. BULGULAR

Çalışmamızda, tip I kollajen kaplı kuyucuklarda kültüre edilen insan safen ven endotelyal hücrelerine atorvastatin (Atv) ön uygulaması 24 saat boyunca 10 ve 50 μM dozlarda; pitavastatin (Ptv) ön uygulaması ise 24 saat boyunca 1 ve 2 μM dozlarda yapılmıştır. Ardından 6 saat boyunca 10 ng/mL TNF-α uygulaması yapılarak inflamatuvar ortam oluşturulmuştur. Her bir gruptan alınan üst sıvılar kullanılarak LDH sitotoksisite tayini yapılmıştır. Son olarak, ilaçların anti-inflamatuvar etkilerinin tespit edilebilmesi için, qRT-PCR metodu kullanılarak MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler gözlemlenmiştir.

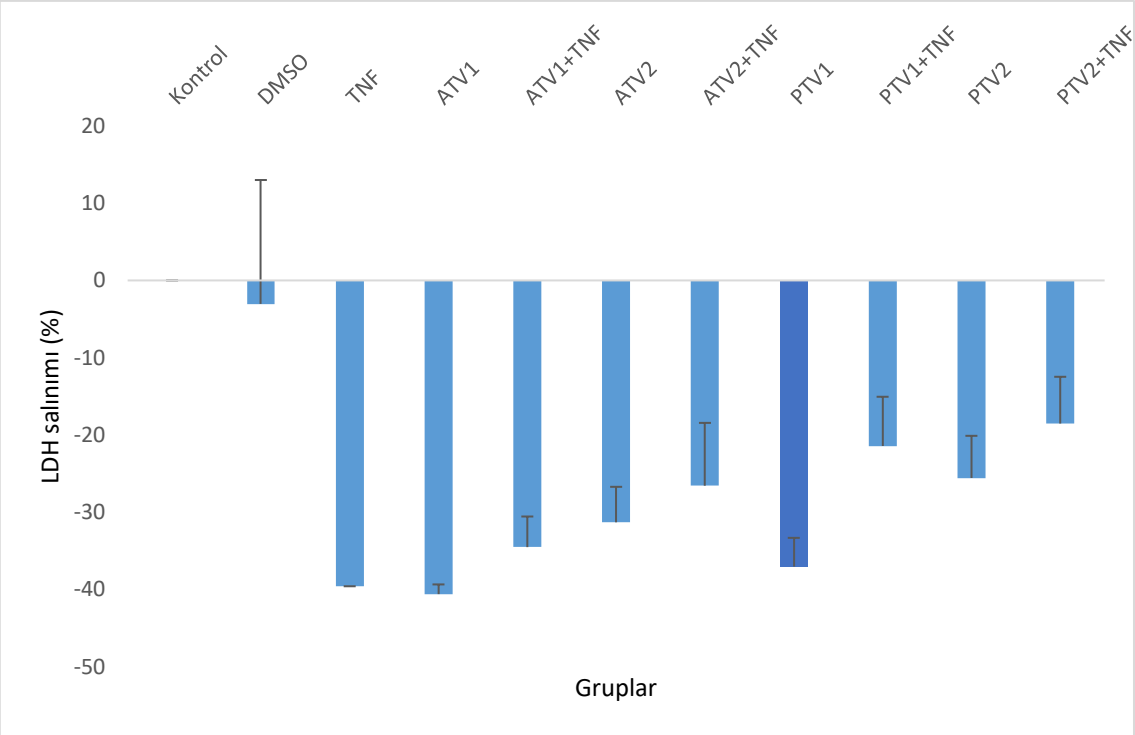
4.1. LDH Sitotoksisite Ölçümü

Hiçbir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile uygulama yapılan her bir gruptaki sitotoksisite ölçümü, hücrelerde salınan LDH miktarının tayini ile yapıldı. Elde edilen verilen Tablo 4-1 ve Şekil 4-1'de gösterilmektedir. İlaçların çözücüsü olan DMSO'nun tek başına uygulandığı grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, LDH düzeyleri arasında istatistiksel olarak bir fark olmadığı gözlemlendi ($p>0,05$). Yalnızca TNF-α uygulanan TNF grubu ile ilaç uygulaması yapılan gruplar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise, LDH düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p<0,05$).

Tablo 4-1: İnsan safen ven endotelyal hücre gruplarından salınan LDH değerleri

	LDH			p
	Ort.±s.s.	Medyan	Min-Mak	
Kontrol	0,000±0,000	0,000	0,0000 – 0,0000	
DMSO	-5,005±16,037	-3,033	-26,578 – 13,640	
TNF	-39,385±4,032	-39,624	-44,590 – -34,061	
Atv1	-40,437±1,254	-40,608	-42,623 – -38,270	
Atv1+TNF	-34,690±3,697	-34,528	-41,148 – -26,111	
Atv2	-31,320±4,593	-31,311	-38,737 – -24,240	***0,000***
Atv2+TNF	-21,427±8,136	-26,578	-27,514 – -10,164	
Ptv1	-35,374±3,716	-37,040	-38,689 – -28,917	
Ptv1+TNF	-23,153±6,372	-21,431	-30,787 – -14,590	
Ptv2	-26,763±5,458	-25,575	-34,996 – -20,031	
Ptv2+TNF	-18,400±6,053	-18,525	-24,918 – -7,872	

Kruskal-Wallis (Mann-Whitney U test). Atv, Atorvastatin; Ptv, Pitavastatin; TNF, TNF-α.



Şekil 4-1: İnsan safen ven endotelyal hücre gruplarındaki LDH salınım yüzdeleri. (Atv, Atorvastatin; Ptv, Pitavastatin; TNF, TNF-α (10 ng/mL); Atv1: 10 µM; Atv2: 50 µm; Ptv1: 1 µM; Ptv2: 2 µM).

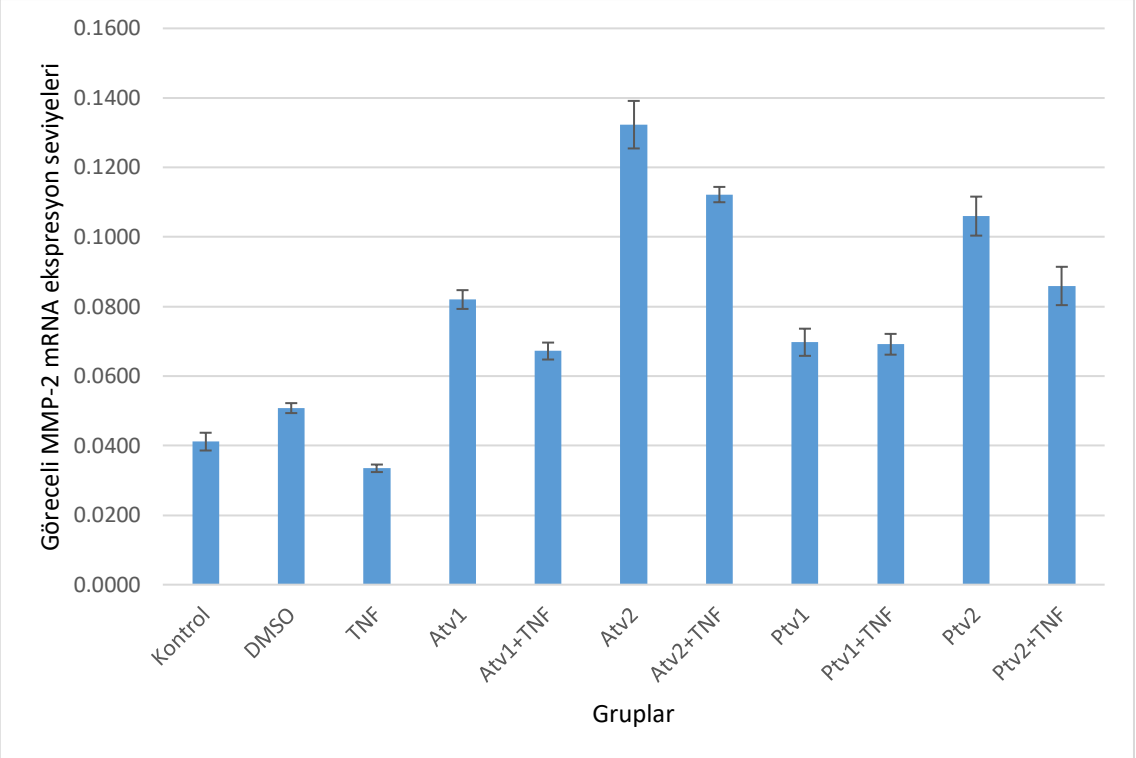
4.2. Göreceli MMP-2 ve MMP-9 mRNA Ekspresyon Seviyeleri

Yapılan uygulamaların ardından qRT-PCR yöntemi kullanılarak göreceli MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon seviyeleri belirlendi. Hiçbir hücre grubunda MMP-9 mRNA ekspresyonu gözlemlenmedi. İstatistiksel analiz sonucunda elde edilen göreceli MMP-2 mRNA ekspresyonu seviyeleri Tablo 4-2 ve Şekil 4-2'de gösterilmektedir.

Tablo 4-2: İnsan safen ven endotelyal hücrelerinde eksprese edilen göreceli MMP-2 mRNA seviyeleri

	MMP-2			p
	Ort.±s.s.	Medyan	Min-Mak	
Kontrol	0,0411±0,072	0,0386	0,0340 – 0,0529	
DMSO	0,0508±0,0041	0,0518	0,0454 – 0,0563	
TNF	0,0335±0,0031	0,0339	0,0294 – 0,0377	
Atv1	0,0820±0,0076	0,0816	0,0684 – 0,0921	
Atv1+TNF	0,0672±0,0064	0,0684	0,0563 – 0,0748	
Atv2	0,1323±0,0181	0,1276	0,1127 – 0,1550	***0,000***
Atv2+TNF	0,1122±0,0058	0,1088	0,1066 – 0,1207	
Ptv1	0,0697±0,0103	0,0733	0,0529 – 0,0786	
Ptv1+TNF	0,0691±0,0079	0,0743	0,0579 – 0,0759	
Ptv2	0,1060±0,0148	0,1111	0,0836 – 0,1241	
Ptv2+TNF	0,0859±0,0146	0,0786	0,0718 – 0,1051	

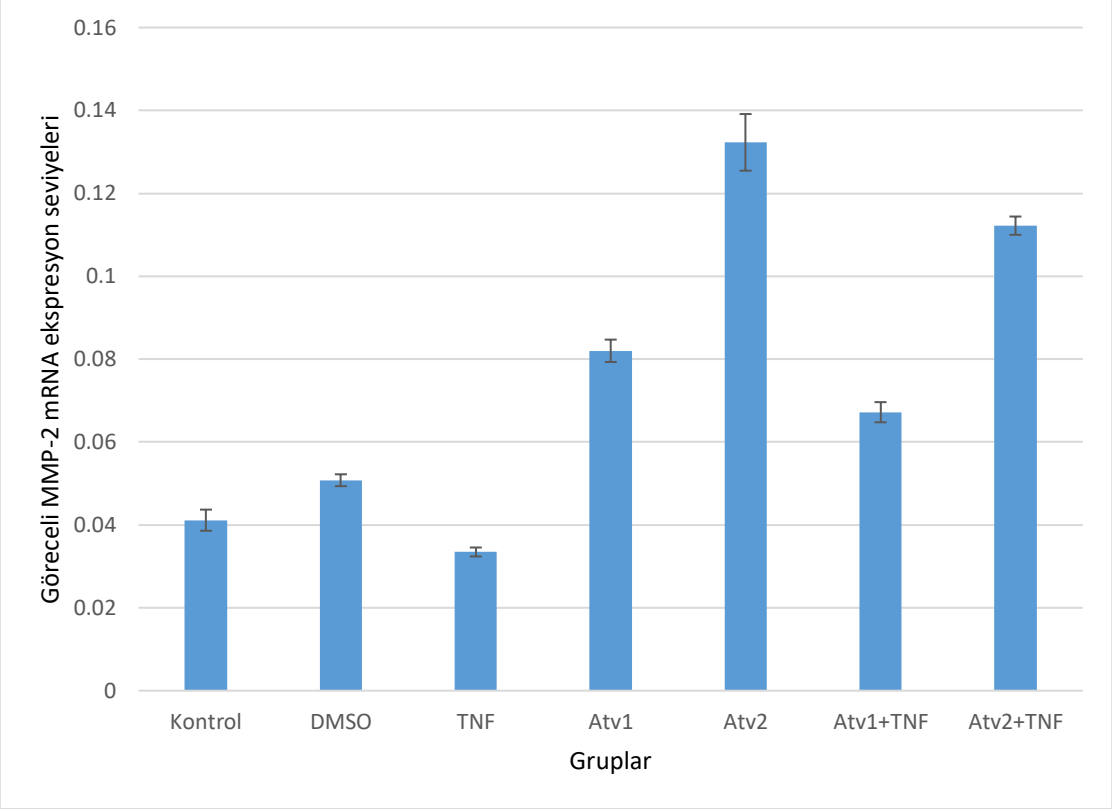
Kruskal-Wallis (Mann-Whitney U test)



Şekil 4-2: qRT-PCR yöntemi ile belirlenen insan safen ven endotelyal hücreleri göreceli MMP-2 mRNA ekspresyon seviyeleri. (Atv, Atorvastatin; Ptv, Pitavastatin; TNF, TNF-α (10 ng/mL); Atv1: 10 µM; Atv2: 50 µm; Ptv1: 1 µM; Ptv2: 2 µM).

Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu ile DMSO grubu kıyaslandığında, MMP-2 mRNA seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0,0952). Yalnızca TNF-α uygulaması yapılan TNF hücrelerindeki MMP-2 mRNA ekspresyon seviyelerinin, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu gözlemlendi (p=0,0093). Her iki ilacın her iki dozu ile ön uygulama yapıldıktan sonra, TNF-α ile indüklenen gruplar, TNF grubu ile kıyaslandığında; ilaç uygulamasının MMP-2 mRNA ekspresyon seviyelerini istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı belirlendi (p=0,0003).

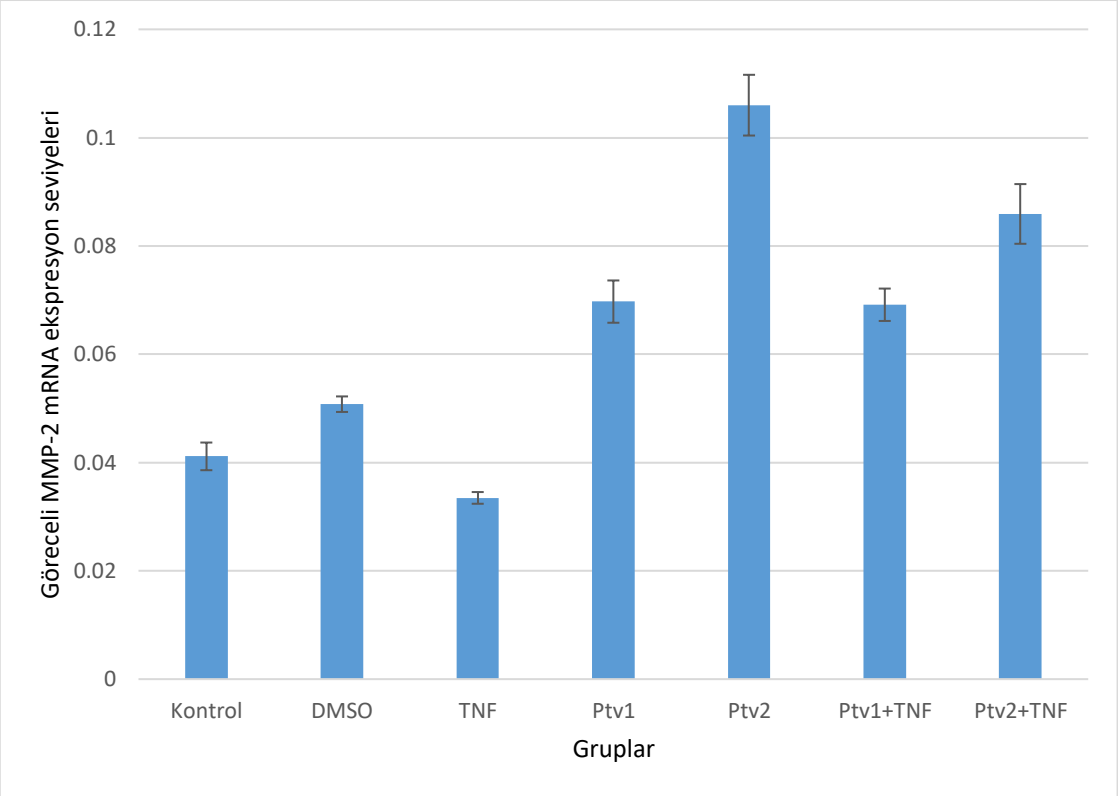
Atv1 ve Atv1+TNF (p=0,0023) ile Atv2 ve Atv2+TNF (p=0,0204) gruplarında tespit edilen MMP-2 mRNA ekspresyon seviyeleri kendi içinde karşılaştırıldığında, atorvastatinin ardından TNF-α uygulaması, ekspresyon düzeyini anlamlı olarak düşürdü (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: qRT-PCR yöntemi ile belirlenen, atorvastatin uygulaması yapılan insan safen ven endotelyal hücreleri göreceli MMP-2 mRNA ekspresyon seviyeleri. (Atv, Atorvastatin; TNF, TNF-α (10 ng/mL); Atv1: 10 µM; Atv2: 50 µm;).

2 µM pitavastatin ön uygulamasının ardından TNF-α ile indüklenen hücre grubundaki MMP-2 mRNA ekspresyon düzeyi, yalnızca 2 µM pitavastatin uygulanan Ptv2 grubundan elde edilen verilere göre anlamlı olarak daha düşüktü (p=0,0169). Ancak; 1 µM pitavastatin uygulanan Ptv1 grubu ile Ptv1+TNF grubundaki MMP-2 mRNA ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (p=0,9178) (Şekil 4-4).

Bunun yanında; 50 µM atorvastatin ön uygulamasının ardından TNF-α ile indüklenen hücrelerde eksprese edilen MMP-2 mRNA düzeyleri, sırasıyla Atv1+TNF, Ptv1+TNF ve PTV2+TNF grupları ile karşılaştırıldığında; Atv2+TNF grubundaki MMP-2 mRNA ekspresyon seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olduğu gözlemlendi (p=0,0006).



Şekil 4-4: qRT-PCR yöntemi ile belirlenen, pitavastatin uygulaması yapılan insan safen ven endotelyal hücreleri göreceli MMP-2 mRNA ekspresyon seviyeleri. (Ptv, Pitavastatin; TNF, TNF-α (10 ng/mL); Ptv1: 1 µM; Ptv2: 2 µM).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, insan safen ven endotelyal hücrelerini TNF-α ile indükleyerek, aterosklerozun inflamasyon basamağını oluşturduğumuz hücre kültürü modelinde, koroner arter bypass greft operasyonu sonrasında kolesterol düşürücü etkilerinden yararlanılan atorvastatin ve pitavastatinin anti-inflamatuvar etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu hedefle, pro-inflamatuvar bir hastalık olan aterosklerozda ekspresyonları ve aktivitesinde değişiklik gözlenen MMP-2 ve MMP-9 proteazlarının ekspresyon seviyelerinin, her iki ilacın farklı dozlarının uygulanması ile nasıl değişiklik gösterdiğini araştırdık. Bu amaçla, kültüre edilen insan safen ven endotelyal hücrelerine 10 μM ve 50 μM atorvastatin ile 1 μM ve 2 μM pitavastatin ön uygulamaları yapıldıktan sonra, TNF-α ile inflamasyon tetiklendi. İlaçların sitotoksisitesini belirlemek amacı ile LDH seviyeleri ölçüldü. qRT-PCR metodu ile de göreceli MMP-2 ve MMP-9 mRNA ekspresyon seviyeleri tespit edildi.

Vasküler endotelyal patoloji; ateroskleroz, tümor anyijogenezi, metastaz ve kronik allogreft rejeksiyonu gibi birçok hastalığın merkezinde yer almaktadır. Bu nedenle, vasküler endotelyum araştırmalarında oluşturulan *in vitro* modellerde uygun endotelyal hücrelerin kullanılması önemlidir. Umbilikal venin kolay bir şekilde elde edilmesi, bu dokunun sıklıkla primer endotelyal hücre kaynağı olarak kullanılmasına sebep olur; ancak safen ven endotelyal hücreler ile karşılaştırıldığında, iki hücre tipi arasında; sitokin ve ox-LDL stimülasyonuna verilen yanıt ve antijen sunumu gibi özellikler açısından önemli farklar olduğu belirtilmiştir. İnsan safen ven endotelyal hücreleri, primer arteryal endotelyal hücrelere işlevsel olarak daha benzerdir ve yetişkin vasküler endotelyal patofizyolojiyi çalışmak için daha iyi bir model oluşturabilir[158]. Bunun yanında, birçok adezyon molekülünün ekspresyon seviyesi de iki hücre tipi arasında farklılık göstermektedir[159]. İnsan umbilikal ven endotelyal hücrelerinde adezyon moleküllerinin yukarı-regülasyonu, insan safen ven endotelyal hücrelerindeki inflamatuvar sitokinlerden dört kat daha düşüktür. Buna ek olarak, insan umbilikal ven endotelyal hücrelerinde bazı adezyon moleküllerinin ekspresyonunu tetiklemek için HSaVEC ve arteryal endotelyal hücrelere göre 10 kat daha yüksek konsantrasyonda ox-LDL gerekmektedir. Bunlar göz önünde bulundurulduğunda; insan safen ven endotelyal hücrelerinin hem ateroskleroz hem de immün-endotelyal etkileşimleri içeren patolojileri incelemek için daha iyi bir model oluşturacağı anlaşılmaktadır.

Ateroskleroz; çok faktörlü patolojiye sahip ve inflamatuvar, fibroproliferatif ve anjiyojenik yanıtları da barındıran karmaşık bir süreçtir. İnflamatuvar hücrelerin, aterosklerotik dokularda ve hastalığın başlangıcından akut vasküler bir olaya dönüşmesine kadar geçen süre boyunca koroner arter hastalığına sahip bireylerin plazmalarında bulunmasına rağmen; aralarındaki neden-sonuç ilişkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Çeşitli inflamatuvar belirteçler ile ateroskleroz arasındaki ilişki, inflamasyonun aterosklerozun primer göstergesi olacağını tam olarak gösteremez. Ateroskleroz ve buna bağlı meydana gelen rahatsızlıkların, artan inflamatuvar biyobelirteçler ile ilişkili olduğunu gösteren kanıtlar olsa da; inflamasyonu azaltarak, kardiyovasküler olayların önüne geçilebileceğinin ispatı yoktur. Zamanla, aterosklerozun inflamatuvar süreç gibi birçok ilişkinin de dahil olduğu karmaşık bir hastalık olduğu anlaşılmıştır. Aterogenezin tanımlanma sürecinin en büyük zorluğu; aterosklerozun belirli bir evresinin ve bu belirli evrede hangi hedefin kullanılabileceğinin tanımlanması konularıdır[87].

Kronik inflamasyonun plak gelişimindeki önemli rolü göz önünde bulundurulduğunda; aterosklerotik vasküler hastalık riskini düşürmek için LDL seviyelerini azaltmaya yönelik yapılan tedavide, inflamasyonun terapötik hedef olması tamamlayıcı bir yöntem olarak kabul edilmektedir[8]. İdeal bir anti-inflamatuvar tedavi, Treg'ler gibi anti-inflamatuvar hücreleri stimüle eder ve inflamatuvar yolakları inhibe eder[160]. Yapılan CANTOS çalışması bu konuda önemli bir atılım olmuştur. 10,000 miyokard enfarktüsü geçirmiş hastanın dahil edildiği çalışmada, direkt olarak proinflamatuvar sitokin IL-1β inhibisyonunu hedefleyen monoklonal antikor kanakinumabın kardiyovasküler olaylarda azalma sağlayıp sağlayamayacağı araştırılmıştır[161]. Çalışmaya dahil edilen bireylerin %90'ından fazlası eş zamanlı statin tedavisi görmüştür. Hayvan çalışmaları ve klinik öncesi çalışmalarda; IL-1β'nın; ICAM-1, E-selektin ve VCAM-1 gibi lezyonlarda lökosit birikimine katkıda bulunan lökosit adezyon proteinlerinin ekspresyonunu tetikleyerek aterosklerotik sürecin inflamatuvar basamağını başlattığı gösterilmiştir[162,163]. CANTOS çalışmasında da, 3 ayda bir 150 mg kanainumab verilen hastalarda; ölümcül olmayan miyokard enfarktüsü, ölümcül olmayan inme ve kardiyovasküler ölüm oranlarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Bu etkinin de, plazma LDL veya HDL seviyelerindeki azalma ile değil, CRP seviyelerindeki anlamlı düşüş ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Yani yapılan çalışmada, lipidlerden bağımsız olarak inflamasyon blokajının faydalı etkisi gösterilerek,

kardiyovasküler hastalıkta direkt olarak inflamasyonu hedefleyen bir tedavi yönteminin önemi aydınlatılmıştır.

Akut miyokard enfarktüsü başlıca, aterosklerotik plak kırılması veya erozyonu ile koroner arter oklüzyonunun bir komplikasyonudur. Mevcut kan akışının kesilmesi iskemik kalpte kardiyak myositlerin ani ölümüne sebep olarak; akut inflamatuvar yanıtı tetikler. Buna bağlı olarak; ekstraselüler matriks degredaasyonu ve ölü kardiyomyositler ile debrislerinin temizlenmesi ile kardiyak yeniden biçimlendirilme meydana gelir. Yani; akut inflamatuvar yanıtın tercih edilen neticesi, yaraya ve organ işlevinin kaybolmasına sebep olabilecek kalıcı inflamasyon değil; başarılı bir rezolüsyon evresi ve doku hasarının tamiridir. Bu sebeple; aterosklerotik hastalarda miyokard enfarktüsü geçirme durumunda anti-inflamatuvar tedavi stratejisinin zarar verici etkileri olabilir. Aterosklerozun ve komplikasyonlarının önlenmesinde inflamasyonu düşürmenin etkili olabileceği genellikle hayvan modellerinde gösterilmiş olsa da; bu durum insanlarda da kanıtlanmalıdır[3].

Statin grubu ilaçların, pleiotropik etki olarak da adlandırılan anti-inflamatuvar etki gösterdikleri bilinmektedir. Statinlerin, proinflamatuvar genleri kontrol eden bir transkripsiyon faktörü olan NF-κB'nin aktivitesini ve COX-2 ekspresyonunu düşürebileceği ateroskleroz modeli oluşturulan hayvan çalışmalarında belirtilmiştir[164]. Böyle bir etkinin klinik olarak geçerli olabileceğini gösteren ilk çalışma 1990'ların sonunda Cholesterol and Recurrent Event trial (CARE) olmuştur. Bu çalışmaya göre; total kolesterol, HDL-C ve LDL-C değerlerinden bağımsız olarak; pravastatin kullanan hastalarda yinelenen MI geçirme oranındaki düşüşün hsCRP seviyeleri yüksek olan hastalarda anlamlı derecede daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır[165]. Son yapılan çalışmalarda da; statin tedavisi sonucunda ulaşılan CRP değerlerinin, yine aynı ilaçların kullanımı ile gerçekleşen LDL-C seviyesindeki azalma ile aynı öneme sahip olduğu belirtilmiştir[166,167]. Nissen et al.[167] tarafından yapılan bir çalışmada, intravasküler sonografi yöntemi ile; CRP düzeyinin, ateroskleroz gelişimi ile anlamlı derecede ilişkili olduğu saptanmıştır. Ancak; bu sınıftaki ilaçların başlıca etkisi LDL-kolesterol düşürücü olmalarıdır. Statinlerin proinflamatuvar göstergeler olan serbest kolesterol ve ox-LDL seviyelerini azaltması ise, CRP ve diğer inflamatuvar belirteçlerdeki düşüşün temel esası olabileceği düşünülmektedir[87].

Biz de çalışmamızda, koroner bypass cerrahisi sonrası rutin tedavide yaygın olarak reçetelenen atorvastatin ve pitavastatinin anti-inflamatuvar etkilerini

gözlemlemeyi ve karşılaştırmayı amaçladık. Öncelikle LDH sitotoksisite testi yapılarak, her iki ilacın da sitotoksisiteyi azalttığı ve hem uygulanan ilaç dozlarının hem de inflamasyonu tetiklediği bilinen 10 ng/mL TNF-α uygulamasının toksik etkilerinin olmadığı belirlendi. TNF-α'nın; diğer sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasını kontrol ederek ve endotelyal hücrelerin inflamasyon bölgesine aktive edilmiş lökositlerin göçünü sağlayan adezyon molekülleri ile reaktif oksijen türlerini eksprese etmesine yol açarak inflamasyonu düzenlediği bilinmektedir[168]. İnflamasyon sırasında; alarminler olarak da bilinen hasar-ilişkili moleküler paternler hasarlı dokudan salınarak, başlangıç sinyallerinden sorumlu olurlar. HMGB1, IL-1β ve IL-33 gibi bu pro-inflamatuvar sitokinlerin düzenlenmesi ise enzimatik süreç ile gerçekleşir. İnflamasyonun çözümlenebilmesi için ise, farklı tür kemokinler ve sitokinlerin varlığı ile sinyal yolağının pro-inflamatuvardan anti-inflamatuvar evreye geçmesi gerekir. Kemokinlerin proteolitik aktiviteye maruz kalması, onları reseptör antagonistlerine dönüştürebilir ve bu da MMP'lerin inflamasyonun çözümlenmesine nasıl katkı sağladığını açıklar niteliktedir[169]. Akut inflamasyonun çözümlenme evresinde görev alan farklı MMP alt türleri tanımlanmıştır ve bu MMP'lerin inhibisyonu sonucunda, kronik inflamasyona bağlı doku hasarının meydana gelebileceği bildirilmiştir[170].

Aterosklerotik süreçte oluşan gelişmiş plağın uç bölgelerinde, makrofajlar ve T lenfositler bulunur. Makrofajlar, ekstraselüler matriks lizizinde görev alan proteinazları salgılar[27]. Bunun yanında, aterosklerotik lezyonların bazı türleri zamanla akut trombotik vasküler hastalığa yol açacak olan özellikler geliştirir. Bu tür hassas plakların özellikleri arasında; nekrotik ya da lipid çekirdek olarak adlandırılan ve intimada geniş bir bölgeye yayılmış olan nekroz, incelmiş fibröz başlık ve inflamasyon durumundaki artış bulunmaktadır. Bu özellikler, normalde bariyer görevi gören fibröz başlığın parçalanmasına sebep olarak; akut lumenal tromboza yol açabilir. Plak nekrozu; kusurlu eferositoz veya apoptotik hücrelerin temizlenmesi ile bu hücrelerin primer nekrozu sonucunda gerçekleşir[171]. Fibröz başlığın incelmesi ise, hem intimal düz kas hücreleri tarafından hasarlı kolajen sentezi hem de inflamatuvar hücrelerden salınan matriks metalloproteinazların degredasyonu sonucunda meydana gelir4. İnsanlarda, IFN-γ üretimini stimüle eden IL-18 plazma seviyelerinin koroner arter hastalarında artmış olduğu gözlemlenmiştir[172]. IFN-γ; vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebilir ve MMP ekspresyonunu artırarak bu hücrelerdeki kolajen üretimini azaltabilir. Bu şekilde de fibröz başlığın incelmesine katkıda bulunur[10].

Statinler, dokular arasındaki kollajenazlar (MMP-1, MMP-13), jelatinazlar (MMP-2, MMP-9) ve MMP-3 gibi birçok MMP'nin, makrofajlardaki ekspresyonunu ve işlevini azaltırlar[173]. İnsan ateromunda, tavşanlarda ve *in vitro* çalışmalarda statinlerin; makrofaj ve düz kas hücrelerindeki MMP-1, -2, -3 ve -9 ekspresyon ve salınımını azalttığı gözlemlenmiştir[174]. Bir başka çalışmada, karotis endarterektomisi ardından pravastatin tedavisi gören hastalarda, aterosklerotik plakardaki lipid miktarında azalma ve hem inflamasyon hem de MMP aktivitesinde düşüş olduğu bildirilmiştir[175]. İnsan umblikal ven endotelyal hücreleri ile yapılan bir çalışmada; simvastatin ve atorvastatinin hem endotelyal proanjiyojenik potansiyeli, hem de COX-2 ve MMP-9 ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir[176].

Ölümcül tromboza sebep olan aterosklerotik plaklar ile yapılan çalışmalarda, yüksek riske sahip hassas plaklara spesifik özelliklerinin ve bu plakların lökositler, plateletler ve endotelyal hücreler ile olan ilişkilerinin aydınlatılması hedeflenmektedir. Hassas plaklardaki inflamatuvar hücreler aktive olduktan sonra, ekstraselüler matriksi degrade eden enzimleri salgılayarak fibröz başlığın incelmesine ve tromboz oluşumuna sebep olur[168]. Yani, MMP'lerin hassas plaklar ile ilişkili anjiyogenezin ilerlemesinde rol oynadığı bilinmektedir[174]. Ekstraselüler matriks yıkımı ve fibröz başlığın incelmesi ile birlikte; plak hasarına yol açarak emboli oluşumunu tetikleyebilirler. Bunun yanında; MMP-2, -9 ve -14 vasküler düz kas hücre göçü ile çoğalmasına sebep olarak; fibröz başlık kalınlığının artmasına ve plak stabilitesinin korunmasına yardımcı olabilir. Buna bağlı olarak, MMP-2 ekspresyonundaki artış; ileri ateroskleroz evresinde emboli oluşumunun önüne geçilmesini de sağlayabilir. Yani MMP'ler; plak yıkımını hem tetikleyici hem de önleyici özelliklere sahip olabilir. Hangi davranışın bölgede dominant olacağı ise; eksprese edilen MMP alt türüne, enzim aktivitesinin düzeyine ve plağın hangi evrede olduğuna bağlıdır[177].

Biz de çalışmamızda; literatüre göre[178] inflamasyonu tetiklediği bilinen TNF-α uygulaması sonucunda, insan safen ven endotelyal hücrelerindeki göreceli MMP-2 mRNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını gözlemledik. Bunun yanında, 10 μM ve 50 μM atorvastatin ile 1 μM ve 2 μM pitavastatin uygulamasının ardından TNF-α ile uyarılan gruplarda ise; MMP-2 mRNA ekspresyon seviyesi, istatistiksel açıdan anlamlı olarak artmıştır.

Eksprese edildikleri şartlara bağlı olarak; MMP'ler proteolitik aktivite sonucunda sitokinler ile kemokinlerin biyolojik işlevlerini aktive, inaktive veya antagonize

edebilirler. Örneğin; MMP-2, -3 ve -9, inflamatuvar yanıtta önemli bir aracı olan IL-1β'yı aktive edebileceği gibi, bu enzimlerin proteolitik aktiviteleri sayesinde IL-1β'nın aktif formunu degrade ettiğinii gösteren çalışmalar da mevcuttur[179]. MMP-2'nin; inflamatuvar hücrelerin dokudaki inflamasyon bölgesine çağrılmasında önemli rol oynayan kemokinlerden CCL-8'in potent inhibitörü olduğu bilinmektedir[180]. MMP-2 aynı zamanda, CC-kemokin ligandı 7'yi (MCP-3) keserek, hala reseptöre bağlanabilen ancak antagonist görevi görev CC-kemokin antagonistine dönüşmesine sebep olarak; inflamatuvar yanıtı inhibe eder128. MMP-2'nin hepatik iskemi-reperfüzyon hasarındaki rolünün incelendiği bir çalışmada, MMP-2-eksik farelerin karaciğerlerinde aşırı derecede lökosit infiltrasyonu olduğu ve pro-inflamatuvar sitokin seviyelerinin yükseldiği gözlemlenmiştir[181]. Çalışmamızda, inflamatuvar yanıt modelinin oluşturulduğu gruplarda, her iki ilaç da artan dozlarda MMP-2 mRNA ekspresyon seviyelerini artırmıştır. Özellikle, 50 μM atorvastatin uygulaması, 10 μM atorvastatin ile 1 μM ve 2 μM pitavastatin uygulamaları yapılan gruplar ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde MMP-2 mRNA ekspresyon seviyesini artırmıştır. Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, artan MMP-2 ekspresyonu ve aktivitesi; inflamatuvar yanıtın çözümlenmesi ile bağdaştırılabilir ve inflamasyonu düzenleyici bir etki olarak görülebilir. Bu şekilde de çalışmamızda inflamatuvar yanıt oluşturulan insan safen ven endotelyal hücrelerinde, 50 μM atorvastatin uygulamasının anti-inflamatuvar etkisinin daha yüksek olduğu öne sürülebilir. Lin et al[182] tarafından endotelyal progenitör hücreler ile yapılan bir çalışmada, farklı statinlerin vasküler pleiotropik koruyucu etkilerinin de farklı olacağı belirtilmiştir. Atorvastatin ve pitavastatinin karşılaştırıldığı çalışmada, her iki ilaç da plazma lipid seviyelerini benzer oranda düşürürken; ilaçların pleiotropik etkileri göz önünde bulundurulduğunda kesin bir karşılaştırma yapılamamıştır.

Bunlara ek olarak, çalışmamıza dahil edilen hiçbir grupta, MMP-9 mRNA ekspresyonu gözlemlenememiştir. Yapılan bazı çalışmalarda[183,184], plateletlerde MMP-9 ekspresyonu görülmesine rağmen; bazılarında ise bu çalışmada elde edilen verileri destekleyecek şekilde; MMP-9 ekspresyonu gözlemlenememiştir[185-187]. Bunun sebebi olarak da aktive olan plateletlerin plazma kaynaklı MMP-9'a bağlandığı ve belirlenen MMP-9 düzeylerinin de bu sayede tespit edildiği öne sürülmektedir[188].

Yapılan bir çalışmada, artan MMP-2 aktivitesinin düz kas hücrelerinin varlığı ve fibröz fenotipi ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve MMP-2 ekspresyonunun stabil lezyon fenotipinin bir belirteci olabileceği belirtilmiştir[189]. MMP-2 aktivitesinin, iskemik

inmenin ileri evresinde arttığı ve iyileşme semptomları gösteren hastalarda bazal MMP-2 düzeyinin yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Buna bağlı olarak MMP-2 artışının, iskemik inmenin akut fazında, daha iyi klinik sonuçlar ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir[190].

Sonuç olarak; TNF-α ile aterosklerozun inflamasyon basamağı oluşturulan çalışmamızda insan safen ven endotelyal hücrelerine yapılan atorvastatin ve pitavastatin uygulamalarının MMP-2 mRNA ekspresyon seviyelerini artırdığı gözlemlenmiştir. İnflamasyonun başlangıç evresinde MMP-2'nin pro-inflamatuvar etkiye sahip olduğu bilindiğinden, statinlerin bu evredeki anti-inflamatuvar etkileri MMP-2 mRNA ekspresyon seviyesi dışında bir parametre tarafından belirlenebilir. Bunun yanında, hem aterosklerozun ileri seviyelerindeki hem de inflamasyonun çözümlenme evresindeki MMP-2 aktivitesinin koruyucu rolü göz önünde bulundurulduğunda ise; elde ettiğimiz verilere göre atorvastatinin, koroner bypass cerrahisinde kullanılan safen vende gözlenen restenozun geciktirilmesi/önlenmesi anlamında daha etkili bir tedavi sunabileceği düşünülebilir. Daha net sonuçlar elde edebilmek amacı ile sonraki çalışmalarda özellikle aterosklerotik yolakta görev alan pro-inflamatuvar ve anti-inflamatuvar moleküllerin araştırılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Heidenreich PA, Trogdon JG, Khavjou OA, et al. Forecasting the future of cardiovascular disease in the United States: a policy statement from the American Heart Association. Circulation. 2011;123(8):933-944.
2. Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature. 2000;407(6801):233-241.
3. Taleb S. Inflammation in atherosclerosis. Arch Cardiovasc Dis. 2016;109(12):708-715.
4. Tabas I, Garcia-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. J Cell Biol. 2015;209(1):13-22.
5. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. N Engl J Med. 2005;352(16):1685-1695.
6. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999;340(2):115-126.
7. Rahimi Z. ACE insertion/deletion (I/D) polymorphism and diabetic nephropathy. J Nephropathol. 2012;1(3):143-151.
8. Kasikara C, Doran AC, Cai B, Tabas I. The role of non-resolving inflammation in atherosclerosis. J Clin Invest. 2018;128(7):2713-2723.
9. Gistera A, Hansson GK. The immunology of atherosclerosis. Nat Rev Nephrol. 2017;13(6):368-380.
10. Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol Rev. 2006;86(2):515-581.
11. Weber C, Zernecke A, Libby P. The multifaceted contributions of leukocyte subsets to atherosclerosis: lessons from mouse models. Nat Rev Immunol. 2008;8(10):802-815.
12. Hennekens CH, Gaziano JM. Antioxidants and heart disease: epidemiology and clinical evidence. Clin Cardiol. 1993;16(4 Suppl 1):I10-13; discussion I13-15.
13. Baradaran A. Lipoprotein(a), type 2 diabetes and nephropathy; the mystery continues. J Nephropathol. 2012;1(3):126-129.
14. Tavafi M. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. J Renal Inj Prev. 2013;2(2):59-62.
15. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2012;32(9):2045-2051.

16. Geovanini GR, Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. Clin Sci (Lond). 2018;132(12):1243-1252.
17. Skalen K, Gustafsson M, Rydberg EK, et al. Subendothelial retention of atherogenic lipoproteins in early atherosclerosis. Nature. 2002;417(6890):750-754.
18. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. Curr Opin Lipidol. 1998;9(5):471-474.
19. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. Nature. 2011;473(7347):317-325.
20. Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. Nat Immunol. 2011;12(3):204-212.
21. Stemme S, Faber B, Holm J, Wiklund O, Witztum JL, Hansson GK. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(9):3893-3897.
22. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, et al. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. Atherosclerosis. 1999;145(1):33-43.
23. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. Nature. 2002;420(6917):868-874.
24. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. Cytokine Growth Factor Rev. 2015;26(6):673-685.
25. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). N Engl J Med. 1976;295(7):369-377.
26. Nayer A, Ortega LM. Catastrophic antiphospholipid syndrome: a clinical review. J Nephropathol. 2014;3(1):9-17.
27. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. Int J Prev Med. 2014;5(8):927-946.
28. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. J Clin Invest. 1992;90(3):1138-1144.
29. Hartman J, Frishman WH. Inflammation and atherosclerosis: a review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy. Cardiol Rev. 2014;22(3):147-151.

30. Burke-Gaffney A, Brooks AV, Bogle RG. Regulation of chemokine expression in atherosclerosis. Vascul Pharmacol. 2002;38(5):283-292.

31. Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. Mol Cell. 1998;2(2):275-281.

32. Steinbrecher UP, Parthasarathy S, Leake DS, Witztum JL, Steinberg D. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. Proc Natl Acad Sci U S A. 1984;81(12):3883-3887.

33. Nayer A, Asif A. Idiopathic membranous nephropathy and anti-phospholipase A2 receptor antibodies. J Nephropathol. 2013;2(4):214-216.

34. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature. 1993;362(6423):801-809.

35. Corsini A, Bernini F, Quarato P, et al. Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. Cardiology. 1996;87(6):458-468.

36. Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ, et al. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. Nat Med. 2007;13(6):719-724.

37. Riley E, Dasari V, Frishman WH, Sperber K. Vaccines in development to prevent and treat atherosclerotic disease. Cardiol Rev. 2008;16(6):288-300.

38. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, et al. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. Curr Opin Lipidol. 1996;7(5):330-335.

39. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. Circulation. 2001;104(3):365-372.

40. Libby P, Simon DI. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. Circulation. 2001;103(13):1718-1720.

41. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. Arteriosclerosis. 1986;6(2):131-138.

42. Richardson PD, Davies MJ, Born GV. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. Lancet. 1989;2(8669):941-944.

43. Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. Circulation. 2003;108(14):1664-1672.
44. van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. Circulation. 1994;89(1):36-44.
45. Kubo T, Imanishi T, Takarada S, et al. Assessment of culprit lesion morphology in acute myocardial infarction: ability of optical coherence tomography compared with intravascular ultrasound and coronary angioscopy. J Am Coll Cardiol. 2007;50(10):933-939.
46. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000;20(5):1262-1275.
47. Libby P, Pasterkamp G. Requiem for the 'vulnerable plaque'. Eur Heart J. 2015;36(43):2984-2987.
48. Ovchinnikova OA, Folkersen L, Persson J, et al. The collagen cross-linking enzyme lysyl oxidase is associated with the healing of human atherosclerotic lesions. J Intern Med. 2014;276(5):525-536.
49. Ovchinnikova O, Robertson AK, Wagsater D, et al. T-cell activation leads to reduced collagen maturation in atherosclerotic plaques of Apoe(-/-) mice. Am J Pathol. 2009;174(2):693-700.
50. Back M, Ketelhuth DF, Agewall S. Matrix metalloproteinases in atherothrombosis. Prog Cardiovasc Dis. 2010;52(5):410-428.
51. Kovanen PT, Kaartinen M, Paavonen T. Infiltrates of activated mast cells at the site of coronary atheromatous erosion or rupture in myocardial infarction. Circulation. 1995;92(5):1084-1088.
52. Ehara S, Kobayashi Y, Yoshiyama M, et al. Spotty calcification typifies the culprit plaque in patients with acute myocardial infarction: an intravascular ultrasound study. Circulation. 2004;110(22):3424-3429.
53. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. Nat Med. 2011;17(11):1410-1422.

54. Nasri H. On the occasion of the world diabetes day 2013; diabetes education and prevention; a nephrology point of view. J Renal Inj Prev. 2013;2(2):31-32.

55. Asgary S, Sahebkar A, Afshani MR, Keshvari M, Haghjooyjavanmard S, Rafieian-Kopaei M. Clinical evaluation of blood pressure lowering, endothelial function improving, hypolipidemic and anti-inflammatory effects of pomegranate juice in hypertensive subjects. Phytother Res. 2014;28(2):193-199.

56. Asgary S, Keshvari M, Sahebkar A, Hashemi M, Rafieian-Kopaei M. Clinical investigation of the acute effects of pomegranate juice on blood pressure and endothelial function in hypertensive individuals. ARYA Atheroscler. 2013;9(6):326-331.

57. Ardalan MR, Rafieian-Kopaei M. Antioxidant supplementation in hypertension. J Renal Inj Prev. 2014;3(2):39-40.

58. Kanazawa K, Kawashima S, Mikami S, et al. Endothelial constitutive nitric oxide synthase protein and mRNA increased in rabbit atherosclerotic aorta despite impaired endothelium-dependent vascular relaxation. Am J Pathol. 1996;148(6):1949-1956.

59. Stamler JS. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. Cell. 1994;78(6):931-936.

60. Kolpakov V, Gordon D, Kulik TJ. Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. Circ Res. 1995;76(2):305-309.

61. Navab M, Hama SY, Nguyen TB, Fogelman AM. Monocyte adhesion and transmigration in atherosclerosis. Coron Artery Dis. 1994;5(3):198-204.

62. Hansson GK, Libby P, Schonbeck U, Yan ZQ. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis. Circ Res. 2002;91(4):281-291.

63. Libby P, Egan D, Skarlatos S. Roles of infectious agents in atherosclerosis and restenosis: an assessment of the evidence and need for future research. Circulation. 1997;96(11):4095-4103.

64. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? Lancet. 1997;350(9075):430-436.

65. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). N Engl J Med. 1992;326(4):242-250.

66. Danesh J, Collins R, Appleby P, Peto R. Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies. JAMA. 1998;279(18):1477-1482.

67. Maresca G, Di Blasio A, Marchioli R, Di Minno G. Measuring plasma fibrinogen to predict stroke and myocardial infarction: an update. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1999;19(6):1368-1377.

68. Fey GH, Fuller GM. Regulation of acute phase gene expression by inflammatory mediators. Mol Biol Med. 1987;4(6):323-338.

69. Nurk E, Tell GS, Vollset SE, Nygard O, Refsum H, Ueland PM. Plasma total homocysteine and hospitalizations for cardiovascular disease: the Hordaland Homocysteine Study. Arch Intern Med. 2002;162(12):1374-1381.

70. Liuzzo G, Biasucci LM, Gallimore JR, et al. The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid a protein in severe unstable angina. N Engl J Med. 1994;331(7):417-424.

71. Hattori Y, Matsumura M, Kasai K. Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. Cardiovasc Res. 2003;58(1):186-195.

72. Gharipour M, Ramezani MA, Sadeghi M, et al. Sex based levels of C-reactive protein and white blood cell count in subjects with metabolic syndrome: Isfahan Healthy Heart Program. J Res Med Sci. 2013;18(6):467-472.

73. Devaraj S, Xu DY, Jialal I. C-reactive protein increases plasminogen activator inhibitor-1 expression and activity in human aortic endothelial cells: implications for the metabolic syndrome and atherothrombosis. Circulation. 2003;107(3):398-404.

74. Tamadon MR, Baradaran A, Rafieian-Kopaei M. Antioxidant and kidney protection; differential impacts of single and whole natural antioxidants. J Renal Inj Prev. 2014;3(2):41-42.

75. Fredman G, Hellmann J, Proto JD, et al. An imbalance between specialized pro-resolving lipid mediators and pro-inflammatory leukotrienes promotes instability of atherosclerotic plaques. Nat Commun. 2016;7:12859.

76. Viola JR, Lemnitzer P, Jansen Y, et al. Resolving Lipid Mediators Maresin 1 and Resolvin D2 Prevent Atheroprogression in Mice. Circ Res. 2016;119(9):1030-1038.

77. Medeiros R, Kitazawa M, Passos GF, et al. Aspirin-triggered lipoxin A4 stimulates alternative activation of microglia and reduces Alzheimer disease-like pathology in mice. Am J Pathol. 2013;182(5):1780-1789.

78. Giera M, Ioan-Facsinay A, Toes R, et al. Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS. Biochim Biophys Acta. 2012;1821(11):1415-1424.
79. Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? Am J Pathol. 2010;177(4):1576-1591.
80. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. Nat Immunol. 2001;2(7):612-619.
81. Serhan CN, Hong S, Gronert K, et al. Resolvins: a family of bioactive products of omega-3 fatty acid transformation circuits initiated by aspirin treatment that counter proinflammation signals. J Exp Med. 2002;196(8):1025-1037.
82. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. Semin Immunol. 2015;27(3):200-215.
83. Packard RR, Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. Clin Chem. 2008;54(1):24-38.
84. Hulsmans M, Holvoet P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. J Cell Mol Med. 2010;14(1-2):70-78.
85. Wong BW, Meredith A, Lin D, McManus BM. The biological role of inflammation in atherosclerosis. Can J Cardiol. 2012;28(6):631-641.
86. Hulsmans M, Van Dooren E, Holvoet P. Mitochondrial reactive oxygen species and risk of atherosclerosis. Curr Atheroscler Rep. 2012;14(3):264-276.
87. Pant S, Deshmukh A, Gurumurthy GS, et al. Inflammation and atherosclerosis--revisited. J Cardiovasc Pharmacol Ther. 2014;19(2):170-178.
88. Beaudeux JL, Giral P, Bruckert E, Foglietti MJ, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. Clin Chem Lab Med. 2004;42(2):121-131.
89. Li Z, Li L, Zielke HR, et al. Increased expression of 72-kd type IV collagenase (MMP-2) in human aortic atherosclerotic lesions. Am J Pathol. 1996;148(1):121-128.
90. Lee YJ, Hwang SM, Kang DG, Kim JS, Lee HS. Effect of Gastrodia elata on tumor necrosis factor-alpha-induced matrix metalloproteinase activity in endothelial cells. J Nat Med. 2009;63(4):463-467.
91. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. Prog Mol Biol Transl Sci. 2017;147:1-73.

92. Gross J, Lapiere CM. Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay. Proc Natl Acad Sci U S A. 1962;48:1014-1022.

93. Gomis-Ruth FX. Structural aspects of the metzincin clan of metalloendopeptidases. Mol Biotechnol. 2003;24(2):157-202.

94. Nissinen L, Kahari VM. Matrix metalloproteinases in inflammation. Biochim Biophys Acta. 2014;1840(8):2571-2580.

95. Butler GS, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of signaling molecules to regulate inflammation. Periodontol 2000. 2013;63(1):123-148.

96. Toriseva M, Kahari VM. Proteinases in cutaneous wound healing. Cell Mol Life Sci. 2009;66(2):203-224.

97. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. Cell. 2010;141(1):52-67.

98. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. Nat Rev Immunol. 2004;4(8):617-629.

99. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. Amino Acids. 2011;41(2):271-290.

100. Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc Res. 2006;69(3):562-573.

101. Cauwe B, Van den Steen PE, Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2007;42(3):113-185.

102. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): an oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. J Biol Chem. 2003;278(31):28403-28409.

103. Kucukguven A, Khalil RA. Matrix metalloproteinases as potential targets in the venous dilation associated with varicose veins. Curr Drug Targets. 2013;14(3):287-324.

104. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report

from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1995;15(9):1512-1531.

105. Vacek TP, Rehman S, Neamtu D, Yu S, Givimani S, Tyagi SC. Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms. Vasc Health Risk Manag. 2015;11:173-183.

106. Ala-aho R, Kahari VM. Collagenases in cancer. Biochimie. 2005;87(3-4):273-286.

107. Reunanen N, Li SP, Ahonen M, Foschi M, Han J, Kahari VM. Activation of p38 alpha MAPK enhances collagenase-1 (matrix metalloproteinase (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) expression by mRNA stabilization. J Biol Chem. 2002;277(35):32360-32368.

108. Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. Biochimie. 2005;87(3-4):249-263.

109. Demedts IK, Morel-Montero A, Lebecque S, et al. Elevated MMP-12 protein levels in induced sputum from patients with COPD. Thorax. 2006;61(3):196-201.

110. Chang JJ, Stanfill A, Pourmotabbed T. The Role of Matrix Metalloproteinase Polymorphisms in Ischemic Stroke. Int J Mol Sci. 2016;17(8).

111. Lim CS, Qiao X, Reslan OM, et al. Prolonged mechanical stretch is associated with upregulation of hypoxia-inducible factors and reduced contraction in rat inferior vena cava. J Vasc Surg. 2011;53(3):764-773.

112. Feletou M, Vanhoutte PM. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(6):1215-1225.

113. McNamara CA, Sarembock IJ, Gimple LW, Fenton JW, 2nd, Coughlin SR, Owens GK. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor. J Clin Invest. 1993;91(1):94-98.

114. Coughlin SR. Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature. 2000;407(6801):258-264.

115. Garcia JG, Patterson C, Bahler C, Aschner J, Hart CM, English D. Thrombin receptor activating peptides induce Ca2+ mobilization, barrier dysfunction, prostaglandin synthesis, and platelet-derived growth factor mRNA expression in cultured endothelium. J Cell Physiol. 1993;156(3):541-549.

116. Raffetto JD, Ross RL, Khalil RA. Matrix metalloproteinase 2-induced venous dilation via hyperpolarization and activation of K+ channels: relevance to varicose vein formation. J Vasc Surg. 2007;45(2):373-380.

117. Raffetto JD, Qiao X, Koledova VV, Khalil RA. Prolonged increases in vein wall tension increase matrix metalloproteinases and decrease constriction in rat vena cava: Potential implications in varicose veins. J Vasc Surg. 2008;48(2):447-456.

118. Woodside KJ, Hu M, Burke A, et al. Morphologic characteristics of varicose veins: possible role of metalloproteinases. J Vasc Surg. 2003;38(1):162-169.

119. Heo SH, Cho CH, Kim HO, et al. Plaque rupture is a determinant of vascular events in carotid artery atherosclerotic disease: involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9. J Clin Neurol. 2011;7(2):69-76.

120. Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, et al. Insights into MMP-TIMP interactions. Ann N Y Acad Sci. 1999;878:73-91.

121. Patterson ML, Atkinson SJ, Knauper V, Murphy G. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. FEBS Lett. 2001;503(2-3):158-162.

122. Kuzuya M, Nakamura K, Sasaki T, Cheng XW, Itohara S, Iguchi A. Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006;26(5):1120-1125.

123. Tan C, Liu Y, Li W, et al. Associations of matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 concentrations with carotid atherosclerosis, based on measurements of plaque and intima-media thickness. Atherosclerosis. 2014;232(1):199-203.

124. Thomas AC, Newby AC. Effect of matrix metalloproteinase-9 knockout on vein graft remodelling in mice. J Vasc Res. 2010;47(4):299-308.

125. Vermaelen KY, Cataldo D, Tournoy K, et al. Matrix metalloproteinase-9-mediated dendritic cell recruitment into the airways is a critical step in a mouse model of asthma. J Immunol. 2003;171(2):1016-1022.

126. Nygardas PT, Hinkkanen AE. Up-regulation of MMP-8 and MMP-9 activity in the BALB/c mouse spinal cord correlates with the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Exp Immunol. 2002;128(2):245-254.

127. Vandenbroucke RE, Dejonckheere E, Van Hauwermeiren F, et al. Matrix metalloproteinase 13 modulates intestinal epithelial barrier integrity in inflammatory diseases by activating TNF. EMBO Mol Med. 2013;5(7):1000-1016.

128. McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. Science. 2000;289(5482):1202-1206.

129. Li Q, Park PW, Wilson CL, Parks WC. Matrilysin shedding of syndecan-1 regulates chemokine mobilization and transepithelial efflux of neutrophils in acute lung injury. Cell. 2002;111(5):635-646.

130. Corry DB, Kiss A, Song LZ, et al. Overlapping and independent contributions of MMP2 and MMP9 to lung allergic inflammatory cell egression through decreased CC chemokines. FASEB J. 2004;18(9):995-997.

131. Libby P, Tabas I, Fredman G, Fisher EA. Inflammation and its resolution as determinants of acute coronary syndromes. Circ Res. 2014;114(12):1867-1879.

132. Ference BA, Majeed F, Penumetcha R, Flack JM, Brook RD. Effect of naturally random allocation to lower low-density lipoprotein cholesterol on the risk of coronary heart disease mediated by polymorphisms in NPC1L1, HMGCR, or both: a 2 x 2 factorial Mendelian randomization study. J Am Coll Cardiol. 2015;65(15):1552-1561.

133. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science. 2001;292(5519):1160-1164.

134. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. N Engl J Med. 2008;359(21):2195-2207.

135. Hiro T, Kimura T, Morimoto T, et al. Effect of intensive statin therapy on regression of coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndrome: a multicenter randomized trial evaluated by volumetric intravascular ultrasound using pitavastatin versus atorvastatin (JAPAN-ACS [Japan assessment of pitavastatin and atorvastatin in acute coronary syndrome] study). J Am Coll Cardiol. 2009;54(4):293-302.

136. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005;45:89-118.

137. Sirtori CR. The pharmacology of statins. Pharmacol Res. 2014;88:3-11.

138. Patti G, Chello M, Candura D, et al. Randomized trial of atorvastatin for reduction of postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery: results of the ARMYDA-3 (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Dysrhythmia After cardiac surgery) study. Circulation. 2006;114(14):1455-1461.

139. Kinlay S, Schwartz GG, Olsson AG, et al. High-dose atorvastatin enhances the decline in inflammatory markers in patients with acute coronary syndromes in the MIRACL study. Circulation. 2003;108(13):1560-1566.

140. Maack C, Kartes T, Kilter H, et al. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. Circulation. 2003;108(13):1567-1574.

141. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial. JAMA. 2004;291(9):1071-1080.

142. Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. JAMA. 2006;295(13):1556-1565.

143. Sur S, Sugimoto JT, Agrawal DK. Coronary artery bypass graft: why is the saphenous vein prone to intimal hyperplasia? Can J Physiol Pharmacol. 2014;92(7):531-545.

144. Higgins TL, Estafanous FG, Loop FD, Beck GJ, Blum JM, Paranandi L. Stratification of morbidity and mortality outcome by preoperative risk factors in coronary artery bypass patients. A clinical severity score. JAMA. 1992;267(17):2344-2348.

145. Barzilay JI, Kronmal RA, Bittner V, Eaker E, Evans C, Foster ED. Coronary artery disease and coronary artery bypass grafting in diabetic patients aged > or = 65 years (report from the Coronary Artery Surgery Study [CASS] Registry). Am J Cardiol. 1994;74(4):334-339.

146. Hammoud T, Tanguay JF, Bourassa MG. Management of coronary artery disease: therapeutic options in patients with diabetes. J Am Coll Cardiol. 2000;36(2):355-365.

147. Bello SO, Peng EW, Sarkar PK. Conduits for coronary artery bypass surgery: the quest for second best. J Cardiovasc Med (Hagerstown). 2011;12(6):411-421.

148. Souza DS, Gomes WJ. The future of saphenous vein graft for coronary artery. Rev Bras Cir Cardiovasc. 2008;23(3):III-VII.

149. Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. Cardiovasc Res. 2012;95(2):156-164.

150. Glineur D, Hanet C. Competitive flow in coronary bypass surgery: is it a problem? Curr Opin Cardiol. 2012;27(6):620-628.

151. Dreifaldt M, Souza DS, Loesch A, et al. The "no-touch" harvesting technique for vein grafts in coronary artery bypass surgery preserves an intact vasa vasorum. J Thorac Cardiovasc Surg. 2011;141(1):145-150.

152. Loop FD, Lytle BW, Cosgrove DM, et al. J. Maxwell Chamberlain memorial paper. Sternal wound complications after isolated coronary artery bypass grafting: early and late mortality, morbidity, and cost of care. Ann Thorac Surg. 1990;49(2):179-186; discussion 186-177.

153. Lehoux S, Tedgui A. Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. J Biomech. 2003;36(5):631-643.

154. Lemarie CA, Tharaux PL, Lehoux S. Extracellular matrix alterations in hypertensive vascular remodeling. J Mol Cell Cardiol. 2010;48(3):433-439.

155. Mills JL, Fujitani RM, Taylor SM. The characteristics and anatomic distribution of lesions that cause reversed vein graft failure: a five-year prospective study. J Vasc Surg. 1993;17(1):195-204; discussion 204-196.

156. Cooper GJ, Underwood MJ, Deverall PB. Arterial and venous conduits for coronary artery bypass. A current review. Eur J Cardiothorac Surg. 1996;10(2):129-140.

157. Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease: pathogenesis, predisposition, and prevention. Circulation. 1998;97(9):916-931.

158. Tan PH, Chan C, Xue SA, et al. Phenotypic and functional differences between human saphenous vein (HSVEC) and umbilical vein (HUVEC) endothelial cells. Atherosclerosis. 2004;173(2):171-183.

159. Raab M, Daxecker H, Markovic S, Karimi A, Griesmacher A, Mueller MM. Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. Clin Chim Acta. 2002;321(1-2):11-16.

160. Bjorkbacka H, Fredrikson GN, Nilsson J. Emerging biomarkers and intervention targets for immune-modulation of atherosclerosis - a review of the experimental evidence. Atherosclerosis. 2013;227(1):9-17.

161. Ridker PM, Thuren T, Zalewski A, Libby P. Interleukin-1beta inhibition and the prevention of recurrent cardiovascular events: rationale and design of the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). Am Heart J. 2011;162(4):597-605.

162. Qamar A, Rader DJ. Effect of interleukin 1beta inhibition in cardiovascular disease. Curr Opin Lipidol. 2012;23(6):548-553.

163. Welsh P, Grassia G, Botha S, Sattar N, Maffia P. Targeting inflammation to reduce cardiovascular disease risk: a realistic clinical prospect? Br J Pharmacol. 2017;174(22):3898-3913.

164. Hernandez-Presa MA, Martin-Ventura JL, Ortego M, et al. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. Atherosclerosis. 2002;160(1):49-58.

165. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, et al. Inflammation, pravastatin, and the risk of coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. Circulation. 1998;98(9):839-844.

166. Ridker PM, Cannon CP, Morrow D, et al. C-reactive protein levels and outcomes after statin therapy. N Engl J Med. 2005;352(1):20-28.

167. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. N Engl J Med. 2005;352(1):29-38.

168. Gopalakrishnan M, Silva-Palacios F, Taytawat P, Pant R, Klein L. Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of plaque rupture. J Invasive Cardiol. 2014;26(9):484-492.

169. Fingleton B. Matrix metalloproteinases as regulators of inflammatory processes. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2017;1864(11 Pt A):2036-2042.

170. Iyer RP, de Castro Bras LE, Patterson NL, et al. Early matrix metalloproteinase-9 inhibition post-myocardial infarction worsens cardiac dysfunction by delaying inflammation resolution. J Mol Cell Cardiol. 2016;100:109-117.

171. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. Cell. 2011;145(3):341-355.

172. Mallat Z, Henry P, Fressonnet R, et al. Increased plasma concentrations of interleukin-18 in acute coronary syndromes. Heart. 2002;88(5):467-469.

173. Schonbeck U, Libby P. Inflammation, immunity, and HMG-CoA reductase inhibitors: statins as antiinflammatory agents? Circulation. 2004;109(21 Suppl 1):II18-26.

174. Newby AC. Metalloproteinases and vulnerable atherosclerotic plaques. Trends Cardiovasc Med. 2007;17(8):253-258.

175. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. Circulation. 2001;103(7):926-933.

176. Massaro M, Zampolli A, Scoditti E, et al. Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. Cardiovasc Res. 2010;86(2):311-320.

177. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. Physiol Rev. 2005;85(1):1-31.

178. Onal B, Ozen D, Demir B, et al. The Anti-Inflammatory Effects of Anacardic Acid on a TNF-alpha - Induced Human Saphenous Vein Endothelial Cell Culture Model. Curr Pharm Biotechnol. 2019.

179. Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, et al. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. J Biol Chem. 1996;271(25):14657-14660.

180. McQuibban GA, Gong JH, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo. Blood. 2002;100(4):1160-1167.

181. Kato H, Duarte S, Liu D, Busuttil RW, Coito AJ. Matrix Metalloproteinase-2 (MMP-2) Gene Deletion Enhances MMP-9 Activity, Impairs PARP-1 Degradation, and Exacerbates Hepatic Ischemia and Reperfusion Injury in Mice. PLoS One. 2015;10(9):e0137642.

182. Lin LY, Huang CC, Chen JS, et al. Effects of pitavastatin versus atorvastatin on the peripheral endothelial progenitor cells and vascular endothelial growth factor in high-risk patients: a pilot prospective, double-blind, randomized study. Cardiovasc Diabetol. 2014;13:111.

183. Fernandez-Patron C, Martinez-Cuesta MA, Salas E, et al. Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2. Thromb Haemost. 1999;82(6):1730-1735.

184. Sheu JR, Fong TH, Liu CM, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in human platelets: regulation of platelet activation in in vitro and in vivo studies. Br J Pharmacol. 2004;143(1):193-201.

185. Galt SW, Lindemann S, Medd D, et al. Differential regulation of matrix metalloproteinase-9 by monocytes adherent to collagen and platelets. Circ Res. 2001;89(6):509-516.

186. Kalvegren H, Jonsson S, Jonasson L. Release of matrix metalloproteinases-1 and -2, but not -9, from activated platelets measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Platelets. 2011;22(8):572-578.

187. Mannello F, Medda V. Differential expression of MMP-2 and MMP-9 activity in megakaryocytes and platelets. Blood. 2011;118(24):6470-6471; author reply 6471-6473.

188. Mastenbroek TG, Feijge MA, Kremers RM, et al. Platelet-Associated Matrix Metalloproteinases Regulate Thrombus Formation and Exert Local Collagenolytic Activity. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2015;35(12):2554-2561.

189. Sluijter JP, Pulskens WP, Schoneveld AH, et al. Matrix metalloproteinase 2 is associated with stable and matrix metalloproteinases 8 and 9 with vulnerable carotid atherosclerotic lesions: a study in human endarterectomy specimen pointing to a role for different extracellular matrix metalloproteinase inducer glycosylation forms. Stroke. 2006;37(1):235-239.

190. Mizuma A, Yenari MA. Anti-Inflammatory Targets for the Treatment of Reperfusion Injury in Stroke. Front Neurol. 2017;8:467.

TNF-α ILE OLUŞTURULAN INSAN SAFEN VEN ATEROSKLEROZ MODELINDE ATORVASTATIN VE PITAVASTATININ ANTI-INFLAMATUVAR ETKILERININ KARŞILAŞTIRILMASI

ORIJINALLIK RAPORU

%7	%4	%3	%6
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Akdeniz University Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	%1
3	tez.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	cdn.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<%1
6	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1
7	tbgder.org İnternet Kaynağı	<%1
8	akademikpersonel.kocaeli.edu.tr	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Deniz	**Soyadı**	Özen
Doğ.Yeri	Mersin	**Doğ.Tar.**	15/07/1993
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	**TC Kim No**	39937517206
Email	d.ozendeniz@gmail.com	**Tel**	0532 681 3051

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi – Tıbbi Farmakoloji ABD.	2019
Lisans	İ.T.Ü. Moleküler Biyoloji ve Genetik	2016
Lise	İçel Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Araştırma Görevlisi	İstinye Üni. Moleküler Biyoloji ve Gen.	2017-2019
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi		YÖKDİL (96)

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

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	94	94	78
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
EndNote	
PyMol	
MatLab	

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

1. Onal, B., **Ozen, D.,** Demir, B., Gezen Ak, D., Dursun, E., Demir, C., Akkan, A. G., & Ozyazgan, S. (2019). The Anti-Inflammatory Effects of Anacardic Acid on a TNF-α-Induced Human Saphenous Vein Endothelial Cell Culture Model. Curr Pharm Biotechnol. doi: 10.2174/1389201020666191105154619

2. Onal, B., **Ozen, D.,** Demir, B., Akkan, A. G., & Ozyazgan, S. (2019). Receptor for Advanced Glycation End Products Gene Polymorphisms in Cardiac Syndrome X. Biomed Rep. doi: 10.3892/br.2019.1231

3. Akal, M.T., Onal, B., **Ozen, D.,** Demir, B., Akkan, A. G., & Ozyazgan, S. (2019). Kardiyak Sendrom X Hastalarında CYP2J2 Polimorfizminin Belirlenmesi. Kafkas J Med Sci. doi: 10.5505/kjms.2019.48264

4. Ozer, Y. G., Onal, B., **Ozen, D.,** Kandaz, C., Demir, B., & Akkan, A. G. (2018). Investigation of Interleukin-17 Serum Levels and IL-17 Gene -152G/A Polymorphism in Cardiac Syndrome X Patients. JAREM. doi: 10.5152/jarem.2018.2038

5. Kandaz, C., Onal, B., **Ozen, D.,** Demir, B., Akkan, A. G., & Ozyazgan, S. (2017). Investigation of MTHFR gene C677T polymorphism in cardiac syndrome X patients. J Clin Lab Anal. doi: 10.1002/jcla.22247