

DeneySEL HİPERLİPİDEMİ VE Apo-B KONJUGATI UYGULAMASININ Kan Doku Faktörü Seviyesi ve Karaciğer Doku Faktörü Aktivitesi Üzerine Etkileri

Benun Kılıç¹, Saime Batirel², Zeynep Akdeste³, Nesrin Emekli¹

¹Marmara Üniversitesi Dışhekimliği Fakültesi Biyokimya Bilim Dalı, İstanbul - Türkiye

²Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul - Türkiye

³Yıldız Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü, İstanbul - Türkiye

Yazışma Adresi / Address reprint requests to: Nesrin Emekli

Marmara Üniversitesi Dışhekimliği Fakültesi Biyokimya Bilim Dalı, İstanbul - Türkiye

Elektronik posta adresi / E-mail address: snemekli@marmara.edu.tr

Kabul tarihi / Date of acceptance: 20 Mayıs 2012 / May 20, 2012

ÖZET

DeneySEL hiperlipidemi ve Apo-B konjugatı uygulamasının kan doku faktörü seviyesi ve karaciğer doku faktörü aktivitesi üzerine etkileri

Amaç: Hiperlipidemi ve hiperkoagülasyon ateroskleroz gelişiminde önemli yer tutar. Aterom plakları içinde özellikle yüksek miktarda Apolipoprotein-B 100 (Apo-B) içeren LDL-C (düşük dansiteli lipoprotein kolesterolü) görülmektedir. Bu nedenle deneySEL hiperlipidemi oluşturulan sıçanlarda ve Apo-B konjugatı uygulamasının kandaki doku faktörü (DF) miktarı ve karaciğer DF aktivitesi üzerine etkilerini incelemeyi amaçladık.

Yöntem: Bu çalışmada deneySEL Apo-B konjugatı ilaveli ve ilavesiz deneySEL hiperlipidemi yapılan 32 adet C57BL/6 türü fare her bir grupta 8 fare olacak şekilde 3 gruba ayrıldı (1-Kontrol grubu; 2-Hiperlipidemi grubu; 3-Hiperlipidemi + Apo-B grubu). İki ay sonunda sakrifiye edilen hayvanların rutin lipid parametreleri, kanda ve karaciğer dokusunda doku faktörü (DF) miktarı ve aktivitesi incelendi. Bu amaçla total lipid miktarı, fosfovanilin metodu ile, total ve LDL kolesterol ticari kit kullanılarak, kan DF tayini ELISA yöntemi ile, karaciğer DF aktivitesi ise Quick metodu ile ölçüldü.

Bulgular: Hiperlipidemik grupta total lipid, kolesterol, LDL-C değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttı; LDL-C değeri Apo-B konjugatı ilave edilen grupta azalırken, total lipid ve total kolesterol değerleri arttı. Kandaki DF değerleri anlamlı bir artış gösterdi; Apo-B konjugatı verilen grupta kandaki DF sonuçları değişmedi. Karaciğer homojenatında DF aktivitesi hiperlipidemik grupta hızlandı; Apo-B verilen grupta sonuç değişmedi.

Sonuç: Elde ettiğimiz sonuçlar biyokimyasal yünden değerlendirildiğinde, ateroskleroz patogenezinde önemli olduğu düşünülen hiperlipidemi ve hiperkoagülasyon durumunda Apo-B konjugatı uygulamasının etkili olduğu görülmüştür. Ancak bu konudaki çalışmaların Apo-B konjugatı enjeksiyonunun immunölojik yönlerinin de detaylandırılarak devam etmesinde yarar olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar sözcükler: DeneySEL hiperlipidemi, C57BL/6, Apo-B 100, doku faktörü

ABSTRACT

Effects of experimental hyperlipidemia and Apo-B conjugate administration on blood tissue factor level and the tissue factor activity of liver

Objective: Hyperlipidemia and hypercoagulation are the major risk factors in atherosclerotic events. Low density lipoproteins (LDLs) are the main source of lipids in the atherosclerotic plaques within the foam cells. Apoprotein B-100 (Apo-B) is the main protein in the LDL-cholesterol (LDL-C). For this purpose we aimed to investigate blood tissue factor (TF) levels and the TF activity of liver in experimental hyperlipidemia with and without Apo-B conjugate administration.

Methods: Thirty two C57BL/6 mice were divided into 3 groups as control group (n=8), hyperlipidemic group (n=8), hyperlipidemic+Apo-B group (n=8). Mice were sacrificed at the end of two months and blood lipid parameters, blood TF levels and TF activity of liver were investigated. Serum lipid parameters were determined by using commercial kits, blood TF levels were determined by Elisa and liver TF activities were measured by Quick method.

Results: Serum levels of total lipid, cholesterol, LDL-C significantly increased in hyperlipidemic group; LDL-C significantly decreased in both Apo-B and LDL conjugate given hyperlipidemic groups. Serum TF increased significantly in short term hyperlipidemia, TF activities in the liver homogenate also increased significantly. There was no effect of Apo-B conjugates on TF values in blood and liver homogenate.

Conclusion: Based on the results of this study Apo-B conjugate administration was effective in hyperlipidemia and hypercoagulation which are important factors in atherosclerosis. On the other hand we believe that new studies are necessary to investigate immunological properties of Apo-B conjugate administration.

Key words: Experimental hyperlipidemia, C57BL/6, Apo-B 100, tissue factor

GİRİŞ

Aterosklerozla ilgili geçmişte antik çağlara kadar uzanan pek çok hipotez ileri sürülmüştür (1-3). Bu hipotezlerin için-

de koagülasyon ve damar endotelindeki lipid birikimleri hep yer almıştır. Günümüzde arteriyel tromboembolinin gelişiminde inflamasyon ön plana çıkarılmıştır (4-6). Fakat koagülasyon inflamasyon ilişkisi nedeniyle hemostatik sis-

tem, arteriyel tromboembolinin patogenezinin hiç ayrı düşülmemiştir (7-11).

Ateroskleroz ve kalp damar hastalıklarının patogenezinde lipidler önemli bir risk faktörüdür. Çünkü ateroskleroz plaklarındaki makrofajların lipid yüklü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu hücreler köpük hücreleri olarak anılırlar (3,12,13). Histokimyasal boyalarla ateroskleroz plaklarında doku faktörünün arttığı da günümüzün bulguları arasındadır (8).

Koagülasyon mekanizması; negatif ve pozitif feedback reaksiyonları, çoklu-enzim sistemlerini, humoral ve hücrel prokoagülan ve antikoagülanları içinde barındıran kompleks bir reaksiyon dizisidir. Günümüzde hayati organları tehdit eden arteriyel tromboembolinin başlıca sorumlusu olarak kabul edilen koagülasyon- inflamasyon olaylarında, ekstremler ve intrinsek koagülasyon mekanizmasının tetikleyicisi durumunda olan doku faktörü (DF) önemli bir yer tutar (14,15).

DF ile ilgili çalışmalar 1800'lü yıllarda başlamış günümüzde ise, bu membran proteinin pek çok metabolik faaliyet içinde olduğu vurgulanmıştır (16-18). 1886 yılında Wooldridge kanda bulunmayan fakat dokuda bulunan bir maddenin pıhtılaşmayı hızlandırdığını bildirmiş (2) ve bu doku homojenatlarının çok dilüe olarak dahi hayvanlara zerk edildiğinde ani ölümlerin görülmesi (19), dokuda pıhtı oluşturan çok güçlü bir ajan olduğu fikrinin ortaya atılmasına neden olmuştur (20). Bu düşüncelerden hareketle günümüze gelen çalışmalar CD142 olarak da isimlendirilen doku faktörünün kanda da bulunduğunu, çok yönlü fonksiyon yaptığını, sitokinlerle ilişkili oldukları için inflamasyonun da tetiklendiğini, ya da artan sitokinlerin DF'yi etkileyerek trombus oluşumunu hızlandırdığı bildirilmektedir (10,11,21,22).

Kanın içinde dolandığı endotel hücreleri, koagülasyon ve inflamasyon arasında ortak bir noktadır. İnflamasyon esnasında hasar görmüş endotel, hem koagülasyonla hem de inflamasyonla ilgili proteinleri harekete geçirir. DF, trombin, trombositler, sitokinler, kemotaksis ile ilgili proteinler, adezyon molekülleri, trombomodülin, protein C, hem koagülasyon hem de inflamasyonda yer alan moleküllerdir. Burada DF hem arteriyel tromboemboli oluşumunda, hem de sinyal iletim sisteminde yer aldığı için başlıca rolü oynar.

Yüksek kolesterol içeren diyetle beslenen tavşanlarda gelişen aterosklerozun erken safhalarından itibaren T lenfositlere rastlanmıştır. Hücrel immunitede önemli görevi olan T lenfositlerin aterosklerozun her safhasında yer aldığı bildirilmiştir (23). Aterosklerotik lezyonlarda immüno-globulinler ve immün sistemle ilgili çeşitli proteinler ve hücre-

lerin bulunduğu bildirilmiştir (24).

Hayvanları yüksek dozda kolesterol ile besleyerek yapılan hiperlipidemi insandaki aterosklerozu anlamak için yapılan iyi bir modeldir. Kolesterol artışı ile kalp damar hastalıkları riskinin artması günümüzde artık iyi bilinen bir konudur.

Biz bu bilgilerden hareketle, kısa süreli hiperlipidemi yapılan ve aterosklerozu meylli olduğu bilinen C57Bl/6 tipi farelere Apolipoprotein-B 100 (Apo-B) antijeni vererek immün sistemi harekete geçirdiğimizde, lipid profili ve koagülasyonun odak noktasında bulunan DF değerlerinde nasıl bir değişim olacak düşüncesinden hareketle bu çalışmayı planlayarak literatüre katkı yapmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Oluşturulan Gruplar

Çalışmamızda TÜBİTAK'tan temin edilen C57Bl/6 tip 24 adet 2 aylık dişi fare kullanıldı. Deney hayvanları, "Hiperlipidemik grup, Apo-B Konjugatı verilen Hiperlipidemik grup ve Kontrol grubu" olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Hiperlipidemik grupta yer alan deney hayvanlarında %1.63 gr kolesterol, %0.41 gr kolik asit ve %16.3 gr ayçiçeği yağı içeren hiperlipidemik yem ile hiperlipidemi oluşturuldu. Deney gruplarından Apo-B grubuna deneyin başında ve 7. günde Apo-B konjugatı verildi. Apo-B konjugatı (Sigma Company) 30 gr ağırlığındaki fare için 200 µg hacminde (100 µg 0.5 mg protein + 100 µg 0.5 mg polimer şeklinde) 7 gün ara ile intraperitoneal olarak enjekte edildi. Deney sonunda hayvanlardan kalp kanı alındı. Alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edildi. Elde edilen serum örnekleri DF ve lipid parametreleri tayinlerinde kullanıldı. Bu amaçla total lipid fosfovanilin metodu ile, total ve LDL kolesterol ticari kit kullanılarak, kan DF tayini ELISA yöntemi ile, karaciğer DF aktivitesi ise Quick metodu ile ölçüldü. Deney sonunda tayinlerde kullanılmak üzere alınan karaciğer dokusu çıkartılarak serum fizyolojikte yıkandı. Zar ve yağ kısımları temizlenerek, buz içerisinde küçük parçalara ayrıldı. Bu küçük parçalar daha sonra cerrahi makasla kesilmek suretiyle kıyma haline getirildi ve tartıldı. Karaciğer dokusu ağırlığı kadar serum fizyolojik (mL) ilavesi ile homojenize edilerek %100'lük doku homojenatları hazırlandı. Hazırlanan doku homojenatları tüplere konarak derin dondurucuda -20°C'de kullanılacağı tarihe kadar saklandı.

Kanda Doku Faktörü Tayini

Kanda DF ölçümü ELISA yöntemi ile USCN KAT NO: E95024 MA ticari kit kullanılarak yapıldı. Buna göre, DF spesifik antikor ile önceden kaplanmış kuyucuklara uygun miktarda standart ve numuneler ilave edilir ve DF spesifik biotinle konjuge olmuş poliklonal antikor ilavesi yapılır. Daha sonra avidinle konjuge edilmiş Horseradish Peroxidase (HRP) ilavesi ve gerekli inkübasyonlardan sonra substrat çözeltisi (tetrametil benzidin [TMB]) ilave edilir. Enzim-substrat reaksiyonu uygun bir asit çözeltisi ile durdurulur ve oluşan rengin şiddeti spektrofotometrede okunur. Çizilen standart eğriden yararlanılarak kullanılan örneklerin miktarı hesaplanır.

Doku Faktörü Aktivitesi Tayini

Karaciğer dokusu %0.9 g NaCl ile homojenize edilerek %10 g'lık doku homojenatları elde edildi. Elde edilen homojenatlar DF aktivitesi tayininde DF kaynağı olarak kullanıldı. Karaciğer DF aktivitesi Quick'in 'tek basamaklı protrombin zamanı testi' ile DF'nin (homojenat) eşit miktarda plazma ve 0.02M Ca⁺⁺ ile karıştırılması sonucu pıhtı oluşumu için geçen sürenin (sn) ölçülmesi şeklinde yapıldı. Pıhtının oluşum süresi DF aktivitesi ile ters orantılı olduğu için sürenin uzaması azalmış DF aktivitesinin göstergesidir.

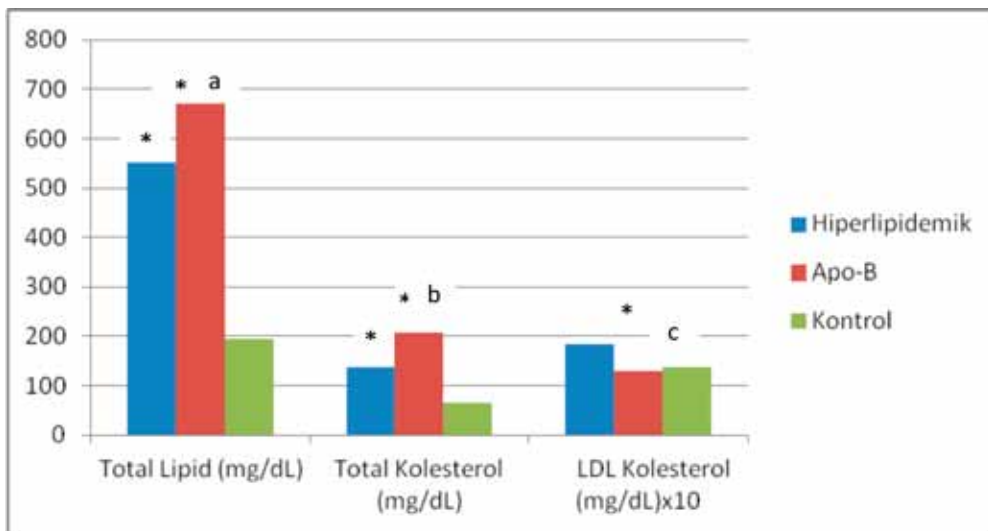
İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmanın biyoistatistiksel değerlendirilmesi için GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego; CA; USA) programı kullanıldı. Tüm değerler ortalama \pm Standart sapma olarak verildi. Gruplar Kruskal Wallis testi ile karşılaştırılmanın ardından Dunn's Multipl Comparison Testi ile değerlendirilmiştir. Anlamlılık sınırı $p < 0.05$ alınmıştır.

BULGULAR

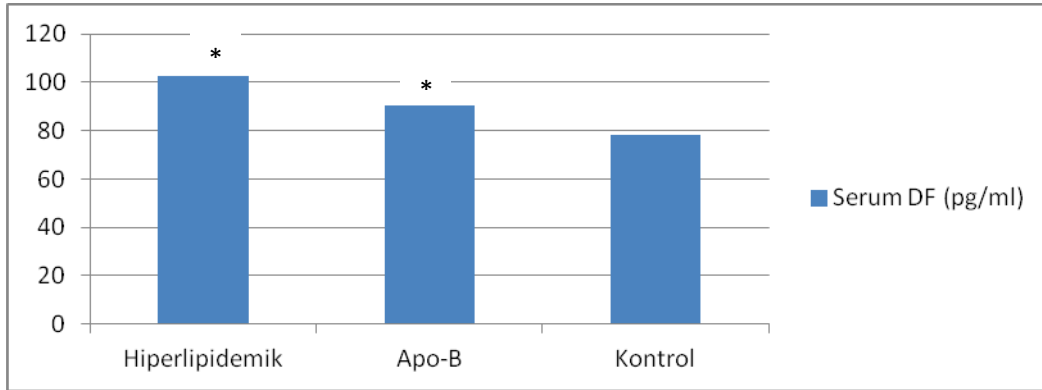
Hiperlipidemik, Apo-B ve kontrol gruplarının lipid parametre değerleri Grafik 1'de verilmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlarda total lipid, total kolesterol, LDL kolesterol anlamlı derecede artarken, Apo-B konjugatı verilen hiperlipidemik grupta total lipid ve total kolesterol değerleri anlamlı derecede artmıştır. Apo-B konjugatı uygulanan hiperlipidemik grupta total lipid, total kolesterol değerleri normal hiperlipidemik gruba göre daha da artış gösterirken LDL kolesterol değerinin düştüğü dikkati çekmiştir.

Kanda kontrol ve hiperlipidemik grupların ölçülen DF değerleri Grafik 2'te görülmektedir. Kan DF değeri hiperlipidemik ve Apo-B gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir artış göstermiştir ($p < 0.001$). Kanda hiperlipidemik ve Apo-B grupların DF değerleri arasında ise anlamlı bir fark görülmemektedir.



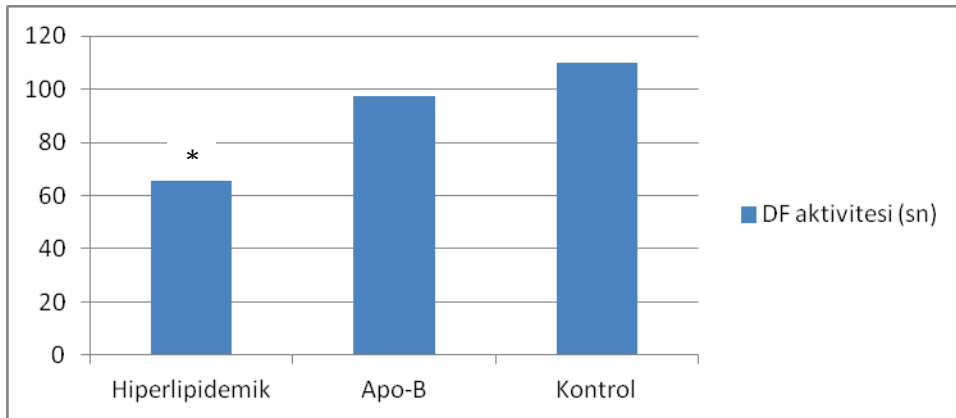
Grafik 1: Hiperlipidemik, Apo-B ve Kontrol Gruplarının Lipid Parametre Değerleri Grafığı

* $p < 0.001$ kontrol grubundan farklı; * $p < 0.005$ hiperlipidemik grupdan farklı, ^b $p < 0.001$ hiperlipidemik grupdan farklı, ^c $p < 0.001$ hiperlipidemik grupdan farklı



Grafik 2: Hiperlipidemik, Apo-B ve Kontrol Gruplarının Serum Doku Faktörü (DF) Değerleri Grafiği

* $p < 0,001$ kontrol grubundan farklı



Grafik 3: Hiperlipidemik, Apo-B ve Kontrol Gruplarının Karaciğer Doku Faktörü (DF) Aktiviteleri Grafiği

Pıhtının oluşum süresi DF aktivitesi ile ters orantılı olduğu için sürenin uzaması azalmış DF aktivitesini gösterir. * $p < 0,002$ kontrol grubundan farklı

Karaciğer DF aktivitesi değerleri Grafik 3'de görülmektedir. DF aktivitesi değeri hiperlipidemik grupta kontrol grubuna göre artma göstermiştir. Karaciğer DF aktivitesi değeri hiperlipidemik grupla Apo-B grubuna göre değişiklik göstermemiştir.

TARTIŞMA

Hiperlipidemi arterlerde ateroskleroz gelişmesini hızlandırır ve özellikle koroner arter hastalıkları için ciddi bir risk faktörüdür. Ancak giriş bölümünde belirtildiği gibi, hiperkoagülasyon, inflamasyon ve lipid peroksidasyonunun da ateroskleroz patogeneğinde önemli olduğu bildirilmektedir. Bu noktadan hareketle bu çalışmada, 60 gün boyunca hiperlipidemik yem ile beslenen C57BL/6 tipi fare-

lerin kandaki lipid profili ve kan ve karaciğer dokusundaki DF değerleri incelendi, bu değerlere Apo-B-100 (Apo-B) konjugatının etkisi incelendi.

DF'nin sinyal iletiminde etkin olduğunun anlaşılması ile beraber, sinyal iletiminde etkin olan diğer bir molekül grubu nükleotidlerle ilişkisi kurulmaya başlanmıştır. Özellikle kardiovasküler sistemdeki etkiler üzerinde yoğun çalışmalar başlamıştır. Ding ve ark. (5) koroner arterlerdeki endotel hücrelerindeki DF'nin ekspresyonunun bir nükleotid reseptör aracılığı ile gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Trombosit agregasyonunda rol oynayan nükleotid reseptörlerinin tanınması klopidogrel gibi yeni antitrombotik ajanların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu bilgilerden yola çıkan araştırmacılar P2Y reseptörlerinin de DF up-regülasyonunda etkin olduğunu ve bu yolun baskılanması ile DF'nin trom-

bus yapıcı etkisinin azalacağını ileri sürmüşlerdir.

Normalde endotel hücreleri DF ekspresyonu yapmazlar. Ancak endotel disfonksiyonu halinde hücre yüzeyinde DF belirir. DF kanda dolmakta olan FVII için güçlü bir kofaktör ve aynı zamanda reseptördür. Bu nedenle endotel disfonksiyonu yapan ajanlar DF'nin hücre yüzeyinde görünmesi ve kanla temas etmesi için yeterli bir nedendir.

Hiperlipidemi, özellikle LDL-C endotel disfonksiyonu yapan ajanlar arasındadır. DF bir kere kanla temas ettikten sonra ekstrinsek ve intrinsek sistemin uyarılması kaçınılmaz olur. DF aktivasyonu ile oluşan trombin bir taraftan da trombositleri uyararak aktiveleştirir ve trombosit adezyon, sekresyon ve agregasyonu hızlanır. Bu durumda aterotromboz ve hiperkoagülasyon birbirinin hem tetikleyicisi hem de sonucudur.

Bütün bunlar düşünüldüğünde bizim yaptığımız kısa süreli hiperlipidemi modelinde kandaki DF değerinin artmış olması karaciğerdeki DF aktivitesinin de bu artışa paralellik göstermesi trombus lehine bir bulgudur. İnflamatuar cevaplar gibi lipit birikimi de DF için risk faktördür. İnflamatuar cevaplarda çeşitli interlökinler, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endoteldeki DF ekspresyonunu başlatır. P2Y reseptör ailesinin DF uyarısında etkin ve regüle edici olabileceği düşünülmektedir (5).

Fregula ve ark. (22) özellikle karotid arter gibi akış hızı yüksek olan damarlardaki hasarda DF ile karşılaşıldığında trombus oluşumunun hızlandığını bildirmişlerdir. Bu nedenle DF ekspresyonunun ve dolaşımdaki varlığının kontrolü çok iyi yapılmakta olduğu kabul edilmekte fakat bu kontrol mekanizmalarının nasıl olduğu iyi bilinmemektedir.

DF ile Faktör VII aktivasyonunun ayrı olduğunu ve Faktör VII aktivasyonunda plazmadaki lipoproteinlerin etkin olduğunu bildiren çalışmalar vardır (25). DF, aktif Faktör VII için hem kofaktör, hem de reseptördür. Normal şartlarda fonksiyonel DF sadece hücrelerde sentez edilir. Monosit ve makrofajlar bu hücreler arasındadır. Damar hasarı ile subendotelde bulunan DF plazma proteinleri ile karşılaşınca hemostaz ve trombusu başlatır. Bazı çalışmalar Faktör VII aktivitesindeki artışın ölümle sonuçlanan koroner arter hastalıkları ile orantılı olduğunu bildirilmiştir (25).

Roselear ve ark. (23) siklosporin A verdikleri C57BL/6 tipi farelerde T lenfositlerin aktivasyonunu önleyerek ateroskleroz ile immun sistem arasındaki ilişkiyi anlamaya çalışmışlardır. Biz çalışmamızda Apo-B antijeni vererek immün sistemi

harekete geçirdiğimizde lipit profilinin değişip değişmeyeceğini inceledik. Son yıllarda DF ile ilgili önemli diğer bir bulgu da gelişen teknoloji ile birlikte kanda ölçülebilecek DF miktarlarının bulunuyor olmasıdır. Eski bilgilerden farklı olarak bu bulgu, 1990'lı yılların sonunda farklı araştırmacılar tarafından "blood borne TF-kan kaynaklı DF" ya da "circulating TF-dolaşan DF" adı ile bildirilmiştir (15). Bu bulgular damar duvarındaki DF'den çok farklı görüşlerin ortaya atılmasına neden olmuş, trombus olaylarına bakışı değiştirmiştir.

Butanos ve ark. (26) sağlıklı insanların kanında dolanan DF miktarının koagülasyonu etkilemeyecek kadar düşük miktarda olduğunu söylemişlerdir. Kimi araştırmacılara göre dolanan DF oluşan pıhtının kenarına tutunmaktadır (20). Ancak ne amaçla tutunduğu çok iyi anlaşılmamıştır. Dolanan DF'nin hemostaz, tromboz ve lipit metabolizmasındaki etkilerini anlamak için çok daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Pan ve ark. (27) DF yolağı inhibitörü (TFPI)'nin aşırı-ekspresyonu ile plazma kolesterolünün aşırı yükselmesinin önlendiğini bildirmişlerdir. Bu etki, geniş zaman diliminde aterosklerotik plak oluşumunda azalma olacağını düşündürür. Silveira ve ark. (28) hiperlipemide Faktör VII ve Faktör IX aktivasyonunda artış olduğu halde, Faktör XII aktivasyonunda benzer artışın olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, Faktör XI ve Faktör IX eksik hastaların postprandial Faktör VII aktivasyonunda artış olmadığını fakat Faktör XII eksik hastalarda postprandial Faktör VII aktivasyonunda artış olduğunu göstermişlerdir. Bu in vivo çalışmalar hemostatik sistem proteinlerinin lipitlerle ilişkisini düşündürmüştür. Mayer ve ark. (29) plazma lipoproteinlerinden özellikle çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL)'nin in vivo olarak DF ve Faktör VII aktivitesini başlattığını, protrombinaz kompleksinin fonksiyonlarını da hızlandığını bildirmişlerdir. Plazmadaki Faktör VII'nin koagulan aktivitesinde, triaçilgliserollerden zengin şilomikron ve VLDL arasında pozitif korelasyon olduğu (30), benzer şekilde vitamin K'ya bağımlı koagülasyon proteinleri ile, plazmadaki VLDL arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (31). Periferdeki mononükleer hücrelerin prokoagulan aktivitelerinin olduğunu ve VLDL'nin bu hücrelerin prokoagulan aktivitesini ortaya çıkardığını, DF'nin de bunlardan biri olduğunu gösteren çeşitli çalışmalar vardır (32,33).

Aterom plaklarında proinflamatuar sitokinlerin varlığı, gözleri ateroskleroz ve inflamasyon konularına çevirmiştir. Bu noktadan bakıldığında DF'nin proinflamatuar bir ajan olup olmadığı sorusu gündeme gelmiş ve araştırmacılar

DF'nin proinflamatuvar sitokinlerle ilişkisini incelemeye başlamışlardır (21).

Bokarewa ve ark. (21) DF'nin güçlü bir inflamatojenik ajan olduğu bunu da, monosit ve içindeki kemokinleri salgılatarak yaptığını bildirmişlerdir. Damar endotelinde gerçekleşen bu olaylar endotel disfonksiyonuna neden olacaktır. Bu istenmeyen olaylar esnasında damar içinde oksidatif stresin de gelişmesi mümkündür. Bütün bu gelişmeler, kandaki kolesterolün oksidasyonu ve oksidlenmiş kolesterolün de bozulmuş endotelden kolayca endotelin altına kaçması ve aterosklerotik plağın oluşumunun hızlanmasının mümkün olacağı günümüzde üzerinde durulan konular arasındadır.

Burada önemli olan zincirin üçüncü halkası olarak kabul edebileceğimiz lipid birikiminin nasıl meydana geldiği ve koagülasyon, inflamasyon ile ilişkisinin nasıl olduğunun anlaşılmasıdır. Bütün bu bilgiler dikkate alındığında, bir membran proteini olan DF'nin hiperlipidemi modelinde kanda ve dokuda nasıl bir değişim gösterdiği ateroskleroz patogenezinde önemli bir bulgudur.

Biz bu bilgilerin ışığı altında yaptığımız çalışmada, kısa süreli hiperlipidemide kandaki DF değerinin kontrol grubuna göre arttığını gördük. Apo-B ile immünize ettiğimiz grupta hiperlipidemik grup baz alındığında bir farklılık görülmemiştir. Yani antijen olarak verdiğimiz Apo-B bir değişim sağlamamıştır. Karaciğer dokusunda ölçtüğümüz DF aktivitesi artarak kandaki DF miktarına paralellik göstermiştir, Apo-B ile immünize ettiğimiz hayvanlarda ise sonuç değişmemiştir.

Sonuçlarımız değerlendirildiğinde hayvanlarda kontrol grubuyla kıyaslandığında kısa sürede anlamlı olarak hiperlipidemi ve hiperkoagülasyon geliştiği düşünülür. Hiperlipidemik yem ile beslenen hayvanlara Apo-B konjugatı verilmesi ile LDL kolesterol miktarında azalma, diğer lipid fraksiyonlarında artma görülmüştür. Burada Apo- B konjugatı vermemizin nedeni, LDL fraksiyonunda büyük oranda bulunan bu proteini vererek immün sistemi harekete geçirdiğimizde sonuçların nasıl etkileneceğini görmektir.

Yapılan çalışmalar aterojenizde immün sistemin önemli olduğunu bildirmektedir. Bu nedenle immünolojik reaksiyonları başlatacak güçlü antijenlere dikkat çekilmiştir. Isı şok proteini (HSP-65) ile immünize edilmiş C57BL/6J fare-

lerde yağlı çizgi oluşumu hızlanmıştır (9).

Bizim çalışmamızda başlangıçta ve 7. günde hayvanlara enjekte ettiğimiz Apo-B'nin farklı parametrelerde farklı sonuçlar vermesinin bu mekanizma içinde çeşitli nedenleri olabilir. Bunlardan biri, aterosklerozun en belirgin özelliği lipidlerin arter duvarında birikmesi ile karakterize çok yönlü bir süreç olmasıdır. Bu birikime mononükleer hücre infiltrasyonu ve düz kas hücrelerinin proliferasyonu da eşlik eder. Aterosklerotik lezyonun çeşitli safhalarında T hücrelerinin ve immünglobülinlerin bulunmasından dolayı bu oluşumda immün sistemin de etkili olduğu kabul edilmektedir. Fakat bizim verdiğimiz antijenin sonuçlara etkisinin değerlendirilmesi için çok daha detaylı bir çalışma yapılması gerekmektedir.

Sonuç olarak; ateroskleroz gelişiminin ilk basamağı olan endotel disfonksiyonuna neden olan sebepler sadece alternatif yol ile intimada oksitlenmiş LDL birikimi değildir. Pek çok olaylar zinciri endotel bozukluğuna neden olur. Kanda olduğu gibi monosit ve makrofajlarda DF bulunması, bu alanda T hücrelerinin ve proinflamatuvar sitokinlerin görünmesi gibi olaylar endotel fonksiyonunun bozulmasının nedenleri arasındadır. Bu nedenle Apo-B antijeni verilmesi ile LDL-C ile birlikte DF değerinde meydana gelen değişimler, ateroskleroz patogenezi yönünden dikkate alınması gereken bulgulardır.

Hiperlipidemide kullanılan hipolipidemik ilaçlar ateroskleroza yol açan risk faktörlerinden biri olan yüksek kolesterolü tedavi etmektedir. Ancak aterosklerozun sebep olduğu kalp damar hastalıklarının nedeni, yukarıdaki kısaca değinildiği gibi, sadece yüksek kolesterol değildir. Ateroskleroz ve ona bağlı komplikasyonların önlenmesi için, bu çalışmada tartıştığımız noktalara bir bütün halinde bakılmasının ve bizim yaptığımız bu kısa süreli hiperlipidemiden elde ettiğimiz sonuçların dikkate alınarak eksik yönlerinin tamamlanması ve tedavi stratejisinde kullanılabilir hale gelmesinin uygun olacağını düşünmekteyiz.

Teşekkür

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-YLP-310510-0176 No'lu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Ulutin ON. The relationship of haemostatic system to the vessel wall, thromboembolism, atherosclerosis from pathogenesis and laboratory standpoints *Turk J Haematol* 2002; 19: 7-29.
2. Emekli N. Hemostatik sistemin dünü ve bugünü. İçinde: Temel ve Uygulamalı Biyokimya sayfa.445-458, 4. Baskı, Akademi Matbaası, İstanbul, Marmara Yayınları, 2006.
3. Libby P, Theroux P. Pathophysiology of Coronary Artery Disease. *Circulation* 2005; 111: 3481-3488.
4. Emekli N. Koagülasyon ve İnflamasyon. Tromboz Hemostaz ve Anjiyoloji Kongre Kitabı Editör Orhan N. Ulutin, sayfa 69-77, İkite Matbaacılık Hizmetleri, İstanbul, 2004.
5. Ding L, Ma Wanahu, Littmann T, Camp R, Shen J. The PFY2 nucleotide receptor mediates tissue factor expression in human coronary artery endothelial cells. *JBC* 2011; 235176:1-20.
6. Handsson GK: Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Eng J Med.* 2005; 352: 1685-1695.
7. Emekli-Alturfan E, Başar I, Malalı E, Elemek E, Oktay S, Ayan F, Emekli N, Noyan U. Plasma tissue factor levels and salivary tissue factor activities of periodontitis patient with and without cardiovascular disease. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 2009; 37(2-4):77-81.
8. Andrea DD, Ravera M, Golino P, Rosica A, Felice M, Raagni M, Cirillo P, Vigorito F, Corcione N, Tommasini P, Gargiulo A, Piro O, Calabro, Chiariello M. Induction of tissue factor in the arterial wall during recurrent thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23: 1689-1694.
9. George J, Shoenfeld Y, Afek A, Gilburd B, Keren P, Shanish A, Kopolovic J, Wick G, Harats D. Enhanced fatty streak formation in C57BL/6J Mice by immunization with heat shock protein-65. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:505-510.
10. Yarat A. Sepsis ve doku faktörü.7.Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongre Kitabı. Editör. Orhan N. Ulutin, Sayfa 375-393, İkite Matbaacılık, İstanbul, 2007.
11. Reganon E, Vila V, Martinez – Sale V, Vaya A, Aznar J. Inflammation, fibrinogen and thrombin generation in patients with previous myocardial Rinfarction. *Haematologica* 2002; 87:740-745.
12. Sebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002; 300:729-735.
13. Koba S, Tanaka H, Maruyama C, Tada N, Birou S, Teramoto T, Sasaki J. Physical activity in the Japan population: association with blood lipid levels and effects in reducing cardiovascular and all-cause mortality. *J Atheroscler Thromb.* 2011; 18(10):833-45.
14. Emekli N. Biochemical Aspects of Haemostasis. In:Basic and Applied Biochemistry. Sayfa:341-417, Marmara Üniversitesi Yayınları No.556, Dişhekimliği Fakültesi Yayın No.3. İstanbul, 1994.
15. Day SM, Reeve JI, Pederson B, Farris DM, Myers DD, Im M, Wakelfield TW, Mackman N, Fay WP . Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from primarily from the blood vessel wall. *Blood* 2005; 105:192-198.
16. Bochli E. Historical review: History of tissue factor. *Br J Haematol.* 2000; 110:248-255.
17. Yarat A. Tromboplastik Aktivite. IV. Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongre Kitabı. Editör Orhan N. Ulutin , sayfa 97-105, May Matbaacılık Lt.Şti. İstanbul, 2003.
18. Tunalı T, Yarat A, Bulut M, Emekli N. 6,7-Dihydroxy-3-phenylcoumarin inhibits thromboplastin induced disseminated intravascular coagulation. *Br J Haematol.* 2004; 126(2): 226-30.
19. Emekli NB, Ulutin ON. Some properties of autoprothrombin II-A anticoagulant, *Recent Progress in Blood Coagulation and Thrombosis Research.* Biblioth Haem. 1978; 44:15.
20. Mackman N, Taubman M. Tissue factor: past, present and future. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:1986-1988.
21. Bakarewa MI, Morrissey JH, Tarkowski A. Tissue factor as a proinflammatory agent. *Arthritis Res.* 2002; 4:190-195.
22. Fregula CF, Marchese P, Gruber A, Ruggeri ZM, Ruf W. P2X7 receptor signaling contributes to tissue factor-dependent thrombosis in mice. *J Clin. Invest.* 2000; 7:2932-2944.
23. Roselar SE, Schonfeld G, Daugherty A, Enhanced development of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits by suppression of cell mediated immunity. *J Clin Invest.* 1995; 96:1389-94.
24. Hulthe J, Wiklund O, Camejo HE, Bondjers G. Antibodies to oxidized LDL in relation to carotid atherosclerosis, cell adhesion molecule and phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:269-274.
25. Kjalke M, Silveira A, Hamsten A, Hedner U, Ezban M. Plasma lipoproteins enhance tissue factor-independent factor VII activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:1835- 1841.
26. Butenas S, Orfeo T, Mann K. Tissue factor in coagulation: Which? Where? When?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29:1989-1996.
27. Pan Shuchong, White TA, Witt TA, Chiriac A, Mueske CS, Simari RD. Vascular directed tissue factor pathway inhibitor overexpression regulates plasma cholesterol and reduces atherosclerotic plaque development. *Circ Res.* 2009; 105:713-720.
28. Silveira A, Karpe F, Johnson H, Bauer KA, Hamsten A. In vivo demonstration in humans that large postprandial triglyceride rich lipoproteins activate coagulation factor VII through the intrinsic coagulation pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16:1333-1339.
29. Mayer MP, Tracy RP, Tracy PB, van't Veer C, Sparks CE, Mann KG. Plasma lipoproteins support prothrombinase and other procoagulant enzymatic complexes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:458-465.
30. Mitropoulos KA, Miller GJ, Reeves BEA, Wilkes HC, Cruickshank JK. Factor VII coagulant activity is strongly associated with the plasma concentration of large lipoprotein particles in middle aged men. *Atherosclerosis.* 1989; 76:203-208.
31. Xu N, Dahlback B, Ohlin AK, Nilsson A. Association of vitamin K dependent coagulation proteins and C4b binding protein with triglyceride rich lipoproteins of human plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:33-39.

32. Schwartz BS, Levy GA, Curtiss LK, Fair DS, Edgington TS. Plasma lipoprotein induction and suppression of the generation of cellular procoagulant activity in vitro. *J Clin Invest.* 1981; 67:1650-1658.
33. Wada H, Kaneko T, Wakita Y, Minamikawa K, Nagaya S, Tamaki S, Deguchi K, Shirakawa S. Effect of lipoproteins on tissue factor activity and PAI-II antigen in human monocytes and macrophages. *Int J Cardiol.* 1994; 47:521-525.