



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**PROPOLİSİN ATEROJENİK DİYETLE
BESLENEN APOE KNOCKOUT FARELERDE
ATEROSKLEROZ GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ: ADAM
PROTEAZ İNHİBİSYONU VE
ATEROSKLEROZ İLİŞKİSİ**

Ertuğrul YİĞİT

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

15.05.2023

Ertuğrul YİĞİT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	xi
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xii
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ateroskleroz	5
2.1.1. Epidemiyolojisi	5
2.1.2. Mekanizması/Patofizyolojisi	7
2.1.2.1. Aterosklerozun Başlangıcı	7
2.1.2.2. Aterosklerozun İlerleyişi	11
2.1.2.3. Aterosklerozda Komplikasyonlar	13
2.2. ADAM Enzim Ailesi	16
2.2.1. ADAM10/17 İnflamasyon ve Ateroskleroz İlişkisi	18
2.3. Propolis	20
2.3.1. Propolisin Kimyasal İçeriği ve Sağlık Üzerine Etkileri	21
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1. Gereç	24
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	24
3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler	25
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	25
3.2. Yöntemler	26

3.2.1. Propolis İçeriğindeki Başlıca Polifenol/Flavanoidlerin ADAM10/17'ye Yönelik İnhibitör Etkinliğinin Moleküler Eşleşme Yöntemiyle İn Silico Araştırılması	26
3.2.2. Sulu Propolis Ekstraktının Hazırlanışı	27
3.2.3. Etanollü Propolis Ekstraktının Hazırlanışı	27
3.2.4. GW280264X'in Hazırlanışı	27
3.2.5. Çalışma Grubu	27
3.2.6. Deneysel Ateroskleroz Modelinin Oluşturulması	28
3.2.7. Numunelerin Toplanması	29
3.2.8. Serumda Rutin Biyokimya Parametrelerinin Ölçümü	29
3.2.9. Serum İnterlökin 1-Beta (IL-1 β) Seviyelerinin Belirlenmesi	30
3.2.10. Serum Paraoksanaz-1 (PON-1) Seviyelerinin Belirlenmesi	30
3.2.11. Serum Fosfolipaz-A2 (PLA-A2) Seviyelerinin Belirlenmesi	31
3.2.12. Aort Dokusu Tümör Nekroz Faktör-Alfa (TNF- α) Seviyelerinin Belirlenmesi	32
3.2.13. Aort Dokusu İnterferon-Gama (IFN- γ) Seviyelerinin Belirlenmesi	33
3.2.14. Aort Dokusu İnterlökin-6 (IL-6) Seviyelerinin Belirlenmesi	34
3.2.15. Aort Dokusu İnterlökin-12 (IL-12) Seviyelerinin Belirlenmesi	35
3.2.16. Aort Dokusu Miyeloperoksidaz (MPO) Seviyelerinin Belirlenmesi	36
3.2.17. Aort Dokusu İnterlökin-10 (IL-10) Seviyelerinin Belirlenmesi	37
3.2.18. Aort Dokusu ADAM10 Aktivitesinin Ölçülmesi	38
3.2.19. Aort Dokusu ADAM17 Aktivitesinin Ölçülmesi	39
3.2.20. Aort Dokusu Homonejatında Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	40
3.2.21. Histolojik Analizler	40
3.2.22. İstatistiksel Analiz	49
4. BULGULAR	50
4.1. İn Silico Bulgular	50
4.2. Deney Gruplarının Ağırlıklar Değerleri	53
4.3. Biyokimyasal Bulgular	54
4.3.1. Serum Rutin Biyokimya Parametrelerinin Seviyeleri	54
4.3.2. Serum IL-1 β Seviyeleri	56
4.3.3. Serum PON-1 Seviyeleri	57
4.3.4. Serum PLA2 Seviyeleri	58

4.3.5. Aort Dokusu TNF- α Seviyeleri	59
4.3.6. Aort Dokusu IFN- γ Seviyeleri	60
4.3.7. Aort Dokusu IL-6 Seviyeleri	61
4.3.8. Aort Dokusu IL-12 Seviyeleri	62
4.3.9. Aort Dokusu MPO Seviyeleri	63
4.3.10. Aort Dokusu IL-10 Seviyeleri	64
4.3.11. Aort Dokusu ADAM10 Aktivitesi	65
4.3.12. Aort Dokusu ADAM17 Aktivitesi	66
4.4. Histolojik Bulgular	67
4.4.1. Aortik Kök Dokusu Histolojik Bulgular	67
4.4.2. Karaciğer Dokusu Histolojik Bulgular	76
4.4.3. Kalp Dokusu Histolojik Bulgular	85
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	92
6. KAYNAKLAR	108
EKLER	137
EK 1. Etik Kurul Onayı	138
EK 2. Özet Grafik	139
ÖZGEÇMİŞ	140

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Kullanılan cihazlar ve malzemeler	24
Tablo 2. Kullanılan ticari kitler	25
Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler	25
Tablo 4. Çalışma grupları	28
Tablo 5. Histolojik doku takip aşamaları	42
Tablo 6. İmmün boyama prosedürü	43
Tablo 7. Karaciğer histopatolojik hasar skorlaması	45
Tablo 8. Amerikan patoloji derneğinin aterom plak patoloji skorlaması	46
Tablo 9. Aort histopatolojik hasar skorlaması	47
Tablo 10. Kalp dokusunun histopatolojik skorlaması	48
Tablo 11. İmmünopozitif hücrelerin semi-kantitatif skorlaması	48
Tablo 12. <i>in silico</i> bulgular	51
Tablo 13. Serum rutin biyokimya parametrelerinin seviyeleri	55
Tablo 14. Aortik kök histopatolojik hasar skorlaması bulguları	67
Tablo 15. Sortilin ve ADAM10 primer antikoru ile inkübe edilen aortik kök dokusu immünopozitivite skorlama bulguları	67
Tablo 16. Karaciğer histopatolojik hasar skorlaması bulguları	76
Tablo 17. Sortilin ve ADAM10 primer antikoru ile inkübe edilen karaciğer dokusu immünopozitivite skorlama bulguları	76
Tablo 18. Kalp histopatolojik hasar skorlaması bulguları	85
Tablo 19. Sortilin ve ADAM10 primer antikoru ile inkübe edilen kalp dokusu immünopozitivite skorlama bulguları	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	2016 yılı dünya ölüm oranları	6
Şekil 2.	Ateroskleroz'un başlangıcı	9
Şekil 3.	Ateroskleroz'un ilerleyişi	12
Şekil 4.	Proteolitik aktiviteye sahip adam proteazların yapısı	17
Şekil 5.	Propolis ekstraktındaki başlıca polifenol ve flavanoidler	23
Şekil 6.	İnterlökin 1-beta (IL-1 β) standart grafiği	30
Şekil 7.	Paraoksanaz-1 (PON-1) standart grafiği	31
Şekil 8.	Fosfolipaz-A2 (PLA2) standart grafiği	31
Şekil 9.	Tümör nekroz faktör- α (TNF- α) standart grafiği	32
Şekil 10.	İnterferon-gama (IFN- γ) standart grafiği	33
Şekil 11.	İnterlökin-6 (IL-6) standart grafiği	34
Şekil 12.	İnterlökin-12 (IL-12) standart grafiği	35
Şekil 13.	Miyeloperoksidaz (MPO) standart grafiği	36
Şekil 14.	İnterlökin-10 (IL-10) standart grafiği	37
Şekil 15.	ADAM10 aktivitesi standart grafiği	38
Şekil 16.	ADAM17 aktivitesi standart grafiği	39
Şekil 17.	BCA standart grafiği	40
Şekil 18.	Kampferolün ADAM10 ile etkileşimi	50
Şekil 19.	Galanginin ADAM17 ile etkileşimi	52
Şekil 20.	Deney gruplarının ağırlıkları	53
Şekil 21.	Serum IL-1 β seviyeleri	56
Şekil 22.	Serum PLA2 seviyeleri	57
Şekil 23.	Serum PON-1 seviyeleri	58
Şekil 24.	Aort dokusu TNF- α seviyeleri	59
Şekil 25.	Aort dokusu IFN- γ seviyeleri	60
Şekil 26.	Aort dokusu IL-6 seviyeleri	61
Şekil 27.	Aort dokusu IL-12 seviyeleri	62
Şekil 28.	Aort dokusu MPO seviyeleri	63
Şekil 29.	Aort dokusu IL-10 seviyeleri	64
Şekil 30.	Aort dokusu ADAM10 aktivitesi kinetik ölçüm sonuçları	65



RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	Propolisin ham ve toz hali	21
Resim 2.	Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanmış aortik kök dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi	68
Resim 3.	Oil Red O ile boyanmış ve kriyostat yöntemi ile elde edilen aortik kök dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi	70
Resim 4.	Sortilin primer antikoru ile inkübe edilmiş aortik kök kesitlerinin temsili ışık mikroskopik resmi	72
Resim 5.	ADAM10 primer antikoru ile inkübe edilmiş aortik kök kesitlerinin temsili ışık mikroskopik resmi	74
Resim 6.	Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanmış karaciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi	77
Resim 7.	Oil Red O ile boyanmış ve kriyostat yöntemi ile elde edilen karaciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi	79
Resim 8.	Sortilin primer antikoru ile inkübe edilmiş karaciğer kesitlerinin temsili ışık mikroskopik resmi	81
Resim 9.	ADAM10 primer antikoru ile inkübe edilmiş karaciğer kesitlerinin temsili ışık mikroskopik resmi	83
Resim 10.	Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanmış kalp dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi	86
Resim 11.	Sortilin primer antikoru ile inkübe edilmiş kalp kesitlerinin temsili ışık mikroskopik resmi	88
Resim 12.	ADAM10 primer antikoru ile inkübe edilmiş kalp kesitlerinin temsili ışık mikroskopik resmi	90

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ACE2	Anjiyotensin dönüştürücü enzim-2
ADAM	Disintegrin ve metalloproteaz
ADAMTS	Disintegrin ve metalloproteaz trombospondin motif
ALT	Alanin transaminaz
ApoB	Apolipoprotein-B
ApoE	Apolipoprotein-E
AST	Aspartat transaminaz
BKİ	Beden Kütle İndeksi
BCA	Bikinkoninik Asit
BUN	Kan üre azotu
CHIP	Belirsiz potansiyelin klonal hematopoezi
CRP	C Reaktif Protein
DC	Dendritik Hücre
DII	Delta benzeri ligand
DMSO	Dimetil sülfoksit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EC	Endotel hücre
ECAM-I	Epitel hücre adhezyon molekülü-1
EGFR	Endotelyal büyüme faktörü reseptörü
EPCR	Endotelyal protein c reseptörü
EPE	Etanollü propolis ekstraktı
ERK	Ekstraselüler kinaz
GEF	Guanin nükleotid değişim faktör
Glu	Glukoz
GW	GW280264X
Hb-EGF	Heparin bağımlı endotelyal büyüme faktörü
HDL-K	Yüksek yoğunluklu lipoprotein-kolesterol
ICAM-I	İntraselüler adhezyon molekülü-1
IFN-γ	İnterferon-gama
IL-10	İnterlökin-10

IL-12	İnterlökin-12
IL-1β	İnterlökin-1beta
IL-6	İnterlökin-6
IL-6R	İnterlökin-6 reseptörü
i.p.	İntraperitoneal
K	Kontrol
KLFs	Krüppel benzeri faktör
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
KVH	Kardiyovasküler hastalıklar
LDL-K	Düşük yoğunluklu lipoprotein-kolesterol
LDLr	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPS	Lipopolisakkarit
LRP	LDL Reseptör ilişkili protein
MMP-3	Matriks metalloproteaz-3
MMP-9	Matriks metalloproteaz-9
MPO	Miyeloperoksidaz
NETs	Nötrofil hücre dışı tuzakları
NF-KB	Nükleer faktör-kappa b
NO	Nitrik oksit
PBS	Fosfat tuz tamponu
PCSK9	Proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 9
S	Sham
SPE	Sulu propolis ekstraktı
SREBP-1	Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein-1
SREBP-2	Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein-2
TG	Trigliserit
TIMP-1	Doku metalloproteaz inhibitörü-1
TIMP-3	Doku metalloproteaz inhibitörü-3
TK	Total kolesterol
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptör
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α
TÜİK	Türkiye istatistik kurumu

TRAF-6	TNFR ilişkili faktör-6
V	Vaka
VCAM-I	Vasküler hücre adhezyon molekülü-1
VSMC	Vasküler düz kas hücresi

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μ	Mikro
n	Nano
%	Yüzde
°C	Derece santigrat
L	Litre
U	Ünite
Å	Angström

Formüller

H₂O	Su
HOCl	Hipokloröz asit
C₂₈H₄₁N₅O₆S	GW280264X
O₂⁻	Süperoksit Anyonu
NO	Nitrit Oksit
NO₃⁻	Peroksinitrit

ÖZET

Propolisin Aterojenik Diyetle Beslenen ApoE Knockout Farelerde Ateroskleroz Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi: ADAM Proteaz İnhibisyonu ve Ateroskleroz İlişkisi

Kronik inflamatuvar bir süreç olan aterosklerozda, ADAM (a disintegrin and metalloprotease) enzim ailesi üyelerinden, ADAM10 ve ADAM17'nin önemli rol oynadığı bilinmektedir. En çok tüketilen doğal ürünler arasında yer alan propolisin yapısındaki birçok flavanoid ve polifenol sayesinde antiinflamatuvar aktivite gösterdiği bilinmektedir. Ancak propolisin ADAM10/17 gibi inflamatuvar sürece direkt etkisi olan iki enzimin aktivitesi üzerine etkisi bilinmemektedir. Bu nedenle çalışmamızda deneysel ateroskleroz modeli oluşturarak hem bu enzimlerin inhibisyonunu hemde inhibisyonun ateroskleroz sürecine olan etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmamızda kontrol (K) ve sham (S) gruplarında C57BL-6J fareler (n=16) kullanılırken, vaka (V), sulu propolis ekstraktı (SPE), etanollü propolis ekstraktı (EPE), GW280264X (GW-Sentetik inhibitör) ve çözücü (DMSO ve etanol) gruplarında ApoE^{-/-} fareler (n=48) kullanılmıştır. K grubu kontrol diyetle, diğer tüm gruplar yüksek kolestreollü diyet ile 16 hafta beslenmiştir. Son 4 hafta SPE (400mg/kg/gün), EPE (200mg/kg/gün) ve GW (100µg/kg/gün) intraperitoneal uygulanmıştır. Hayvanlar sakrifiye edilerek kan, karaciğer, aortik ark, aortik kök ve kalp dokuları alınmıştır. Serumda total kolesterol (TK), trigliserid (TG), glukoz (Glu) enzimatik kolorimetrik metotla ölçülürken, interlökin-1β (IL-1β), paraoksanaz-1 (PON-1) ve lipoprotein ilişkili fosfolipaz A2 (Lp-PLA2) ELISA yöntemiyle ölçülmüştür. Aort dokusunda Tümör nekroz faktör-α (TNF-α), interferon-γ (IFN- γ), miyeloperoksidaz (MPO), interlökin-6 (IL-6), interlökin-10 (IL-10) ve interlökin-12 (IL-12) seviyeleri ELISA ile ölçülürken, ADAM10/17 aktiviteleri florometrik olarak ölçülmüştür. Bunun yanı sıra aortik kök, karaciğer ve kalp dokusunda histopatolojik ve immünohistokimyasal (ADAM10 ve Sortilin) olarak incelenmiştir. SPE, EPE ve GW grubunda V grubuna göre; TK, TG, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, PLA2, MPO, ADAM10/17 aktiviteleri, plak yükü, lipid birikimi, ADAM10 ve Sortilin seviyeleri azalırken IL-10 ve PON-1 seviyelerini artırmıştır (p<0,003). Çalışmamızda propolisin, aterosklerozda inflamasyonu ve dislipidemi, ADAM10/17 inhibisyonu aracılığı ile azalttığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: ADAM10, ADAM17, ApoE^{-/-}, Ateroskleroz, Propolis

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Propolis on the Development of Atherosclerosis in ApoE Knockout Mice Fed on Atherogenic Diet: Relationship between ADAM Protease Inhibition and Atherosclerosis

ADAM10 and ADAM17, members of the ADAM (a disintegrin and metalloprotease) enzyme family, are known to play an important role in atherosclerosis, a chronic inflammatory process. Propolis, one of the most consumed natural products, is known to have anti-inflammatory activity thanks to the many flavanoids and polyphenols in its structure. However, the effect of propolis on the activity of two enzymes that have a direct effect on the inflammatory process such as ADAM10/17 is not known. We aimed this study to investigate both the inhibition of these enzymes and the effect of inhibition on the atherosclerosis process by creating an experimental atherosclerosis model. In our study, C57BL-6J mice (n=16) were used in the control (C) and sham (S) groups, while ApoE^{-/-} mice (n=48) were used in the case (C), water extract of propolis (WEP), ethanolic extract of propolis (EEP), GW280264X (GW-Synthetic inhibitor) and solvents (DMSO and ethanol) groups. Group K was fed with control diet and all other groups were fed with high cholesterol diet for sixteen weeks. WEP (400mg/kg/day), EEP (200mg/kg/day) and GW (100µg/kg/day) were administered intraperitoneally for the last four weeks. Animals were sacrificed and blood, liver, aorta, heart tissues were collected. In serum, total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were measured by enzymatic colorimetric method, while interleukin-1β (IL-1β), paraoxanase-1 (PON-1) and lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) were measured by ELISA. In aorta, tumor necrosis factor-α (TNF-α), interferon-γ (IFN-γ), myeloperoxidase (MPO), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) and interleukin-12 (IL-12) levels while measured by ELISA, ADAM10/17 activities were measured fluorometrically. Aortic root, liver and heart tissues were examined histopathologically and immunohistochemically (ADAM10 and Sortilin). In the WEP, EEP and GW groups compared to C group; TC, TG, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-12, PLA2, MPO, ADAM10/17 activities, plaque burden, lipid accumulation, ADAM10 and Sortilin levels decreased, while IL-10 and PON-1 levels increased (p<0.003). In our study, it was concluded that propolis decreased inflammation and dyslipidemia in atherosclerosis via ADAM10/17 inhibition.

Keywords: ADAM10, ADAM17, ApoE^{-/-}, Atherosclerosis, Propolis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kalp-damar hastalıklar dünyada en sık görülen, sıklığı giderek artan, en fazla ölüme sebebiyet veren hastalık grubunu oluşturmaktadır. Dünya sağlık örgütü (DSÖ) 2017 verilerine göre, 2016 yılında dünyada ölen kişilerin (~60 milyon) yaklaşık %30'u dolaşım sistemi hastalıklarından dolayı olup bu hastalık kaynaklı ölümlerin yaklaşık 7,4 milyonu koroner kalp hastalığı nedeni ile oluşurken, 6,7 milyonu inmeyle bağlantılıdır. Ülkemizde ise 2016 Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre ölümlerin (~417 bin) yaklaşık %40'ını (165 bin) dolaşım sistemi hastalıkları oluşturmakta bunların da yaklaşık %40'ını iskemik kalp hastalığı, %23'ünü ise serebro-vasküler hastalıklar oluşturmaktadır (1, 2). Bu nedenle kardiyovasküler hastalıklar ve inme en fazla araştırma yapılan alanlardan biridir. Kardiyovasküler hastalıkların etiyolojisinde başta ateroskleroz olmak üzere dislipidemi, yüksek kan basıncı, yüksek kan glukozu, artmış inflamatuvar belirteçler, oksidatif stres ve protrombotik durum gibi kardiyometabolik risk faktörleri yer almaktadır (3). Bu risk faktörleri arasında en fazla çalışılanı ise şüphesiz ki en yaygın olarak görülen ateroskleroz sürecidir.

Ateroskleroz; arterlerin tunika intima bölgesinde, lipid peroksidasyonu, endotel disfonksiyonu ve inflamatuvar medyatörler aracılığıyla, lipid ve fibröz elemanların birikimi ile damar lümeninde daralmaya ve kan akışının bozulmasına neden olan kronik inflamatuvar bir süreçtir (4, 5). Dolaşımda artan kolesterolün, subendotelyal boşlukta birikimi ve peroksidasyonu ile makrofajların intima bölgesine göçü hızlanır. İntimaya göç eden makrofajlar lipidleri temizleme aktivitesi gösterirler. Ancak artan lipid miktarı makrofajların temizleme kapasitesini aştığında makrofajlar farklılaşmaya başlayarak köpük hücre adı verilen köpüğe benzer bir hal almaktadır (6). Köpük hücrelerin aterosklerotik plak oluşumu ve gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (7).

Ateroskleroz sürecinde meydana gelen endotel disfonksiyonu ile endotel hücrelerden salınan adezyon molekülleri; [endotel lökosit adezyon molekülü (ECAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1), hücre içi adezyon molekülü (ICAM-1)], TNF- α ve bazı interlökinler gibi inflamatuvar ajanların ve kemoreaktanların etkisiyle monositlerin neointima tabakasına infiltrasyonu gerçekleşir. Bunun yanı sıra nitrik oksit (NO) aktivitesinin azalmasına bağlı olarak süperoksit anyonu (O_2^-), peroksinitrit (NO_3^-) gibi oksidanların oluşumu da artarak endotel hasarının artışına yol açmaktadır. Daha sonra tüm bu moleküllerin etkinliğiyle, trombositler ve diğer lökositlerin aterom bölgesindeki birikimi

sonucunda aterosklerotik lezyon büyümekte bunun sonucunda özellikle büyük ve orta boyutlu arterlerin lümeninde oluşan daralma; kan basıncının artmasına ve dolaşım bozukluklarına yol açtığı bildirilmiştir (8, 9). Oluşan aterosklerotik plakların koparak veya erozyona uğrayarak çevre dokularda iskemik hasara yol açabilecek trombüs oluşumuna kadar sessizce ilerlediği ortaya konmuştur (10).

Ateroskleroz sürecinde, köpük hücre oluşumu akabinde artan inflamatuvar süreçteki sitokinlerin en önemli düzenleyicisi ise ADAM proteazlarıdır. ADAM proteazları çinko (Zn^{+2}) bağımlı proteolitik aktiviteye sahip tip 1 transmembran proteinleridir. İnsan genomunda toplam 22 farklı ADAM tanımlanmış olup tanımlanan ADAM proteinlerinin yaklaşık yarısı sadece testis ve epididime spesifikken diğer yarısı hemen hemen tüm dokular tarafından sentezlenmektedir (11). ADAM enzim ailesi ektodomain olarak adlandırılan, transmembran yerleşimli proteinlerin ekstraselüler protein alanını proteolitik yolla transmembranöz yapıdan uzaklaştırılmasında görev yapar. Bu ayrılma işlemine shedding (kırılma/dökülme/budama) ismi verilir. ADAM proteaz ailesi de bu önemli fonksiyonlarından dolayı sheddazlar olarak sınıflandırılırlar (12). Ektodomain sheddazı sonrasında parçalanmış substratın aktivitesinin düzenlenmesi bir posttranslasyonel modifikasyon olup protein aktif ya da inaktif formunu kazanır (13). Tüm ADAM'lar arasında en çok çalışılan ve aydınlatılan ise ilgi çekiçi substratlarından dolayı ADAM10 ve ADAM17'dir. ADAM10 ve ADAM17'nin endotelial büyüme faktörü (EGFR) ligandlarının [Heparin bağlı-Endotelial büyüme faktörü (Hb-EGF)], çeşitli sinyal yollarının (NOTCH sinyal yolağı), çeşitli inflamatuvar ajanların; $TNF\alpha$, interlokinler ve adhezyon moleküllerinin ektodomainlerini kırıp aktif hale getirilebileceği gibi, bu ligandların reseptörlerini de sheddaz işlemiyle hem aktivasyonuna hem de inaktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (14). Son yıllarda daha çok romatoid artirit, kanser gibi çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadığı bildirilen ve aktivitelerinin inhibisyonuna yönelik çalışmaları hız kazanan ADAM10/17'nin son yapılan çalışmalarla kardiyovasküler hastalıkların temelinde yer alan ateroskleroz gelişiminde hem dislipidemi hem de inflamatuvar süreçte etkili olduğu ortaya konmuştur. Ancak bu enzimlere yönelik geliştirilen sentetik kimyasal inhibitörler çoğunlukla toksisite sorunu nedeniyle klinik kullanıma sunulamamıştır. Ayrıca sentetik ADAM10/17 inhibitörü olan GW280264X'in aterosklerotik plak oluşum sürecindeki olası etkileri de değerlendirilmemiştir.

Sentetik ilaçların oluşturduğu toksisite sorununu aşmak başta ateroskleroz olmak üzere çeşitli hastalıklar için daha etkili ama daha az yan etkiye sahip tedavilerin arayışı sürmektedir. Bu amaçla beslenme tedavisi ve besin takviyelerine olan ilgi günümüzde artmaktadır. Bu pazarın en önemli ürünlerinden biri de arı ürünleridir. Propolis, bal arılarının (*Apis mellifera*) çeşitli bitkilerden topladığı polifenolce zengin, bitki türüne göre renk değiştiren ve yoğun bir aromatik kokuya sahip reçineli bir maddedir (15). Propolisin kimyasal bileşimi, bitki türünün yapısındaki reçine ve balzama göre değişir. Yapısında 300'den fazla kimyasal bileşen tanımlanmış olan propolisin yaklaşık %50'sini reçine ve balzam geri kalanını mumlar, uçucu ve aromatik yağlar, polen ve safsızlık içeren kompleksler oluşturur. Propolis muhteviyatındaki bileşenleri sayesinde; antiinflamatuvar, antioksidan, antiaterojenik ve immün sistemi uyarıcı etkilere sahiptir. Propolis, güçlü farmakolojik özellikleri ve düşük toksisitesi nedeniyle hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde, apiterapi dahil popüler ve tamamlayıcı tıpta uzun zamandan beri kullanılmaktadır (16-19). Propolisi oluşturan bileşenler daha çok etanol, metanol gibi çözücülerle, saf suda çözünmüş halinden daha yüksek biyolojik aktivite gösterdiği yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (20). Fakat son yıllarda oldukça popüler olan propolisin canlı için toksik olmayan bir çözücü olan su ile ekstrakte edilmesi ve bu şekilde kullanılması konusunda birçok çalışma mevcuttur (21, 22). Literatürde propolis muhteviyatında bulunan pinosembtrin flavonoidinin, makrofajlarda liposakkarit (LPS) indüklü aktivitesi artan matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9)' un hem gen ekspresyonu hem de jelatinolitik aktivitesi üzerine inhibe edici etkisi olduğu gösterilmiştir (23). ADAM proteazların MMP ve ADAMTS (a disintegrin and metalloprotease trombospondin) ile ortak substrat ve inhibitör etkinliği bilindiği için propolisin muhteviyatında bulunan bir çok bileşiğin ADAM10/17'ye yönelik inhibitör etkinliği değerlendirilebilir.

Deneyisel ateroskleroz modeli oluşturmak oldukça zorlu bir süreç olmakla birlikte bu amaçla kullanılan çeşitli hayvan modelleri mevcuttur. Apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) fareler yıllardır bu amaçla kullanılan transgenik hayvan modelidir. Bu nedenle çalışmamızda ApoE^{-/-} farelerde yüksel kolesterolli diyetle birlikte ateroskleroz modeli oluşturulması planlanmıştır.

Tüm bu bilgiler ışığında; ApoE^{-/-} farelerde yüksek kolesterolli diyet ile ateroskleroz modelinin oluşturulması, ADAM10/17 inhibisyonunun ateroskleroz gelişimi üzerine etkilerinin biyokimyasal ve histolojik olarak araştırılması, propolisin sulu ve etanolü

ekstraktlarının hem ateroskleroz gelişimi üzerine etkilerinin biyokimyasal ve histolojik olarak değerlendirilmesi hem de ADAM10/17 enzimlerine yönelik olası inhibitör etkinliklerinin *in silico* ve *in vivo* olarak araştırılması, amaçlanmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda 5 temel hedef belirlenmiştir; çalışmada kullanılan propolisin muhteviyatında bulunan başlıca bileşiklerin ADAM10/17'ye yönelik inhibitör etkilerinin *in silico* olarak değerlendirilmesi, 6-8 haftalık ApoE^{-/-} farelerin yüksek kolesterolü diyet ile günlük 4-6 g/gün/fare olacak şekilde 16 hafta boyunca beslenmesi, köpük hücre oluşumunu takiben (12. haftadan itibaren) son 4 hafta boyunca hergün; 400 mg/kg sulu propolis, 200 mg/kg etanolü propolis ve 100µg/kg GW280264X intraperitoneal enjeksiyon ile uygulanması, elde edilen serum ve doku örneklerin aterojenik ve antiaterojenik biyobelirteçlerin biyokimyasal ve histolojik olarak incelenmesi, elde edilen doku örneklerinde propolis ekstraktlarının ADAM10/17 aktivitesine olan etkilerinin değerlendirilmesi, hedeflenmiştir.

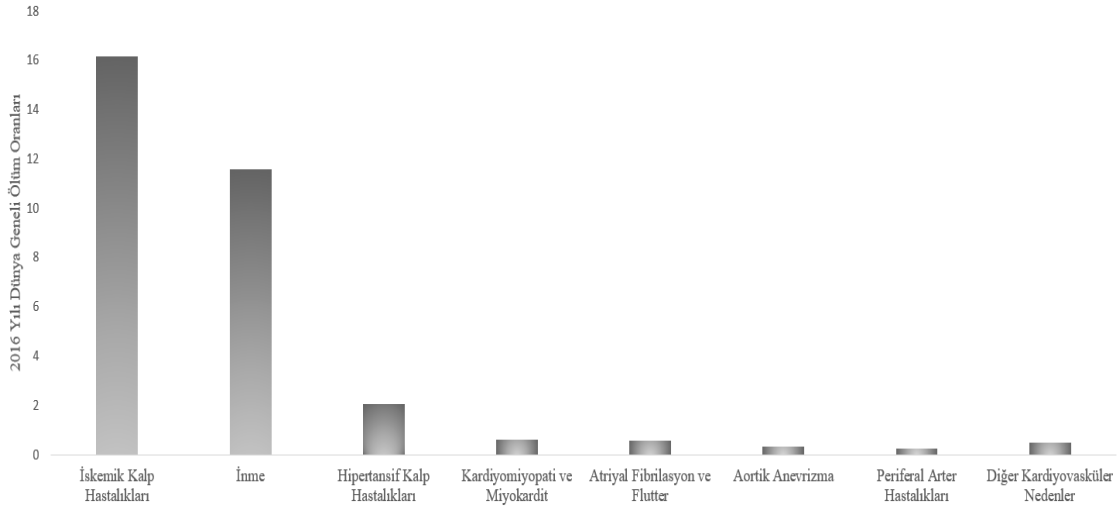
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz; arterlerin en iç tabakası olan intima bölgesinde ki lipid ve/veya fibröz elemanların birikimini ifade eder. Ateroskleroz kelimesinin kökeni aterosklerotik plağın (veya ateromun) lipid içeriğinin benzetildiği, yunancada yulaf veya lapa anlamına gelen kelimedenden türetilmiştir. Zaman geçtikçe aterosklerotik plakta daha fibröz bir yapı ile kalsiyum miktarında artış gözlenir. Gelişimini sürdüren aterosklerotik plaklar arter lümeninde kan akışını engelleyerek doku iskemisine yol açabilirken kimi zamanda kan akışını sınırlayacak kadar gelişemeyen ateromlar damar lümeninde bir trombüs oluşumuna neden olarak daha çok akut ikincil bir yol olan iskekiye neden olabilir. Ateroskleroz kaynaklı kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında ölüm nedenlerinin başında yer almaktadır. Ateroskleroz birçok iskemik inme ve geçici serebral iskemik ataklara neden olur. Abdominal aortta oluşan ateromlar ise daha çok anevrizmaya neden olmaktadır, periferik arterlerde gelişen ateromlar ise daha çok uzuv canlılığını tehlikeye götüren kangren gibi durumlara neden olabilir.

2.1.1. Epidemiyolojisi

Kardiyovasküler hastalıklar olarak adlandırılan koroner kalp hastalığı, hipertansiyon ve inme küresel ölümlerin bir numaralı nedenidir. Dünya’da 2015 yılında Kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümlerin 17 milyondan (7,4 milyonu koroner kalp hastalığı, 6,7 milyonu inme) fazla olduğu ve bu sayı tüm ölüm nedenleri arasında %31’lik olarak en büyük orana sahiptir. Kalp hastalığı, daha çok koroner arterlerde gelişen ateromlar ve inme Amerika’da ölümlerin en büyük iki nedenidir. ABD’de yapılan bir araştırma sonucunda 20 yaşın üzerinde ki bireyler arasında, erkeklerin %37,4’ü ve kadınların %35,9’u bir çeşit kardiyovasküler hastalığa sahip olduğu ve erkeklerin kardiyovasküler hastalığa bağlı ölüm oranının %50,6 olduğu belirtilmiştir. Kardiyovasküler hastalığa sahip erkek bireylerin, %37,7’sini hispanik olmayan beyaz, %46’sını hispanik olmayan siyahlar oluştururken hispaniklerin oranı %31,3 olarak belirlenmiştir. Kadınlarda ise bu oranlar sırasıyla %35,1, %47,7 ve %33,3 olarak belirlenmiştir (1, 24).



Şekil 1. 2016 yılı dünya ölüm oranları (DSÖ'den, 1)

ABD’de uzun zamandır yükselmiş düşük yoğunluklu lipoprotein kolestrole (LDL-K) karşı tedavi uygulanıyor olsa da, ABD Ulusal Sağlık ve Beslenme kurumunun yapmış olduğu anketler sonucunda; 10 yıllık sürede genel nüfusta yüksel LDL-K prevalansında önemli ölçüde değişiklik gözlenmemiştir. Ek olarak yüksek LDL-K’a karşı tedavi gören bazı bireylerin LDL-K seviyelerinde bir miktar azalış olsa da çalışma süresince tekrar yükselişe geçtiği belirtilmiştir (25).

Küresel olarak, kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölümlerin %75’ten fazlası düşük ve orta gelirli ülkede meydana gelmektedir. Bu ülkelerde bireylerin etkili ve adil sağlık hizmetinden daha az faydalandığı düşünüldüğünde, başta kardiyovasküler hastalıkları ve diğer bulaşıcı olmayan hastalıkların erken teşhisinden ve tedavisinden mahrum oldukları bildirilmektedir. Ayrıca kardiyovasküler hastalıklar düşük, orta ve yüksek gelirli ülkelerde erken ölüm nedeni olarak özellikle gelişmekte olan ülkelerin ekonomilerine büyük bir darbe vermektedir. Her ne kadar iskemik kalp hastalıkları dünya çapında erken yetişkin ölüm nedenlerinin başında gelsede son yıllarda gelişen teşhis ve tedavi yöntemleriyle ciddi bir azalış eğilimindedir. Ancak bu gelişmeler tüm populasyonlar için eşit olarak geçerli değildir. Örneğin yüksek gelirli bir ülke olan Birleşik Krallık’ta, 1950 yılında 35-69 yaş aralığındaki erkeklerin ölüm oranı %22’yken 2010’da bu oran %6’ya düşmüştür. Bununla birlikte küresel hastalık yükü araştırmaları ise düşük ve orta gelirli ülkelerde bu düşüşün olmadığı tahmin edilmektedir. İnme kaynaklı ölümlerde azalış olsa da bazı ülkelerde özellikle Doğu Avrupa’da ve Asya’da ölüm oranlarında hala artış bildirilmektedir. Bu sonuçlarda inme’ye

bağlı ölümlerde gerçekleşen azalmanın popülasyonun davranışsal olarak risk faktörlerinden (tütün kullanımı, sağlıklı beslenme, obezite, fiziksel hareketsizlik, yüksek alkol kullanımı gibi) kaçınmasına bağlı olarak açıklanmaktadır (26, 27).

2.1.2. Mekanizması/Patofizyolojisi

Aterosklerozun patogenezi; başlangıç, ilerleme ve komplikasyonlar olmak üzere üç aşamada açıklanır.

2.1.2.1. Aterosklerozun Başlangıcı

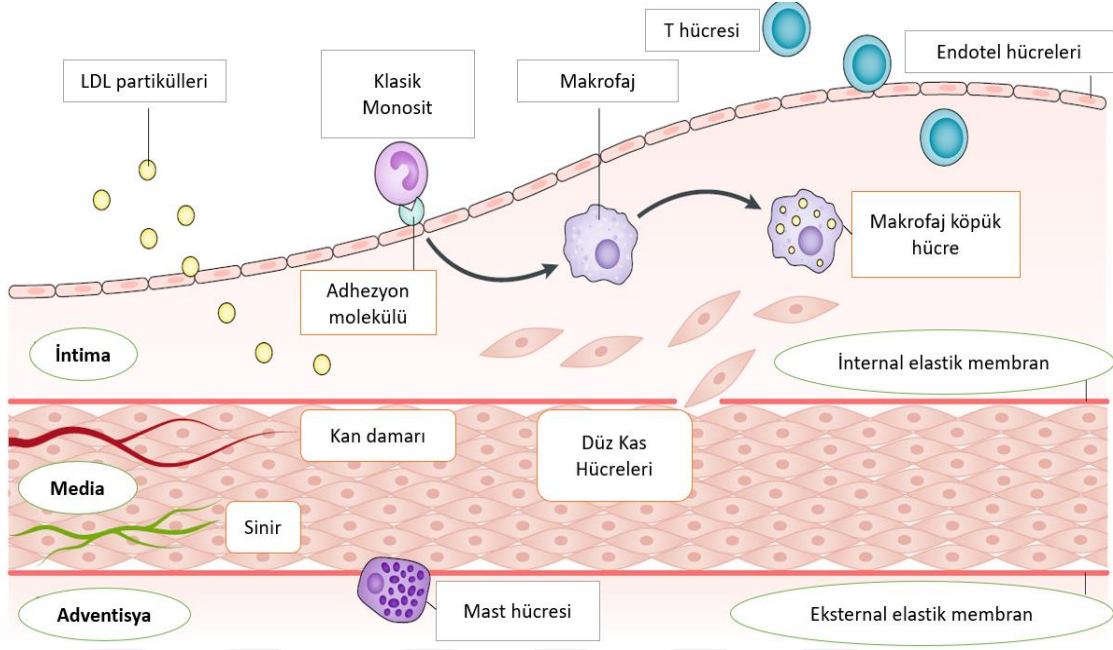
LDL Kolesterol ve Ateroskleroz ilişkisi

Kolesterol açısından zengin, apolipoprotein B (ApoB)'nin yanı sıra bir fosfolipid tabakayla sarılmış bu küresel lipid paketleri, suda çözünmeyen kolesterolü sistemik dolaşımda taşımakla görevlidir. LDL-K seviyeleri fizyolojik ihtiyacın (10-20 mg/dL) üzerine çıkmadıkça muhtemelen ateroskleroz süreci başlamayacağı bildirilmiştir. Filogenetik, karşılaştırmalı popülasyon çalışmaları ve farmakolojik müdahale araştırmaları sonucunda, sağlıklı bir yaşam için LDL-K konsantrasyonunun 20-30 mg/dL (yaklaşık 0,5-0,8 mmol/L) aralığında bulunmasının yeterli olduğu belirtilmektedir (28-31). Kolesterol seviyelerinin düşürülmesine yönelik seküler eğilimlere rağmen, günümüz çağdaş toplumların çoğunda kolesterol seviyeleri, organizmanın ihtiyacından çok daha yüksek ve bu durum ateroskleroz gelişmesine neden olmaktadır (32, 33). Bir arterin yıllar içinde LDL-K'ye kümülatif maruziyeti, hastalığın başlaması ve ilerlemesinin başlıca belirleyicisi olmaya devam etmektedir (34). Ailesel hiperkolesterolemili hastaların bu kümülatif LDL-K yükü eşğine erken yaşlarda ulaştığı ve erken aterosklerotik KVH geliştirdiği gözlemi, LDL'nin aterosklerozdaki nedensel rolünü desteklemektedir (35). Öte yandan, proprotein konvertaz subtilisin/keksin tip 9 (PCSK9) fonksiyon kaybı mutasyonlarına sahip bireyler, LDL reseptörlerinin katabolizmasının azalması nedeniyle yaşam boyu düşük LDL-K konsantrasyonlarına sahiptir ve koroner olaylarda statin tedavisine göre daha büyük bir azalma gösterirler (36). Yıllarca süren araştırmaların sonucunda aşırı LDL-K seviyelerinin daha fazla okside LDL oluşumuna yol açtığı ve bu şekilde aterogenezi desteklemektedir (37, 38).

LDL partiküllerinin modifikasyonunu; intima bölgesinde gelişen fantom reaksiyonları sonucunda oluşan reaktif oksijen türlerini artmasıyla oluşmaktadır. Modifiye LDL'nin hücre içine alınmasını sağlayan çöpçü reseptör ailesinin ekspresyonu hücre içinde

ki kolesterol miktarından bağımsız olarak yüksek ekspresyona sahiptir. Bunun sonucunda da makrofajlarda yüksek kolesterol miktarı olmasına rağmen içeriye modifiye LDL girişi devam eder ve erken aterosklerotik lezyonun bir özelliği olan köpük hücre oluşumu gerçekleşir. Oksitlenmiş LDL partiküllerinin bileşenleri, inflamasyonu indükleyebilir ve aynı zamanda, hümmoral ve adaptif bağışıklığı uyaran neo-epitoplur sağlayabilir (10).

Okside LDL ile aterosklerozun başlangıcı arasında ki bağlantıyı açıklayan bir çok çalışma verisine rağmen henüz kesin bir kayıt olmasada LDL partikül sayısının artışıının ateroskleroza neden olduğu düşünölmektedir (39). Belki oksidatif süreci hedef alan bir çok terapötik girişim ile aterogeniz sürecinin yavaşladığı veya başlangıç süresinin geciktiği ortaya konmuş olsa da, hiçbirini klinik denemelerinde aterosklerotik olaylara karşı etkin rol oynamadı. LDL'nin oksidasyonunun engellemesinde önem bir etkisi olduğu iddia edilen, yağda çözönen bir vitamin olan succinobucolun klinik çalışmalarıda yine olumlu sonuç vermedi (40). Ayrıca bazı laboratuvar çalışmalarıda okside LDL yerine normal LDL'nin ateroskleroza rol oynayan T-hücrelerinin salınımına yol açtığını göstermiştir (41). Bu nedenle okside LDL hipotezi sağlam deneysel kanıtlara dayanmasına rağmen etkin bir tedavinin gerçekleştirilememesi hipotezin varsayımsal olarak kalmasına neden olmaktadır. Ancak güçlü genetik kanıtlar, gözlemsel epidemiyolojik çalışmaların sonuçları ve farmakolojik müdahaleler, LDL-K'yi ateroskleroza şüphesiz bir nedensel faktör ve terapötik hedef olarak ortaya koymaktadır. LDL-K, endotel disfonksiyonuyla birlikte arter duvarında birikebilir ve hücre dışı matriks molekülleri tarafından intima bölgesinde tutulabilir. Aterogeneizde bu LDL kümelerinin aracılık ettiği alternatif yol araştırmalara daha az konu olmuştur. LDL partikülleri subendotelyal boşlukta biriktiğinde, intimal proteoglikanlara bağlanabilir ve agregatlar oluşturabilirler. Bu agretatlar daha sonra LDL reseptörü ile ilgili protein (LRP) süper ailesinin reseptörleri yoluyla düz kas hücrelerine girebilir. LRP üst ailesi üyeleri, çöpçü reseptörler gibi, kolesterolün ekspresyonunu azaltan olağan homeostatik mekanizmalardan kaçındıkça, hücreler kolesterolü bu şekilde biriktirebilir. Bu düz kas hücreleri ve makrofajlarda lipid birikimine yol açarak, lezyonun ilerlemesine katkıda bulunabilir (42).



Şekil 2. Ateroskleroz'un başlangıcı (Libby'den, 43)

HDL Kolesterol, Trigliserit, Lipoprotein(a) ve Ateroskleroz İlişkisi

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucunda yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL-K) konsantrasyonları ile aterosklerotik olaylar arasında ters yönlü bir ilişki olduğu güçlü bir şekilde ortaya konmuştur. Fakat genetik kayıtlar şu ana dek HDL-K'un ateroskleroza karşı koruyucu rolü etkinliğini desteklememektedir (44). Ayrıca HDL-K'yı yükselten çok sayıda tedavi kardiyovasküler sonuçları iyileştirmede başarısız olmuştur. Gözlemler arasındaki farklılığın nedeni HDL-K yapısındaki trigliserit konsantrasyonundaki değişiklikler olabilir (45). HDL'nin aksine, lipoprotein a (Lpa) ve ateroskleroz arasındaki ilişki hem gözlemsel hem de genetik kayıtlarla desteklenmektedir (46).

Ateroskleroz ve İnflamasyon

Aterogenezin başlamasında sigara kullanımı ve hipertansiyonun yanı sıra metabolik sendromun bileşenleri olan visceral yağlanma, insülin direnci ve trigliseritten zengin lipoproteinlerin artışı ile ortaya çıkan diyabet süreci patogenezin diğer önemli nedenleri arasında gösterilmektedir. Ayrıca bu klinik tabloya yüksek LDL-K seviyelerinin eşlik etmesiyle aterogenez riskinin arttığı bilinmekle birlikte mekanizması henüz aydınlatılamamıştır. Bu risk faktörlerinin birçoğu inflamatuvar yolların aktivasyonunu sağlayabilir. Ortaya çıkan inflamasyon ile birlikte arter duvarındaki hücrelerin işlevini

ateroskleroza destekleyecek nitelikte değiştirebilir. Örneğin patogeneizde yer alan anjiyotensin II hipertansiyonu, transkripsiyonel düzenleyici fakör-Kb (NF-Kb) gibi inflamatuvar yolları da aktifleştirir (47). Benzer şekilde son yıllarda yapılan deneysel çalışmada; hipertansiyon patogenezinde rol oynayan adaptif T hücre immün yanıtının, yüksek kan basıncı ve ateroskleroz için yaygın patogeneiz yolunu oluşturduğu bildirilmiştir (48). Tütün kullanımı akciğer alveollerinde inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkarabilir. Viseral yağ dokusuna yaygın bir şekilde eşlik eden insülin direnci ve tip 2 diyabet'te inflamasyona neden olur (49, 50). Bu ekstravasküler bölgelerde gerçekleşen inflamasyon ile dolaşıma inflamatuvar sitokinler salınarak uzaktaki arter bölgeleri etkileyerek intima bölgesinde inflamatuvar hücreleri aktive edebilir (51, 52).

İnflamasyonun en önemli biyobelirteçlerinden olan C-reaktif protein (CRP) seviyeleri diğer kardiyovasküler risk faktörleriyle birlikte değerlendirildiğinde kardiyovasküler riski tahmin etmede önemli bir moleküldür (53).

Birçok deneysel çalışma ile adaptif immüitenin aterogeneizde rol oynadığını ortaya koymuştur. İnsan aterosklerotik lezyon bölgelerinde T lenfositleri ve adaptif immün cevabın belirteçleri gözlenmiştir. Yapılan çalışmaların sonucunda bazı T hücresi alt tiplerinin [Tip1 T yardımcı hücreleri (TH1)] deneysel ateroskleroza indüklediği, bazı T hücrelerinin [Düzenleyici T hücreleri(Treg)] aterogeneizi hafiflettiği ortaya koyulmuştur (39, 54).

İnsan aterosklerotik plaklarının incelenmesi ve çeşitli deneysel çalışmalar sonucunda aterosklerozda inflamasyon ve immün cevabın önemli rol oynadığı bildirilmiştir (43).

Endotel

Dolaşım ile ateromun başlangıç bölgesi olan arteriyal intima arasındaki tampon bölgeyi oluşturan endotelial tabakadaki değişiklikler aterogeneizin erken safhalarında açığa çıkar. Aterosklerotik risk faktörlerine maruz kalınması sonucunda endotel hücrelerden NO gibi endojen vazodilatörlerin salınımı aktive olur (55). Ayrıca yüksek kolesterol içeren bir diyetin tüketilmesi ile lökositleri endotel yüzeyine bağlayan VCAM-I gibi adhezyon moleküllerinin ve lökositlerin intimaya girişini indükleyen kemoatraktanların ekspresyonu aktive olur (56, 57). Bunun yanı sıra akış bağımlı iyon kanalları ve çeşitli transmembran proteinleri ile kan akışında meydana gelen lokal hemodinamik değişiklikler ile endotel fonksiyonunu kaybeder. Meydana gelen kan akış hızındaki değişiklik ile krüppel benzeri faktör 2 (KLFs) gibi çeşitli transkripsiyonel fakörleri gen ekspresyonunu etkiler (58). Bu anormal akış hızı ile endotel; ateroprotektif, antiinflamatuvar ve antitrombotik özelliklerini

kaybederek, trombüs oluşumu ve kalıcılığını indükleyecek aktiviteleri kazanarak aterogenezin başlangıcında rol oynar (59).

2.1.2.2. Aterosklerozun İlerleyişi

Ateroskleroz süreci başladıktan sonra lipid ve lipid yüklü hücrelerin birikimiyle ilerler. Uzun yıllar boyunca pek çok araştırmacı aterom bölgesinde, monositlerin dönüşümü ile oluşan makrofajların çok fazla lipid içeriğiyle köpük hücre oluşumunun indüklediğini bildirmiştir. Son deneysel veriler ise düz kas hücrelerinin metaplazisinin makrofaflara benzeyen köpük hücre oluşumuna yol açabileceğini düşündürmektedir. İnsan intması özellikle aterom bölgelerinde düz kas hücreleri içermektedir. Düz kas hücrelerinin mediadan intmaya göçü, büyüyen aterosklerotik plakta düz kas hücrelerinin birikmesine katkıda bulunur. Bu hücreler yıllar içerisinde çoğalabilir ve yerleşik bir aterosklerotik plak yığınının ana öğresi olup hücre dışı matrik makromoleküllere dönüşebilir (60).

Aterosklerotik Plakın Hücre Dışı Matriksi

Aterosklerotik plakların hücre dışı matriksi, interstisyel kollajen, elastin, proteoglikanlar ve glikozaminoglikanlar içerir. Bu hücre dışı matriks moleküllerinin çoğu lipoproteinleri intima bölgesine hareketine ve intima bölgesinde birikimine yol açar. İnflamatuvar lökositler intima bölgesine hem infiltrasyonla girerek hem de lezyon bölgesinde çoğalmaları gerçekleşerek aterojenik etki yaratabilirler (61). Semaforin gibi lökositlerin intima bölgesinde kalmasına yardımcı olan faktörler plakta inflamatuvar sitokinlerin artışına neden olurlar (62, 63).

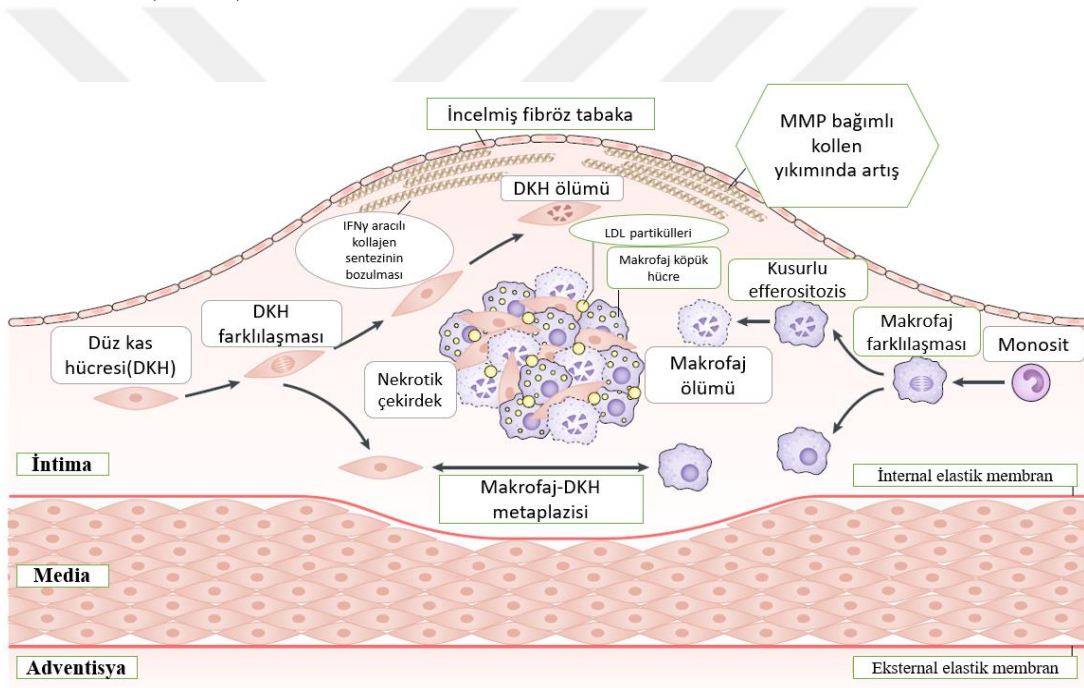
Lezyon bölgesinde makrofajlar sayıca baskın olsa da T lenfositlerde lezyonların içerisinde yerleşim göstererek aterosklerotik plak büyümesi üzerine olumlu ya da olumsuz etki edebilir. TH1 hücreleri ateroskleroza tetikleyen IFN- γ sentezini aktifleştirirken, TH2 hücreleri IL-10 gibi antiinflamatuvar sitokinlerin üretimini artırabilir. Ayrıca Treg hücreleride düz kas hücre proliferasyonunu sınırlayabilir ve interstisyel kollajen sentezini destekleyebilir (54, 64).

Ayrıca aterosklerotik plak bileşenleri lezyonlardan drene olarak T ve B hücreleri için antijen görevi görebilecekleri komşu lenf düğümüne ulaşırlar. Lokal olarak üretilen sitokinler gibi diğer aterosklerotik plak bileşenleride bu lenf düğümlerinde immün yanıtları düzenleyebilir (65). Öyle ki ilerlemiş lezyonlarda , üçüncül lenfoid yapılar büyük arterlere

bitişik olarak gelişir. Bu yapılarda B hücreleri LDL partiküllerine karşı büyük miktarda antikor üretir (66).

Belirsiz Potansiyelin Klonal Hemotopoezi

Son yıllarda deneysel ateroskleroz üzerine yapılan araştırmalar sonucunda miyelodisplastik sendrom ve akut miyeloid lösemi ile ilişkili gen mutasyonlarına sahip miyeloid hücrelerin ateroskleroz için önemli bir risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur. Yaşla birlikte kemik iliğinde hemaopoietik kök hücrelerinde proliferatif bir avantaj sağlayan somatik mutasyonlar, periferik kanka miyeloid hücre klonlarına yol açabilir. Sadece birkaç gende (DNMT3A, TET2, ASXL1 ve JAK2) meydana gelen bu mutasyonlar klon üretimine neden olabilir (67, 68).



Şekil 3. Aterosklerozun ilerleyişi (Libby'den, 43)

Yetmiş yaşlarındaki bireylerin %10'undan fazlası bu tür klonları barındırır. Bu tür mutant myeloid hücre klonlarına sahip çoğu kişide asla lösemi gelişmeyeceği için bu duruma belirsiz potansiyelin klonal hematopoezi (CHIP) adı verilir. Her yıl CHIP'li bireylerin %0,5-1'i aynı klonda ardışık mutasyonların artmasına bağlı olarak akut lösemiye yakalanırlar. Fakat buna rağmen CHIP'li bireyler hematolojik maligniteye atfedilenden daha yüksek bir ölüm yüzdesine sahiptir. Yapılan çalışmalar sonucunda başta ateroskleroz komplikasyonları olmak üzere kardiyovasküler hastalıklar CHIP'li bireylerin ölüm

nedenlerinin başında gelmektedir. CHIP’de mutasyona uğramış genlerde daha çok DNA metilasyona uğramış ve epigenetik düzenleme yoluyla IL-1 β gibi inflamatuvar ajanların gen ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir. JAK2’de ki mutasyonlar, nötrofil hücre dışı tuzakları (NETs) oluşumuna neden olarak trombozu indükler (69). CHIP ile kardiyovasküler risk, geleneksel KVVH ile ilişkili risk faktörlerine bağlı olmadığından, KVVH ile CHIP’i birbirine bağlayan mekanizmaların aydınlatılması, ateroskleroz yolaklarına yeni bir ışık tutacağı öngörülmektedir (70).

Tüm bu bulgular sonucunda lökositler ile ateroskleroz arasındaki ilişkinin oldukça güçlü olduğu ve hemen hemen tüm aterom plaklarda makrofaj ve lenfosit çeşitlerinin bulunduğu bildirilmiştir (64).

Kalsifikasyon

Ateroskleroz süreci boyunca bir çok plakta kalsifikasyon bölgeleri oluşur. Ateromlarda, kalsiyum birikiminin ve uzaklaştırılmasını kontrol eden mekanizmaların bozulması sonucunda aktif bir dejeneratif süreç olan kalsifikasyon süreci başlar (71). Aterosklerotik plaklarda meydana gelen bu kalsifikasyon süreci tıpkı kemik dokudaki biyolojik süreç gibi ilerlemektedir. Mikroskopik kalsifikasyonlar plaklarda mekanik dengesizliğe neden olarak yırtılma eğilimini artırarak, trombozu tetikleyebilir (72). Daha yüksek seviyelerde biriken kalsiyumun ise trombotik olayların oluşum yüzdesini düşürdüğü bildirilmiştir (73).

2.1.2.3. Aterosklerozda Komplikasyonlar

Aterosklerotik plak çoğu hastada, süreç boyunca arteriyel lümeninin çapını koruyarak ablüminal yönde (lümenden uzağa) radyal olarak dışa doğru genişler. Lezyon ilerleme sürecine eşlik eden arter duvarının yeniden şekillenmesinde, düz kas hücreleri tarafından sentezlenen matriks metalloproteinaz 3 (MMP3) gibi arteriyel ekstraselüler matriks elemanları rol oynar. Sonuç olarak aterosklerotik plak büyür ve arter lümenini daraltarak kan akışını sınırlayan lezyonlara dönüşür. Koroner arter perfüzyonunda meydana gelen bu bozulma sonucunda özellikle fiziksel aktivite ile artan miyokardiyal oksijen ihtiyacı sırasında iskemiye ve anjina pectoris semptomlarına neden olabilir (74, 75).

Plak Yırtılması

Aterosklerotik plakların yırtılması, miyokard enfarktüse neden koroner arterin akut trombozunun en yaygın tetikleyicisidir. Yırtılmış aterosklerotik plaklar sıklıkla ince bir

fibröz tabaka ile kaplanmış büyük lipid çekirdekleridir ($<60 \mu\text{m}$). Bu özelliklere sahip plaklara korunmasız plak adı verilirken, lipid içeriği düşük ve daha kalın fibröz tabakaya sahip plaklara kararlı plak adı verilir. Bu sınıflandırma aterosklerotik plak destabilizasyon mekanizmalarının karmaşıklığını önemli ölçüde basitleştirmesine rağmen akut koroner sendromların patofizyolojisine ilişkin çok fazla düşünülmesine neden olmuştur (76-79).

Aterosklerotik plağın lipid çekirdeğini örten hücre dışı matrikste meydana gelen değişikliklerle, üstte fibröz bir başlık oluşabilir ve bu yapıda bir çatlak meydana gelebilir. İnflamatuvar süreçler, aterosklerotik plaktaki düz kas hücreleri tarafından intertisyel kollajen sentezini engelleyebilir ve bu hücrelerin fibröz başlığın iskeleti koruma yeteneğini bozabilir (80). Ayrıca aktive olan inflamatuvar sitokinler intertisyel kollejenaz aktivitesini artırabilir (81).

Bir aterosklerotik plağın yırtılması ile plağın içeriği kana salınır. Plak çekirdeğindeki trombojenik materyal, özellikle makrofajlar ve düz kas hücreleri tarafından üretilen doku faktörleri, ateroskleroza nihai ve en korkulan komplikasyonu olan trombozu tetikleyebilir. Luminal endotelin lokal olarak bozulmuş homeostatik fonksiyonu ile birlikte, kalıcı ve tıkanıcı trombüs ile akut koroner sendromlar ve inme gibi iskemik rahatsızlıkları tetikleyebilir. Trombüs oluşumu ayrıca periferik arterlerde de ciddi iskemik sonuçlar ortaya çıkarabilir. Aterosklerotik plak aracılı oluşan trombüs, trombin aktivitesiyle fibrinojenin fibrine dönüşmesi sonucunda oluşur. Ayrıca trombin pıhtı oluşumuna katkıda bulunan bir süreç olan trombosit agregasyonunu da aktive eder (43).

Yapılan son araştırmalara göre vasküler pıhtılaşmada NET'lerin önemli rol oynadığını düşünülmektedir (82). NET'ler, lökosit granüler enzimlerini ve kandan emilen doku faktörleri gibi çeşitli proteinleri bağlayan ve NETosis olarak bilinen özel bir hücre ölümüne maruz kalan nötrofiller tarafından hazırlanan DNA ipliklerinden oluşur. Bu nedenle ateroskleroz sırasında oluşan bu kan pıhtılarının ana bileşenlerinin; trombüs oluşumunu ilerletebilen ve intimal hasarı artıran fibrin iplikleri, aktive olmuş trombosit kümeleri ve NET'lerdir (83, 84).

Normal fizyolojik şartlar altında, arteriyel endotel, pıhtı oluşumunu önleyen ve trombolizi teşvik eden birçok aktiviteye sahiptir (59). Trombomodulin ve heparan sülfat proteoglikanları endotel tabakasında, nitrik oksit üretiminde ve prostasiklin üretimleriyle endotel tek tabakanın antikoagulan ve antitrombotik aktivitesine katkıda bulunurlar. Ayrıca ürokinaz tipi plazminojen aktivatörü ve doku tipi plazminojen aktivatörünün

ekspresyonlarında ki artış fibronilizi teşvik ederek trombüsün ortadan kaldırılmasına yardımcı olur. Ancak aterosklerotik risk faktörlerinin varlığında veya akut olarak inflamuar sürecin başlamayışla, endotel disfonksiyonu meydana gelerek bu homeostatik özellikler bozulabilir. Öyle ki bu koşullarda endotel hücreleri, güçlü bir prokoagülan molekül olan doku faktörlerinin yanı sıra fibrinolizin önemli bir endojen inhibitörü plazminojen aktivatör inhibitör 1'i üretir (85).

Plak Erozyonu

Etkili antiaterosklerotik tedavi sonucunda (lipid düşürücü ve hipertansiyon tedavisi, sigaranın bırakılması), trombotik aterosklerotik komplikasyon sonuçlarını değiştirir. Aterosklerotik plaklar daha az inflamasyon ve lipid yükü sahipken fibröz tabaka kalınlaşıp ve fibröz kapağın fissürüne bağlı olarak yırtılmaya daha az yatkın hale gelir (79, 86). Bu koşullar altında ateromun trombotik komplikasyonları başka bir mekanizma ile akut koroner sendromlara yol açabileceği düşünülmektedir. Bu alternatif trombotik mekanizmaya plak erozyonu denilmektedir. Plak erozyonu tipik yırtılmış bir plaktan oldukça farklı bir morfolojiye sahiptir. Erozyonla oluşan bu plaklarda zengin bir ekstraselüler maktriiks, kırılğan bir fibröz baş ile birlikte az sayıda inflamatuvar lökositler ve lipidler bulunur (87).

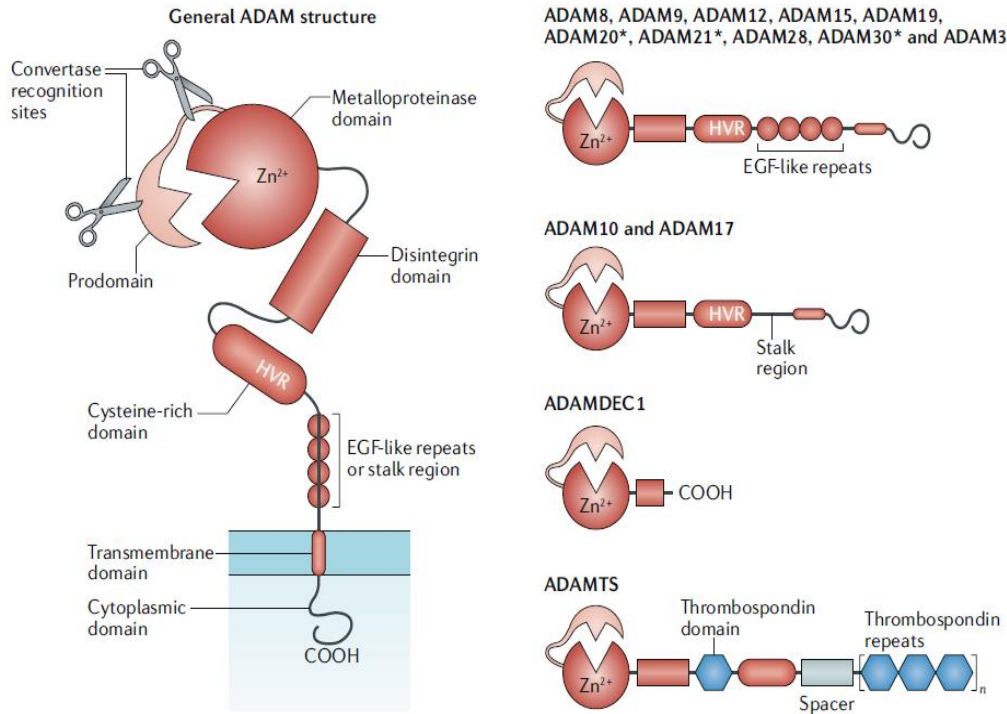
Plak erozyonu mekanizmaları, plak yırtılmasından çok daha az araştırılmıştır. Yine de ortaya çıkan kanıtlar doğuştan gelen bağışıklığın aktivesini sağlayan Toll like reseptör 2 gibi reseptörlerin aktivasyonu ve polimorfnükleer lökositlerin trombotik sürece katkı sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca yine NET'lerin akut koroner sendromlarda özellikle intima bölgesindeki erozyonda rol oynadığı bilinmektedir (88, 89).

2.2. ADAM Enzim Ailesi

ADAM proteazları çinko (Zn^{+2}) bağımlı proteolitik aktiviteye sahip tip 1 transmembran proteinleridir. İnsan genomunda toplam 22 ADAM tanımlanmıştır. Tanımlanan ADAM proteinlerinin yaklaşık yarısı sadece testis ve epididim'e spesifikken diğer yarısı hemen hemen tüm dokular tarafından sentezlenmektedir (90). Bu proteaz ailesinin bazı üyeleri proteolitik (shedaz/shedding/kırılma/dökülme) aktiviteye sahip olup hücre membranında çeşitli büyüme faktörleri, çeşitli sitokinler ve bunların reseptörlerinin aktivitesini düzenlerken bazılarında proteolitik olarak inaktif olup hücre-hücre iletişimde ve hücre adhezyonunda görev yaptığı ortaya konmuştur. Tüm bu etkinlikleriyle ADAM ailesinin hücre büyüme ve farklılaşmasında, inflamasyonda temel rol oynadığı ortaya çıkmıştır (91, 92). Ayrıca ADAM proteaz ailesi yine membranda bulunan ADAM-TS ve MMT enzim aileleriyle de, ortak substrat ve inhibitör etkinliklerinden dolayı yakın ilişki içerisinde oldukları (93).

Transmembran yerleşimli proteinlerin ekstraselüler alanı ektodomain olarak adlandırılır. Ektodomainlerin proteolize uğramasına, sheddaz (kırılma/dökülme) ismi verilir. ADAM proteazlar bu önemli fonksiyonlarından dolayı sheddazlar olarak sınıflandırılırlar (94). Proteoliz sonrasında substratın aktivitesinin düzenlenmesi bir posttranslasyonel modifikasyon olup protein aktif ya da inaktif formunu kazanır (95).

ADAM proteazlar yapısal olarak tipik ve atipik olmak üzere ikiye ayrılır. Tipik üyeleri yapısal olarak bir N-terminal sinyal peptidi, bir pro-, bir katalitik-, bir disintegrin-, bir sisteince zengin bölüm ve EGF benzeri bölüm devamında bir transmembran bölümü ve bir sitoplazmik kuyruk olmak üzere 8 farklı bölgeden oluşur. Atipik üyeleri olan ADAM10/17 bir pro-, bir katalitik-, bir disintegrin ve membran proksimal domain devamında transmembranöz bölüm ve sitoplazmik kuyruk olmak üzere 6 bölgeden oluşur. Sisteince zengin domain ile EGF-benzeri domain yerine α/β katlantısına sahip membran proksimal domain bulunmaktadır (**Şekil 4**) (96, 97).



Şekil 4. Proteolitik aktiviteye sahip ADAM proteazların yapısı (Lambrecht'den, 96)

Her domain farklı bir aktiviteye sahip olup; pro- domain ADAM10/17 yapısında inaktif formdayken proteaz aktivitesini inhibe eder. ADAM10/17 aktif şeklini alırken pro-domain, bir pro-protein dönüştürücü olan furin tarafından golgi cisimciğinin son kısmında kesilir (98).

Katalitik domain, Zn^{+2} bağlayıcı konsensüs motif olan H-E-X-G-H-X-X-G-X-X-H-D dizisine sahip olup, proteolitik aktiviteden sorumludur. Katalitik domainin, doku metalloproteaz-1 inhibitörü (TIMP-1) ve doku metalloproteaz-3 inhibitörü (TIMP-3) olmak üzere bilinen iki fizyolojik inhibitörü vardır.

Tüm ADAM ailesinde bulunan ve aynı görevi yaptığı düşünülen disintegrin domaini integrinlerle etkileşimde rol oynar. Ancak aile üyelerinin disintegrin domaini analiz sonuçlarına göre, yalnızca ADAM15'in klasik integrin etkileşim dizisi olan RGD motifine sahip olduğu diğer birçok aile üyesinin integrin bağlanmasına aracılık edecek asidik motif içerdiği belirtilmiştir (99-101).

ADAM10/17'yi diğer aile üyelerinden ayıran en önemli yapısal farklılık membran proksimal domainidir. Membran proksimal domain substratların tanınması, dimerizasyon ve sheddaz aktivitesinin regülasyonunda görev yapar. Transmembranöz bölge ve sitozolik

kuyruk ise hücre içi lokalizasyon ve fosforilasyon aracılığıyla aktivasyondan görev yapar (102).

2.1.1. ADAM10/17, İnflamasyon ve Ateroskleroz İlişkisi

ADAM17; substratları üzerinde gerçekleştirdiği shedding aktivitesiyle substratın salgılandığı hücreye, komşu hücrelerine veya daha uzaktaki dokuları etkilenmesine neden olabilir (103, 104).

ADAM17 fizyolojik ve patofizyolojik birçok sinyal molekülü ve sinyal yolağını kontrol eden önemli bir proteazdır. ADAM17; TNF- α , bazı Erb ligandları ve onların reseptörleri, IL-6 reseptörü (IL-6R), L-selektin ve ICAM1 gibi immunitiyi düzenleyici önemli sitokinlerin ve sinyal yolağı ligandlarının yer aldığı yetmişden fazla substrata sahiptir (105, 106).

ADAM17'nin TNF α 'yı olgunlaştırması ve src bağımlı EGFR etkinliğiyle ; ekstraselüler düzenleyici kinaz (ERK), guanin nükleotid değişim faktör (GEF) ve Rhoa sinyal yolları aktive olarak inflamatuvar süreci başlattığı ve buna bağlı olarak hastalıkların patofizyolojisinde rolü olduğu düşünülmektedir (107).

ADAM10/17'nin aktivitesiyle kontrol edilen yollardan biri de NOTCH sinyal yolağıdır. NOTCH sinyal yoluyla hücre-hücre iletişimi düzenlenir. Hücrenin kaderine etki eden bu yol ile önemli hücre fonksiyonlar örneğin hücre farklılaşması veya apoptoz kontrol edilir. Memelilerde , Notch reseptörlerinin dört izoformunun (Notch 1-4) ve beş Notch ligandının [Delta benzeri ligand (Dll 1, 3 ve 4) ve Jagged-1 ve 2] ekspresyonu olduğu bildirilmiştir. Notch reseptörleri bir öncül olarak sentezlendikten sonra golgiye giderek furin benzeri bir proteaz tarafından transmembran proteinine dönüştürülür. Aynı yolla sentezlenen iki subunit kovalent olmayan etkileşimlerle tutunarak hücre membranına giderler (108, 109).

NOTCH ligandının reseptöre bağlanabilmesi için öncelikle ADAM10 veya ADAM17 tarafından bir shedding işlemine uğraması daha sonrasında kompleks bir membran proteazı olan γ sekretaz ile muamelesi gereklidir. Bu işlemlerden sonra hücre içi aktif form NOTCH (NICD) salınır. NOTCH sinyalinin kanonik ve kanonik olmayan yollarla çekirdekteki çeşitli transkripsiyon faktörlerini etkiler (110, 111). NOTCH sinyal yolağının aktivasyonu ateroskleroz ve aterosklerotik etkinlik çalışmaları hala tartışma konusu olsa NOTCH sinyal yolağının aterosklerozu tetiklediği ciddi bir şekilde savunulmaktadır.

Aterosklerozda plazma lipoproteinlerinin subendotelyal boşlukta birikerek inflamatuvar cevaplar oluşturduğu ve buna bağlı olarak ta adhezyon moleküllerinin ekspresyonlarında artış ve endotel disfonksiyonuna yol açtığı bilinmektedir. Bu bulguları da NOTCH sinyal yolağı aracılığıyla endotel hücrelerinde inflamatuvar sitokinler salınması olarak bildirilmiştir (112).

Yapılan bir çalışmada aterosklerozun başlarında dolaşımda ki monositlerin endotel hücrelerinden salgılanan adhezyon proteinlerine tutunarak intima bölgesine göç ettikleri ve burada makrofajlara dönüştüğü bildirilmiştir. Ayrıca ateroskleroz gelişimi boyunca makrofajların aterosklerotik plak büyümesine inflamasyona katkı sağladığı bilinmektedir. Makrofajlar genel olarak inflamatuvar (M1) ve antiinflamatuvar (M2) olmak üzere ikiye ayrılır. M1 makrofajlar genellikle T hücrelerinden IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18, MIF, TNF- α gibi sitokinlerin salınımını uyarıp aterojenik etkiye neden olurken, M2 makrofajlar TGF- β gibi ateroprotektif etki gösterir (113, 114). Literatürde NOTCH sinyal yolağının aktivasyonu M1 makrofajlara bağlı sitokinlerin artışı ve M2 makrofajlara bağlı antiinflamatuvar yanıtların azaldığı ortaya konmuştur (115, 116).

ADAM17 birçok sitokin ve growth faktörü substrat olarak kullanıyor olmasına rağmen en önemli substratları EGFR ve Pro-TNF- α 'dır. Bu substrat etkinliklerinden dolayı ADAM 17 daha çok kanser çalışmalarında çalışılıyor olmasına rağmen son zamanlarda kardiyovasküler hastalıklar üzerinde de etkili olduğu gösterilmiştir (117).

Vasküler düz kas hücre (VSMC) hücre kültürleri Anjiyotensin 2 ile indüklendiğinde ; ADAM17'nin fosforilasyonun, mRNA aktivitesinin ve protomor etkinliğinin arttığı ortaya konulmuştur. Fosforilasyon ile aktifleşen ADAM17 HB-EGF'nin dökülmesine ve EGFR'nin transaktivasyonunu artırdığı bildirilmiştir. EGFR sinyal yolağının aktivasyonu arteriyel kan basıncı regülasyonu, vasküler yeniden şekillenme ve ateroskleroz ile ilişkilendirilmiştir (118).

ADAM17'nin, vasküler düz kas hücrelerinden ve endotel hücrelerinden anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'nin (ACE2) salınmasına aracılık ederek, kardiyovasküler bozukluğa sahip hastalarda durumun daha da kötüye gitmesine neden olduğu ifade edilmiştir (119).

ApoE^{-/-} farelerde yapılan çalışmada aortik lezyon bölgesinde artmış ADAM17 ekspresyonu ve dolaşımda TNF α 'nın yükseldiği bildirilmiştir (120). Ayrıca İnsan aterosklerotik plaklarında izole edilen mikropartiküller üzerinde yapılan çalışmada ADAM17 aracılığıyla TNF α , tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) ve endotelyal protein c

reseptör (EPCR) seviyelerinin arttığı ve buna bağlı olarak inflamasyon ve aterosklerotik plak oluşumunun ortaya çıktığı bildirilmiştir (121, 122).

2.3. Propolis

Arı tutkalı olarak da bilinen propolis, bal arılarının (*Apis mellifera* L.) farklı botanik kaynaklardan topladıkları bileşenleri bal mumu ve tükürüm enzimlerini kullanarak oluşturduğu reçinemsî doğal bir üründür. “Propolis”, “şehrin savunması” anlamına gelen Yunanca bir kelimedir ve bal arılarının propolisi kovan dolgu malzemesi olarak kullandıklarını ifade eder. Propolis, kovan girişinde yırtıcıları tuzağa düşürmesinin yanı sıra kovandaki çatlakları doldurmak ve ısı yalıtımını sağlayarak kovayı güvenliğinde rol oynar (123, 124). Fizikokimyasal açıdan bakıldığında, propolis lipofilik bir malzemedir, soğukken sert ve kırılabilir, ancak sıcakken yumuşak ve çok yapışkandır. Hoş bir aromatik kokuya sahip olup ve botanik kaynağına ve coğrafi iklime bağlı olarak krem, yeşil veya kırmızıdan kahverengiye değişen değişken bir renge sahiptir (124, 125) (**Resim 1**).

Propolis, çeşitli hastalıklara karşı MÖ 300'den beri kullanılmaktadır. Ancak propolis hakkındaki ilk bilimsel rapor, bileşimini ve kimyasal etkilerini ayrıntılarıyla açıklayan 1908 yılında yayınlandı (127-130).



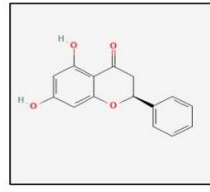
Resim 1. Propolisin ham ve toz hali (Çakıroğlu’ndan, 126)

2.3.1. Propolisin Kimyasal İçeriği ve Sağlık Üzerine Etkileri

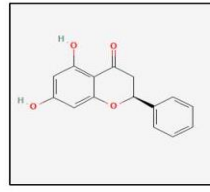
Propolis, başta polifenoller, reçineler, flavonoidler, uçucu yağlar, yağ asitleri, mum ve polen olmak üzere onlarca bileşik içerir (131, 132). Türkiye’de iklim ve coğrafik çeşitliliğine bağlı zengin bitki örtüsüyle propolis farkındalığının arttığı ülkelerin arasında güçlü bir şekilde yerini almaktadır. Daha önce laboratuvarımızda Çakıroğlu ve arkadaşları, Türkiye’nin çeşitli yörelerinden toplanan propolis örneklerini karıştırdıktan sonra hem sulu hem de etanolü ekstraktlarında HPLC-DAD ve GC-MS aracılığı ile kimyasal içerik tayini yapmışlardır (133). Hem sulu hem de etanolü propolis ekstraktının içeriğinde bulunan başlıca flavanoidler Şekil 5’te gösterilmiştir. Ayrıca çeşitli vitaminler (B kompleksi, C ve E) ve çinko, magnezyum, bakır, demir, manganez, nikel ve kalsiyum gibi çeşitli mineralleri içerir (134, 135). Kimyasal içerik zenginliği nedeniyle, propolis antioksidan, antiinflamatuvar, immünomodülatör, antibakteriyel, antiviral, antifungal ve antiproliferatif sayısız terapötik özelliğe sahiptir (124, 136). Ancak propolisin kardiyovasküler sağlık üzerindeki yararlı etkilerine yönelik literatürde sınırlı bilgiler mevcuttur. Daleprane ve arkadaşları, Brezilya’nın yeşil, kırmızı ve kahverengi propolisinin etanolü ekstraktlarının, yüksek kolesterolü diyetle ateroskleroz indüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör knockout (LDLR^{-/-}) farelerde aterosklerotik lezyonlarda azalma gözlemlendiğini bildirmiştir (137). Xuan ve arkadaşları, Çin ve Brezilya propolisinin etanolü ekstratlarının, İnsan

umbilikal ven endotel hücre kültüründe (HUVEC), fosfotidilkolin aktivitesinde inhibisyona, reaktif oksijen türlerinde azalmaya ve Nf-kB sinyal yolağını baskıladığını bildirmişlerdir (138). Propolisin ateroskleroz sürecine olan etkinliğinin hem detaylı olarak değerlendirilmemiş olması hem de çalışmalarda yalnızca insan sağlığına zararlı etanolik ekstraktın kullanılması bu alanda yeni çalışmalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra propolisin, inflamatuvar sürece direkt etki eden iki enzim olan ADAM10 ve ADAM17 üzerindeki olası etkinliğinin değerlendirilmeside çok önem arz etmektedir.

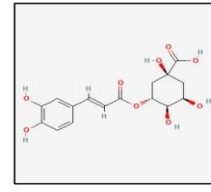
Şöyle ki literatürde propolisin antiinflamatuvar etkinliğini ortaya koyan onlarca çalışma olmasına rağmen henüz etki mekanizması tamamiyle aydınlatılamamıştır. Bu nedenlerle propolisin ADAM10/17 aktivitesine yönelik elde edilecek bulgular fazlasıyla önem arz etmektedir.



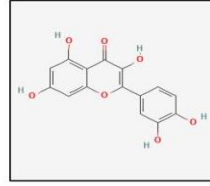
Pinosembrin



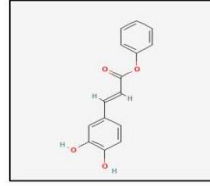
Kafeik asit



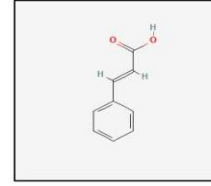
Klorojenik asit



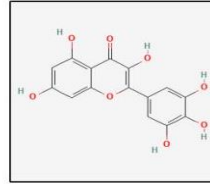
Kuersetin



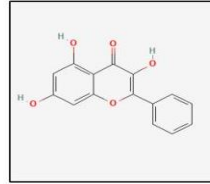
Kafeik asid fenil esteri



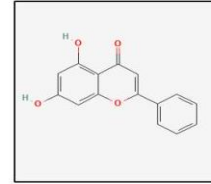
Trans-sinamik asit



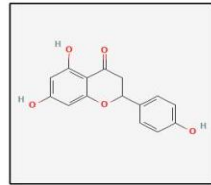
Mirisetin



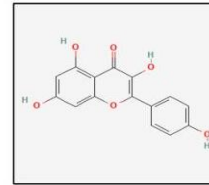
Galangin



Krisin



Naringenin



Kaempferol

Şekil 5. Propolis ekstraktındaki başlıca polifenol ve flavanoidler (Pubchem'den, 139)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve malzemelerin listesi üretici firmaları ile birlikte Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Cerrahi set	Tekno Cer
Çalkalayıcı	Nüve SL 350
Derin Dondurucu (-80°C)	Thermo Electrom Corporation
El homojenizatörü	OMNI-Tissue Master 125
Hassas Terazî	Mettler Toledo AB204-S
İnkübatör	Shel Lab, Heraus
Kan Tüpleri	BD Vacutainer
Mikropleyt	Greiner Bio-one
Manyetik karıştırıcı	Thermal
Mikropleyt okuyucu	Versa max, Molecular devices
Mikropleyt yıkayıcısı	BioTek Elx50
Mikrosantrifüj	Thermo IEC Micromax
Otomatik pipetler	Eppendorf
pH metre	Hanna Instrument
Saf su arıtma cihazı	Kros
Santrifüj	Eppendorf, Centrifuge 5810
Soğutmalı santrifüj	Beckman-Coulter
Sonikatör	Vibra Cell
Steril Enjektör, 1, 5 mL	Beybi
Ultra saf su cihazı	Purelab Elga
Vorteks	IKA Vortex, Genius 3

3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler

Çalışmamızda kullanılan ticari kitler Tablo 2’te verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan ticari kitler

Ticari Kit	Üretici Firma	Ürün Kodu
ADAM10 Aktivite Kiti	ANASPEC	AS-72226 (Kaliforniya, Amerika)
ADAM17 Aktivite Kiti	ANASPEC	AS-72085 (Kaliforniya, Amerika)
Mouse IFN γ ELISA Kiti	Bostonchem	BLS-1132Mo (Boston, Amerika)
Mouse IL-1 β ELISA Kiti	Bostonchem	BLS-1271Mo (Boston, Amerika)
Mouse IL-6 ELISA Kiti	Bostonchem	BLS-1157Mo (Boston, Amerika)
Mouse IL-10 ELISA Kiti	Bostonchem	BLS-1143Mo (Boston, Amerika)
Mouse IL-12 ELISA Kiti	Bostonchem	BLS-9395Mo (Boston, Amerika)
Mouse MPO ELISA Kiti	Bostonchem	BLS-1662Mo (Boston, Amerika)
Mouse PLA2 ELISA Kiti	BT-Lab	E0267Mo (Şangay, Çin)
Mouse PON-1 ELISA Kiti	BT-Lab	E0509Mo (Şangay, Çin)
Mouse TNF- α ELISA Kiti	Bostonchem	BLS1395Mo (Boston, Amerika)
BCA Protein Tayin Kiti	Sigma-Aldrich	B9643 (Darmstadt, Germany)

3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmamızda kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasal	Üretici Firma	Ürün Kodu
Triton x100	Sigma-Aldrich	X-100 (Darmstadt, Germany)
PBS Tablet	Sigma-Aldrich	524650-1EA (Darmstadt, Germany)
Etanol	Sigma-Aldrich	1.11727 (Darmstadt, Germany)
DMSO	Sigma-Aldrich	34869 (Darmstadt, Germany)
GW280264X	AOBIOUS	AOB3632 (Boston, Amerika)

3.2. Yöntemler

Bu çalışmanın yürütülebilmesi için öncelikle Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na 2021/45 protokol numarası ile başvurulup etik kurul onayı alınmıştır (Bkz. Etik Kurul Kararı). Çalışmanın deney hayvanları uygulamaları KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Biyokimyasal analizler, KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve histolojik değerlendirmeler Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Bu tez çalışması KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiştir (BAP-06 Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projeleri, Proje No: TDK-2022-10152).

3.2.1. Propolis İçeriğindeki Başlıca Polifenol/Flavanoidlerin ADAM10/17'ye Yönelik İnhibitör Etkinliğinin Moleküler Eşleşme Yöntemiyle *in silico* Araştırılması

Moleküler eşleştirme çalışmaları, deneyde kullandığımız propolisin içeriğinde bulunan (133), 11 flavonoid ve referans molekülün (GW280264X), hedef proteinlerle olası etkileşimlerini araştırmak için kullanıldı. Bu çalışma için hedef olarak ADAM10 Ekstraselüler domain (Zincir:A) ve ADAM17'nin Membran-Proksimal domain (konformasyon:1) kullanıldı. Bu proteinler için kristal yapılar, aşağıdaki ID ile RCSB Protein Veri bankasından indirildi: ADAM10 Ekstraaselüler domain (2.80 Å) için 6BE6 ve ADAM17 membran-proksimal alanı için 2M2F seçildi (140). Alınan her kristal yapı, su molekülleri ve ligandları çıkararak BIOVIA DS Visualizer yazılımı (Dassault Systèmes BIOVIA, 2016) kullanılarak hazırlandı. Tüm ligandların SDF formatlarına sahip 3D uyumu, PubChem veritabanından alındı ve ardından BIOVIA DS Visualizer yazılımı (Dassault Systèmes BIOVIA, 2016) kullanılarak pdb dosyasına dönüştürüldü (139). Hazırlanan ligandlar ve reseptör proteinleri, AutoDock 4.2 yazılımı için girdi dosyaları olarak kullanıldı (141). Moleküller ve hedef proteinler arasındaki olası kenetlenme modları, Autodock 4.2 yazılımı kullanılarak incelendi ve tüm kenetleme simülasyonları için Lamarckian genetik algoritması kullanıldı. Standart yerleştirme prosedürü kullanıldı. Bunun için tüm ligandlar esnek tutulurken hedef proteinler sabit tutuldu. ADAM10 Hücre Dışı Alanının tamamı, 0.375 Å ızgara aralığı ile 126Å X 126Å X 126Å boyutunda bir ızgara kutusu ile kaplanacak şekilde ortalananmıştır. ADAM17'nin Membran-Yakınsal Alanı, 0.375 Å ızgara aralığı ile 72Å X 106Å X 104 Å boyutunda bir ızgara kutusu ile kaplanacak şekilde ortalananmıştır. Diğer tüm parametreler için varsayılan ayarlar uygulandı. Program, toplam 100 genetik algoritma

alıştırması için çalıştırıldı. Bağlanma sonuç tablosu ve her bir protein-ligand etkileşimi için en iyi model grselleştirilmek üzere saklandı. Her ligandın hedef proteinlere karşı kenetlenmiş kırı beş konformasyonunun bağlanma enerjileri, BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2018 kullanılarak analiz edildi.

3.2.2. Sulu Propolis Ekstraktlarının Hazırlanışı

Sulu propolis ekstraktı için Türkiye'nin çeşitli yerlerinden toplanarak, karıştırılmış ve toz haline getirilen propolis'ten, bir cam şişeye 3 g tartıldı ve 50 ml distile su ilave edildi. Sertçe karıştırıldıktan sonra çalkalayıcı inkübatörde (Nüve SL 350) 60 C ve 150 rpm'de 24 saat bekletildi. Sonra süzgeç kağıdından szlp sırasıyla 0,45 ve 0,22 m'lik filtrelerden geçirilip +4 C'de saklandı.

3.2.3. Etanollü Propolis Ekstraktlarının Hazırlanışı

Etanollü propolis ekstraktı için Türkiye'nin çeşitli yerlerinden toplanarak, karıştırılmış ve toz haline getirilen propolis'ten, bir cam şişeye 3 g tartıldı ve 100 ml %30'luk etanol (Sigma-Aldrich) ilave edildi. Sertçe karıştırıldıktan sonra çalkalayıcı inkübatörde (Nüve SL 350) 60 C ve 150 rpm'de 24 saat bekletildi. Sonra süzgeç kağıdından szlp sırasıyla 0,45 ve 0,22 m'lik filtrelerden geçirilip +4 C'de saklandı.

3.2.4. GW280264X'in Hazırlanışı

Ticari olarak satın alınan GW280264X (AOBIOUS, AOB3632) retici firmanın protokolü doğrultusunda %10'luk DMSO (Sigma-Aldrich) ile çözüldü ve -20 C'de saklandı.

3.2.5. Çalışma Grubu

Çalışmamızda g analizi yapıldıktan sonra, KT Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen 6-8 haftalık, 17-20 g ağırlığında 16 adet C57BL-6J ve 48 adet ApoE^{-/-} olmak üzere toplam 64 adet erkek fare kullanıldı. 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortam sağlanarak barındırılıp, su ad libitum olarak verildi. Hayvanların ağırlıkları dört haftada bir tartıldı (Tablo 4).

Tablo 4. Çalışma grupları

Grup (n=8)	Hayvan Türü	Diyet	Zaman	Enjeksiyon
Kontrol (K)	C57BL-6J	Kontrol Diyet (Research Diets D12104C, Amerika)	16 Hafta	
Vaka (V)	ApoE ^{-/-}	Aterojenik Diyet (Research Diets D12108C, Amerika)	16 Hafta	
Sham (S)	C57BL-6J	Aterojenik Diyet (Research Diets D12108C, Amerika)	16 Hafta	
Sulu Propolis Ekstraktı (SPE)	ApoE ^{-/-}	Aterojenik Diyet (Research Diets D12108C, Amerika)	16 Hafta	Son 4 hafta her gün i.p. enjeksiyon ile 400 mg/kg SPE
Etanollü Propolis Ekstraktı (EPE)	ApoE ^{-/-}	Aterojenik Diyet (Research Diets D12108C, Amerika)	16 Hafta	Son 4 hafta her gün i.p. enjeksiyon ile 200 mg/kg EPE
GW280264X (GW)	ApoE ^{-/-}	Aterojenik Diyet (Research Diets D12108C, Amerika)	16 Hafta	Son 4 hafta her gün i.p. enjeksiyon ile 100 µg/kg GW
DMSO	ApoE ^{-/-}	Aterojenik Diyet (Research Diets D12108C, Amerika)	16 Hafta	Son 4 hafta her gün i.p. enjeksiyon ile %10'luk DMSO
Etanol	ApoE ^{-/-}	Aterojenik Diyet (Research Diets D12108C, Amerika)	16 Hafta	Son 4 hafta her gün i.p. enjeksiyon ile %30'lik etanol

3.2.6. Deneysel Ateroskleroz Modelinin Oluşturulması

Ateroskleroz süreci kardiyovasküler hastalıkların temelini oluşturması nedeniyle oldukça önemlidir. Ancak deneysel olarak ateroskleroz süreci üzerine *in vivo* çalışmalarda sınırlılık vardır. Çünkü deneysel hayvan modellerinde ateroskleroz sürecini başlatmak, sürdürmek veya birebir en gelişmiş organizma olan insandakini taklit etmesi oldukça güçtür. Kullanılan birçok deney hayvanının ateroskleroza karşı direnç göstermesinden dolayı,

ateroskleroz hipotezlerinden biri olan dislipidemiye yönelimler artmıştır. LDL-K seviyelerinin dolaşımında artmasına neden olacak iki farklı transgenik fare modeli oluşturulmuştur. Bunlardan biri LDLR^{-/-} bir diğeri ise ApoE^{-/-} farelerdir. Hatta bu farelerin diyet içeriklerine müdahale ile birlikte önemli ateroskleroz modelleri oluşturulduğu bildirilmiştir (142, 143).

Tez çalışmalarına başlamadan önce ateroskleroz modelini oluşturmak ve plak yükünü tespit edebilmek amacıyla deneme çalışmaları gerçekleştirilmiştir (veriler bu tezde sunulmamıştır).

3.2.7. Numunelerin Toplanması

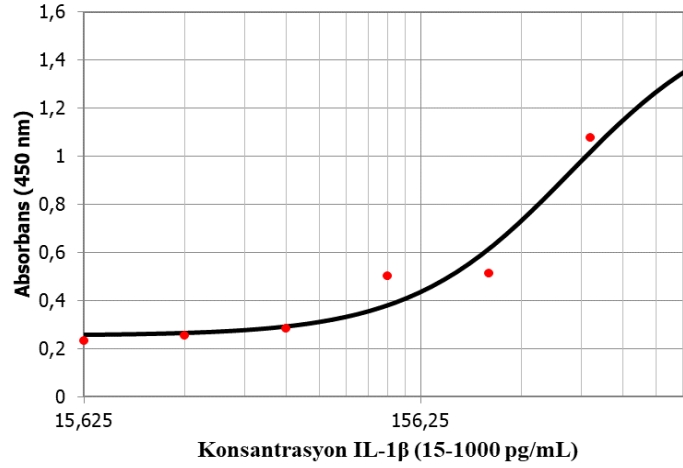
16 haftalık deney süresinin sonunda hayvanlar sakrifiye edildi. Kanlar antikoagülsüz tüplere alınarak 4000 rpm’de 10 dakika santrifüj (Eppendorf 5810) edilerek serumları ayrıldı. Daha sonra dikkatlice kalp ve karaciğer dokusu çıkarıldıktan sonra aort tümüyle elde edildi. Deneme çalışmalarında belirlenen yoğun aterosklerotik lezyona sahip aortik ark (sol subklaviyan arter, sol vertebral arter, sol karotid arter, sağ karotid arter, sağ vertebral arter, sağ subklaviyan arter) ve aortik kökü içeren bölge aorttan kesilerek ayrıldı. Dokuların yarısı biyokimyasal analizler için önce kuru buz ve sonrasında -80 °C’de saklanırken, diğer yarısı histolojik analizler için formaldehit solusyonunda takip edildi.

3.2.8. Serumda Rutin Biyokimya Parametrelerinin Ölçümü

Elde edilen serumlarda dislipidemi, karaciğer ve böbrek patolojilerini değerlendirmek amacıyla glukoz (Glu), TG, TK, alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST) ve kan üre azot (BUN) düzeyleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı’nda mevcut olan otoanalizörde (Beckman Coulter AU5800) ölçüldü. Glu, TG, TK ve BUN ölçüm sonuçları mg/dL hesaplanırken, ALT ve AST sonuçları U/L olarak hesaplanmıştır.

3.2.9. Serum İnterlökin 1-beta (IL-1 β) Seviyelerinin Belirlenmesi

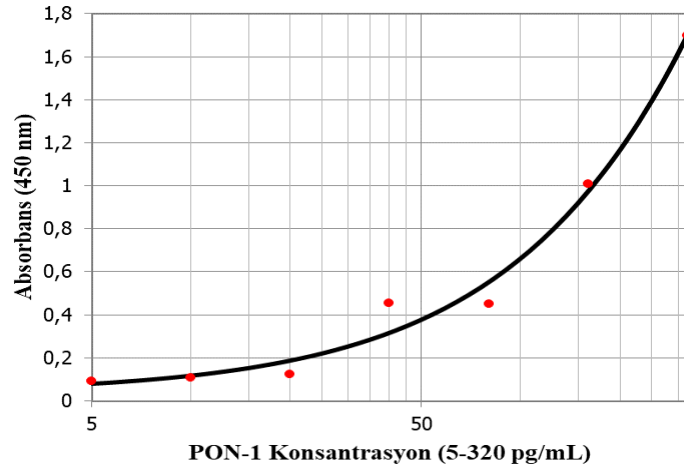
Farelerde serum IL-1 β seviyeleri ticari ELISA kiti (Bostonchem, Ürün no: BLS-1271Mo, Boston, Amerika) ile kitin belirttiği işlemler uygulanarak belirlendi. 450 nm de kolorimetrik okuma yapılarak veriler myassays.com'a aktarılarak Şekil 6'daki standart grafik aracılığıyla sonuçlar pg/mL olarak hesaplandı.



Şekil 6. İnterlökin 1-beta (IL-1 β) standart grafiği

3.2.10. Serum Paraoksanaz 1 (PON-1) Seviyelerinin Belirlenmesi

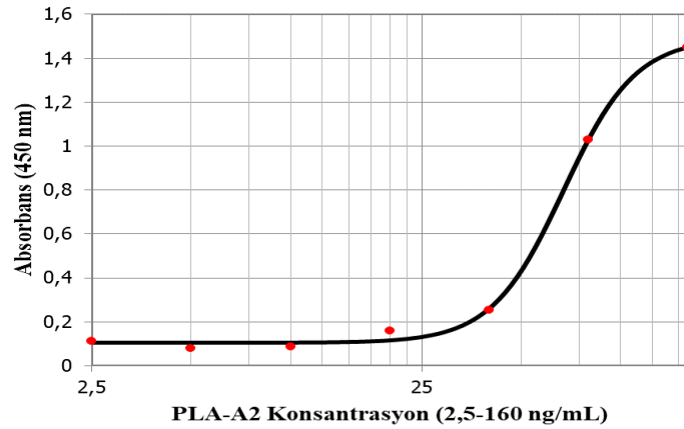
Farelerde serum PON-1 seviyeleri ticari ELISA kiti (BT LAB, Ürün no: E0509Mo, Shangay, Çin) ile kitin belirttiği işlemler uygulanarak belirlendi. 450 nm de kolorimetrik okuma yapılarak veriler myassays.com'a aktarılarak Şekil 7'deki standart grafik aracılığıyla sonuçlar pg/mL olarak hesaplandı.



Şekil 7. Paraoksanaz-1 (PON-1) standart grafiği

3.2.11. Serum Fosfolipaz-A2 (PLA2) Seviyelerinin Belirlenmesi

Farelerde serum PLA2 seviyeleri ticari ELISA kiti (BT LAB, Ürün no: E0267Mo, Shangay, Çin) ile kitin belirttiği işlemler uygulanarak belirlendi. 450 nm de kolorimetrik okuma yapılarak veriler myassays.com'a aktarılarak Şekil 8'deki standart grafik aracılığıyla sonuçlar ng/mL olarak hesaplandı.



Şekil 8. Fosfolipaz-A2 (PLA-A2) standart grafiği

3.2.12. Aort dokusu Tümör Nekroz Faktör α (TNF- α) Seviyelerinin Belirlenmesi

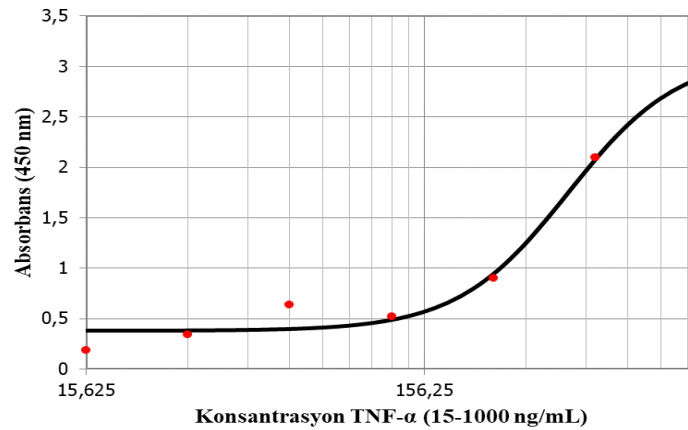
Farelerin aort (aortik kök+aortik ark) dokusunda inflamasyonu değerlendirmek için TNF- α seviyeleri ticari olarak satın alınan TNF- α ELISA kiti (Bostonchem, Ürün no: BLS1395Mo, Boston, Amerika) kullanılarak ölçüldü. Doku homojenatının hazırlanması ve TNF- α ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Homojenatların Hazırlanması

Elde edilen doku 1 mL'lik PBS (%0,01 Triton X-100 içeren) tamponuna alındı. Buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 90 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 10000 xg'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Denevin Yapılışı

1. TNF- α ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak mikropiplakalara uygulandı. Mikropiplaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de absorbansları okundu.
2. Numune konsantrasyonları Şekil 9'daki standart grafiğe göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ancak dokulardaki TNF- α seviyeleri, doku homojenatı protein seviyeleri başına ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 9. Tümör nekroz faktör α (TNF- α) standart grafiği

3.2.13. Aort Dokusu İnterferon Gama (IFN- γ) Seviyelerinin Belirlenmesi

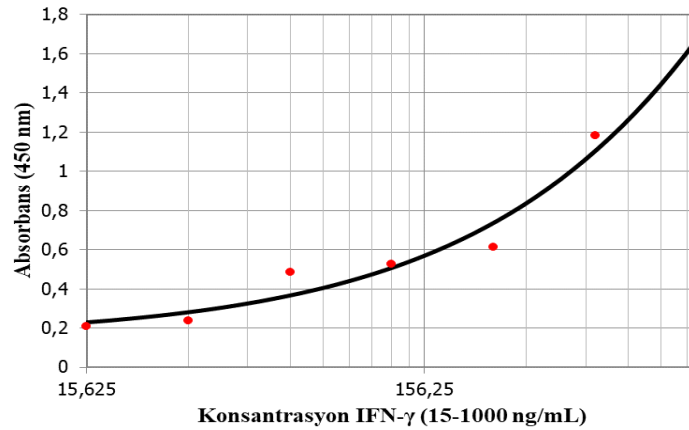
Farelerin aort (aortik kök+aortik ark) dokusunda inflamasyonu değerlendirmek için IFN- γ seviyeleri ticari olarak satın alınan IFN- γ ELISA kiti (Bostonchem, Ürün no: BLS-1132Mo, Boston, Amerika) kullanılarak ölçüldü. Doku homojenatının hazırlanması ve IFN- γ ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Homojenatların Hazırlanması

Elde edilen doku 1 mL'lik PBS (%0,01 Triton X-100 içeren) tamponuna alındı. Buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 90 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 10000 xg'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Denevin Yapılışı

1. IFN- γ ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak mikrotiplere uygulandı. Mikrotiplere okuyucusu kullanılarak 450 nm'de absorbansları okundu.
2. Numune konsantrasyonları Şekil 10'daki standart grafiğe göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ancak dokulardaki IFN- γ seviyeleri, doku homojenatı protein seviyeleri başına ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 10. İnterferon gama (IFN- γ) standart grafiği

3.2.14. Aort Dokusu İnterlökin-6 (IL-6) Seviyelerinin Belirlenmesi

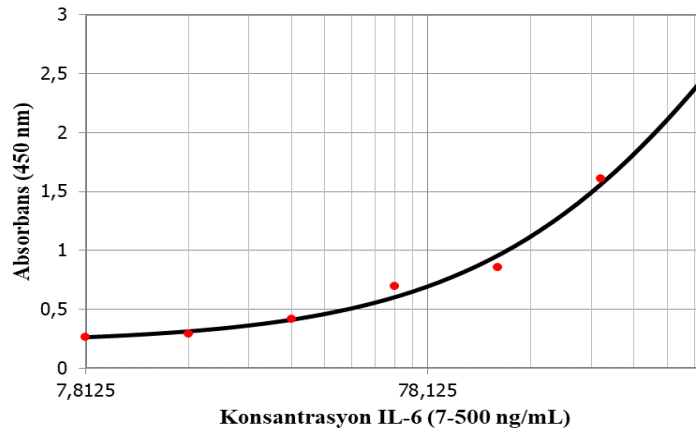
Farelerin aort (aortik kök+aortik ark) dokusunda inflamasyonu değerlendirmek için IL-6 seviyeleri ticari olarak satın alınan IL-6 ELISA kiti (Bostonchem, Ürün no: BLS-1157Mo, Boston, Amerika) kullanılarak ölçüldü. Doku homojenatının hazırlanması ve IL-6 ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Homojenatların Hazırlanması

Elde edilen doku 1 mL'lik PBS (%0,01 Triton X-100 içeren) tamponuna alındı. Buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 90 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 10000 xg'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Denevin Yapılışı

1. IL-6 ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak mikropalakalara uygulandı. Mikropalaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de absorbansları okundu.
2. Numune konsantrasyonları Şekil 11'deki standart grafiğe göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ancak dokulardaki IL-6 seviyeleri, doku homojenatı protein seviyeleri başına ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 11. İnterlökin-6 (IL-6) standart grafiği

3.2.15. Aort Dokusu İnterlökin-12 (IL-12) Seviyelerinin Belirlenmesi

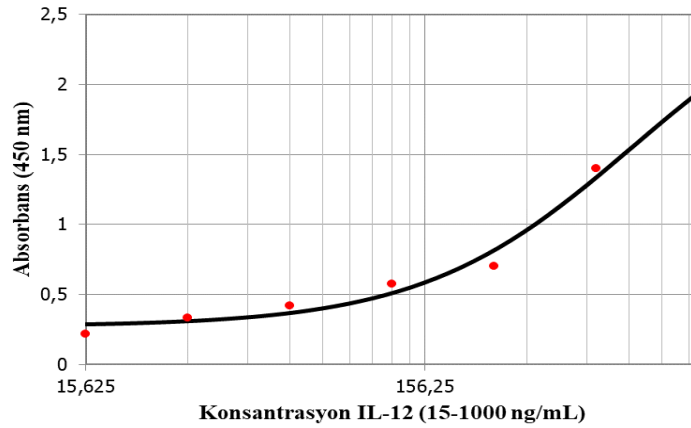
Farelerin aort (aortik kök+aortik ark) dokusunda inflamasyonu değerlendirmek için IL-12 seviyeleri ticari olarak satın alınan IL-12 ELISA kiti (Bostonchem, Ürün no: BLS-9395Mo, Boston, Amerika) kullanılarak ölçüldü. Doku homojenatının hazırlanması ve IL-12 ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Homojenatların Hazırlanması

Elde edilen doku 1 mL'lik PBS (%0,01 Triton X-100 içeren) tamponuna alındı. Buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 90 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 10000 xg'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Denevin Yapılışı

1. IL-12 ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak mikropalakalara uygulandı. Mikropalaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de absorbansları okundu.
2. Numune konsantrasyonları Şekil 12'deki standart grafiğe göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ancak dokulardaki IL-12 seviyeleri, doku homojenatı protein seviyeleri başına ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 12. İnterlökin-12 (IL-12) standart grafiği

3.2.16. Aort Dokusu Miyeloperoksidaz (MPO) Seviyelerinin Belirlenmesi

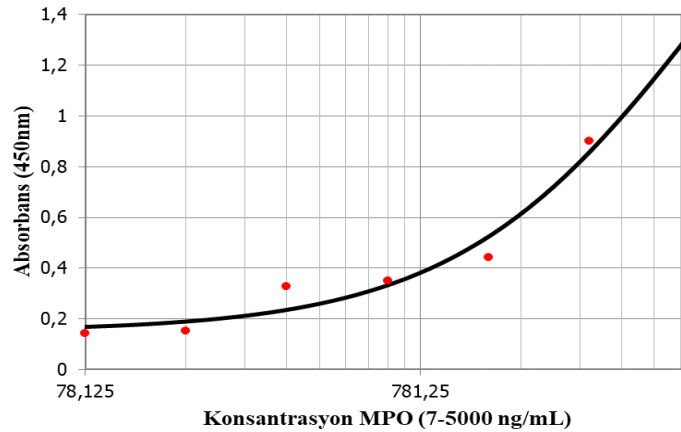
Farelerin aort (aortik kök+aortik ark) dokusunda inflamasyonu değerlendirmek için MPO seviyeleri ticari olarak satın alınan MPO ELISA kiti (Bostonchem, Ürün no: BLS-1662Mo, Boston, Amerika) kullanılarak ölçüldü. Doku homojenatının hazırlanması ve MPO ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Homojenatların Hazırlanması

Elde edilen doku 1 mL'lik PBS (%0,01 Triton X-100 içeren) tamponuna alındı. Buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 90 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 10000 xg'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Denevin Yapılışı

1. MPO ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak mikropalakalara uygulandı. Mikropalaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de absorbansları okundu.
2. Numune konsantrasyonları Şekil 13'deki standart grafiğe göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ancak dokulardaki MPO seviyeleri, doku homojenatı protein seviyeleri başına ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 13. Miyeloperoksidaz (MPO) standart grafiği

3.2.17. Aort Dokusu İnterlökin-10 (IL-10) Seviyelerinin Belirlenmesi

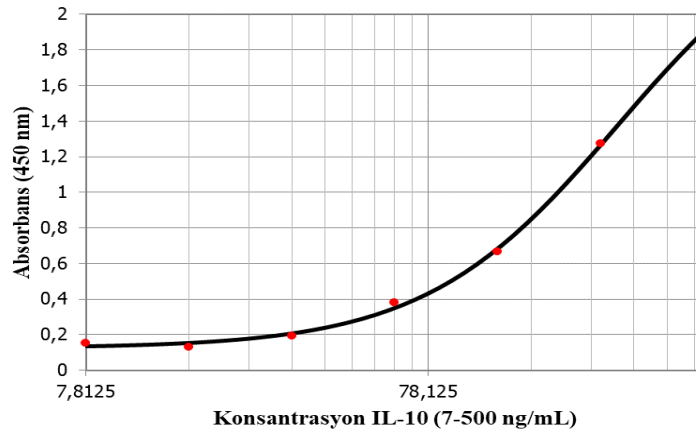
Farelerin aort (aortik kök+aortik ark) dokusunda antiinflamatuvar etkinliği değerlendirmek için IL-10 seviyeleri ticari olarak satın alınan IL-10 ELISA kiti (Bostonchem, Ürün no: BLS-1143Mo, Boston, Amerika) kullanılarak ölçüldü. Doku homojenatının hazırlanması ve IL-10 ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Homojenatların Hazırlanması

Elde edilen doku 1 mL'lik PBS (%0,01 Triton X-100 içeren) tamponuna alındı. Buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 90 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 10000 xg'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Denevin Yapılışı

1. IL-10 ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak mikropalakalara uygulandı. Mikropalaka okuyucusu kullanılarak 450 nm'de absorbansları okundu.
2. Numune konsantrasyonları Şekil 14'deki standart grafiğe göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ancak dokulardaki IL-10 seviyeleri, doku homojenatı protein seviyeleri başına ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 14. İnterlökin-10 (IL-10) standart grafiği

3.2.18. Aort Dokusu ADAM10 Aktivitesinin Belirlenmesi

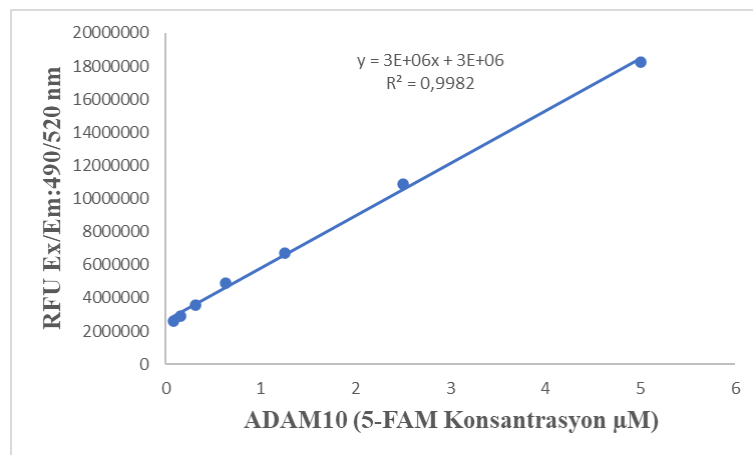
Farelerin aort (aortik kök+aortik ark) dokusunda antiinflamatuvar etkinliği değerlendirmek için ADAM10 seviyeleri ticari olarak satın alınan ADAM10 Aktivite kiti (ANASPEC, Ürün no: AS-72226, Kaliforniya, Amerika) kullanılarak florometrik olarak ölçüldü. Doku homojenatının hazırlanması ve ADAM10 aktivite ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Homojenatların Hazırlanması

Elde edilen doku 1 mL'lik PBS (%0,01 Triton X-100 içeren) tamponuna alındı. Buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 90 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 10000 xg'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Kinetik Okuma

1. ADAM10'nun aktivitesinin kinetik ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak siyah renkli opak mikropalakalara uygulandı. Mikropalaka okuyucusu kullanılarak ex/em: 490/520 nm'de 60 dk boyunca 5'er dakika arayla okundu.
2. Numune konsantrasyonları Şekil 15'deki standart grafik çizildi. Sonuçlar RFU/mg protein cinsinden hesaplandı.



Şekil 15. ADAM10 aktivitesi standart grafiği

3.2.19. Doku ADAM17 Aktivitesinin Belirlenmesi

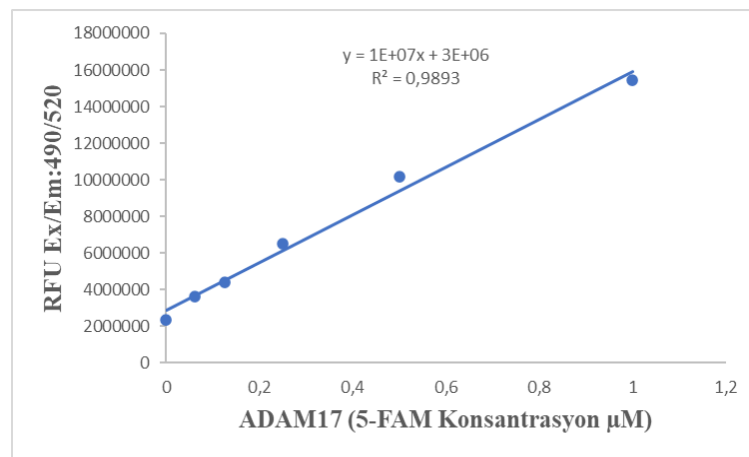
Farelerin aort (aortik kök+aortik ark) dokusunda antiinflamatuvar etkinliği değerlendirmek için ADAM17 seviyeleri ticari olarak satın alınan ADAM17 Aktivite kiti (ANASPEC, Ürün no: AS-72085, Kaliforniya, Amerika) kullanılarak florometrik olarak ölçüldü. Doku homojenatının hazırlanması ve ADAM17 ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Homojenatların Hazırlanması

Elde edilen doku 1 mL'lik PBS (%0,01 Triton X-100 içeren) tamponuna alındı. Buz içerisinde soğuk ortamda, homojenizatör ile 90 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 10000 xg'de 10 dk. santrifüj edildi ve süpernatant alındı.

Kinetik Okuma

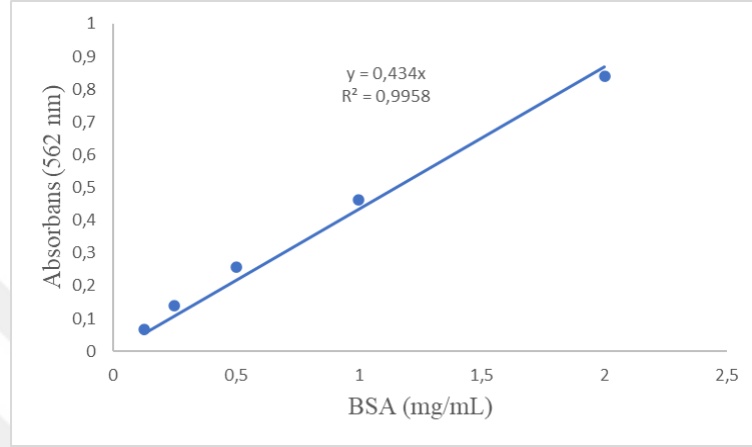
1. ADAM17'nin aktivitesinin kinetik ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak siyah renkli opak mikrotiplere uygulandı. Mikrotiplere okuyucusu kullanılarak ex/em: 490/520 nm'de 60 dk boyunca 5'er dakika arayla okundu.
2. Numune konsantrasyonları Şekil 16'daki standart grafik çizildi. Sonuçlar RFU/mg protein cinsinden hesaplandı.



Şekil 16. ADAM17 aktivitesi standart grafiği

3.2.20. Aort Dokusu Homonejatında Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Ticari kitler için hazırlanan aort doku homojenatında protein tayini bikinkoninik asit (BCA) ölçüm kiti (Sigma-Aldrich) kullanılarak kit protokolüne uygun yapıldı. Standart olarak 2 mg/dL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL ve 0,125 mg/mL'lik BSA kullanıldı. Şekil 17'deki gibi standart grafik çizildi ve sonuçlar mg/mL olarak hesaplandı.



Şekil 17. BCA Standart Grafiği

3.2.21. Histolojik Analizler

Kriyostat kesitler

Deneysel modelin tamamlanmasını takibe çıkarılan karaciğer, kalp ve aortik kök dokusuna ait kesitler 1.5 cm³ hacminde trimlenerek -80°C'de 10 dakika bekletilerek doku örnekleri dondurma medyumum kullanılarak (Sigma-Aldrich, Almanya) -18°C'de kriyostat (Leica 3050S, Leica Biosystems, Almanya) ile 6-8 µm kalınlığında kesitler alındı. Bir sonraki aşamada kesitler Oil O red (Merck Millipore,102419, Almanya) boyası ile üretici firmanın kataloğuna uygun olarak boyandı. Oil O red ile boyandıktan sonra Mayers Hematoksilen (Merck GmbH, Almanya) ile zıt boyaması yapıldı. Kesitlerin Dijital kamera (Olympus DP71, Olympus Corp, Japan) ataçmanlı ışık mikroskobu (Olympus BX51, Olympus Corp, Japan) analiz edilerek fotoğrafları çekildi.

Histolojik doku takip işlemleri

Farelerden çıkarılan karaciğer, aortik kök ve kalp dokusuna ait numuneler 1.5 cm³ hacminde parçalara ayrıldı. Trimlenen karaciğer, aortik kök ve kalp dokusuna ait kesitler %10'luk nötral formalin solüsyonu içinde 24-36 saatleri arasında bekletilerek fiksasyon işlemi uygulandı. Fiksasyon işleminin ardından histolojik değerlendirme doku örnekleri doku takip kasetleri içine konarak doku takip cihazında (Citadel 2000, ThermoScientifi, Almanya) takip edilip işlemlere devam edildi. Sırası ile dokular %50, %60, %70, %80, %96, %100 (x2) lük alkol solüsyonlarından geçirilerek dehidratasyon işlemi uygulandı. Bir sonraki aşamada iki adet ksilen serilerinden bekletilerek şeffaflaştırma işlemi ve ardından sert ve yumuşak paraf,nde bekletilerek parafin inklüzyon işlemi uygulandı (Tablo 5). Doku takibi işleminin ardından doku takip cihazından çıkarılan doku gömme kaseti içindeki karaciğer, aortik kök ve kalp doku örnekleri parafin bloklama cihazı (Leica EG 1150 H) kullanılarak kullanılarak sert parafin (Merck KGAA, Dramstadtı Almanya) ile bloklandı. Sonrasında parafin bloklardan kesit alma işlemine geçildi. Parafin bloklardan rotary mikrotom ile 4-5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak (Leica RM2255) adhesivli lamlara (Isolab GnbH,Almanya) alındı.

İmmünohistokimyasal boyama protokolü

Karaciğer, aortik kök ve kalp dokusuna ait kesitler rotary mikrotom ile 2-3 µm kalınlığında seri kesitler alınarak (Leica RM2255) pozitif şarjlı lamlara (Superior Marinfield Histobond+) alındı.

Elde edilen kesitler deparafininzasyon aşamasından sonra IHC/ISH cihazı kullanılarak (Bond Max, Leica Biosystems, Avustralya) Sortilin primer antikoru (1/100, ab268864, Abcam, Birleşik Krallık), ADAM-10 primer antikoru (1/100, ab227172, Abcam, İngiltere) ve bunlara uygun sekonder antikorlar (ab205718, Abcam, İngiltere) ile inkübe edildi (Tablo 6). Karaciğer, aort kökü ve kalp dokularına ait kesitler her birinde 20 farklı alan çalışma grupları bakımından körleştirilmiliş iki kör histolog tarafından değerlendirilmiştir.

Tablo 5. Histolojik doku takip aşamaları

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10'luk Formalin (Sigma Aldrich, Almanya)	24-36 saat
Dehidratasyon	%50'lik Etanol 1 (Merck KGAA, Almanya)	60 dakika
Dehidratasyon	%50'lik Etanol 2 (Merck KGAA, Almanya)	30 dakika
Dehidratasyon	%60'luk Etanol (Merck KGAA, Almanya)	90 dakika
Dehidratasyon	%70'lik Etanol (Merck KGAA, Almanya)	90 dakika
Dehidratasyon	%80'lik Etanol (Merck KGAA, Almanya)	60 dakika
Dehidratasyon	%96'luk Etanol	60 dakika
Dehidratasyon	%100'luk Etanol 1 (Merck KGAA, Almanya)	60 dakika
Dehidratasyon	%100'luk Etanol 2 (Merck KGAA, Almanya)	60 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 1 (Merck KGAA, Almanya)	30 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2 (Merck KGAA, Almanya)	90 dakika
Parafinizasyon	Yumuşak Parafin (42-44 ⁰ C) (Merck KGAA, Almanya)	60 dakika
Parafinizasyon	Sert Parafin (52-54 ⁰ C) (Merck KGAA, Almanya)	210 dakika

Tablo 6. İmmün boyama prosedürü

İşlem	Madde/Cihaz	Süre
Deparafinizasyon	60 °C'lik Etüv	60 dk
Deparafinizasyon	Ksilen	10 dk
Dehidratasyon	Ksilen	10 dk
Dehidratasyon	%100'lük etanol	5 dk
Dehidratasyon	%96'lık etanol	5 dk
Dehidratasyon	%90'lık etanol	5 dk
Dehidratasyon	%80'lik etanol	5 dk
Dehidratasyon	%70'lik etanol	5 dk
Yıkama	Distile su	5 dk
Endojen Enzim Blokajı	Hidrojen peroksit blok	10 dk
Yıkama	PBSx2	15 saniye
Blokaj	Protein blok	10 dk
Yıkama	PBS	15 saniye
Antikor	Primer antikor	1 saat
Yıkama	PBSx4	15 saniye
Boyama	Biotilylated Goat anti-polyvalent	10 dk
Yıkama	PBSx4	15 saniye
Boyama	SteptavidinPeroxidase	10 dk
Yıkama	PBSx4	15 saniye
Boyama	DAB	5-10 dk
Yıkama	PBSx	15 saniye
Boyama	Harris hematoksilen	3 dk
Yıkama	Musluk suyu	15 saniye
Dehidratasyon	%70'lik etanol	5 dk
Dehidratasyon	%80'lik etanol	5 dk
Dehidratasyon	%90'lık etanol	5 dk
Dehidratasyon	%100'lük etanol	5 dk
Dehidratasyon	%100'lük etanol	5 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	10 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen	10 dk
Kapama	Entellan	Kapama

Semi-kantitatif analiz

Harris hematoxilen ve Eozin G ile boyanan karaciğer dokusuna ait kesitlerin histopatolojik sınıflandırmasında Tablo 7’de gösterildiği gibi non-alkolik karaciğer steatozis modelli hayvan çalışmalarının bulgularına uygun olarak skorlandı (144-146). Aortik kök dokusuna ait örnekler histopatolojik değerlendirilmesinde Virmani ve arkadaşlarının Amerikan Kalp Derneği Ateromatöz Lezyonların Sınıflandırılmasına Benslaiman ve arkadaşlarının çalışmalarına uygun olarak Tablo 8 ve Tablo 9’da gibi skorlanmıştır (147, 148) Kalp dokusunda gözlemlenen histopatolojik değişiklikler ise yüksek yağlı diyet ile indüklenen miyokardiyal hasar çalışmalarını ele alan çalışmalara uygun olarak Sahraoui ve arkadaşlarının çalışmalarına uygun olarak Tablo 10’de gösterildiği gibi skorlanmıştır (149). İmmünopozitif hücrelerin semi-kantitatif skorlaması Tablo 11’de gösterildiği gibi yapılmıştır. Semikantitatif analizler çalışmanın gruplarının bilemeyecek şekilde körleştirilmiş histopatolog tarafından her bir fareye ait kesitlerde rastgele olarak belirlenmiş 20 farklı alan, x20 ve x40’lık objektif büyütmeleleri kullanılarak skorlanmıştır.

Tablo 7. Karaciğer histopatolojik hasar skorlaması (KHHS)

Skor	Bulgu
Çok sayıda lipid dropletleri içeren ve merkezi konumda nükleusları içeren dejeneratif yapıdaki hepatositler	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Dejeneratif hepatositlerin sentrolobular tutulumu	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Dejeneratif hepatositlerin perizonal tutulumu	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
İnflamasyon	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Ödematöz Alanlar	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%

Tablo 8. Amerikan patoloji derneğinin aterom plak patoloji skorlaması

Amerikan Kalp Derneği Ateromatöz Lezyonların Sınıflandırılması	
Lezyon	Histolojik Değişiklik
Patolojik intimal kalınlık	Düz kas hücre proliferasyonu, intimal fibrozis, ekstraselüler lipid fakat lipid core veya nekroz yok
Fibröz kep aterom	Kalın fibröz kep ile iyi formda lipid çekirdeği(core), serbest inflamatuvar hücreler (>80 µm coronary artery >200 µm carotid artery)
İnce fibröz kep aterom	Lipid çekirdeği sınırı ile inflame fibröz dokunun ince kepi
Rüptüre plak	Rüptüre fibröz kep ile lipid çekirdeği ile bağlantılı luminal trombus
Erode plak	Endotelyal ülserasyon ile luminal trombus, lipid çekirdeği küçük ya da yok ve lümenle bağlantısız
Kalsifiye lezyon	Şiddetli kalsifiye plak, trombus veya lipid çekirdeği ile veya değil

Tablo 9. Aort histopatolojik hasar skorlaması (AHHS)

Skor	Bulgu
Subendoteliyal Adiposit (foamsı hücre) ve ekstraselüler lipid birikimi	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Tunika media tabakasında adiposit ve ekstraselüler lipid birikimi	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Fibröz Kep	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Erode Plak Oluşumları	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Kalsifiye Plak oluşumları	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%

Tablo 10. Kalp dokusunun histopatolojik skorlaması (KAHHS)

Skor	Bulgu
Endokardiyumun Subendokardiyale Tabakasında	
Adiposit (foamsı hücre) ve ekstraselüler lipid birikimi	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Tunika media tabakasında adiposit ve ekstraselüler lipid birikimi	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Dejeneratif Kardiyomiyositler	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Ödematöz Alanlar	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%

Tablo 11. İmmünopozitif hücrelerin semi-kantitatif skorlaması

Skor	Bulgu
1	≤5%
2	≤25%
3	≤50%
0	≤75%

3.2.22. İstatistiksel Analiz

Biyokimyasal verilerin istatistiksel analizleri SPSS 23.0 (IBM Corp. IL, Chicago, USA) programı kullanılarak yapıldı. Verilerin normal dağılıp dağılmadığını kontrol etmek için Kolmogrov-Smirnov testi kullanıldı. Veriler, normal olmayan dağılım için medyan (Q1-Q3) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki karşılaştırmalar, Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. Bonferroni düzeltmesi ile ilgili olarak, $\alpha=0,05/16=0,0031$ 'in istatistiksel anlamlılığa sahip olduğu belirlendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0,003$ olarak kabul edildi.

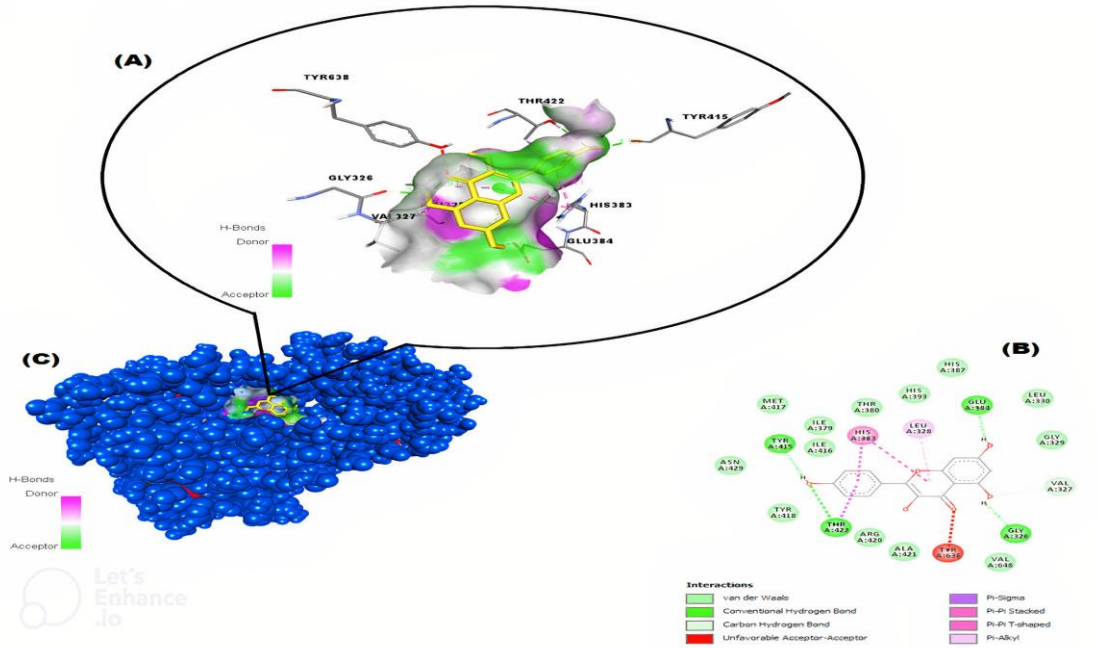
Histolojik olarak elde edilen semi-kantitatif veriler SPSS 23.0 istatistik programı kullanılarak hesaplanmıştır. Shapiro-Wilk test, Q-Q plot, Skewnes-Kurtosis değerleri ve Levene's testleri yapılarak verilerin normal dağılıma uygunluğu değerlendirildi. Non-parametrik veriler ise median ve %25-%75 interquartile range şeklinde hesaplanarak gruplar arası farklar sırası ile Kruskal Wallis ve Tamhane T2 test kullanılarak değerlendirilmiştir. $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Elde edilen verilerin standart grafikleri, www.myassays.com adresinde Dört Parametrelili Lojistik (4PL) Regresyon ve Microsoft Office Excel 2023 kullanılarak çizilmiş, konsantrasyonları hesaplanmıştır. Bulgular ise OriginPro23 (Origin Lab, USA) programı yardımıyla çizilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. *in silico* Bulgular

İncelenen ligandların ADAM10/17'ye karşı inhibitör etkinliklerinin moleküler eşleşme çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Bu simülasyonlar tahmin edilen protein-ligand bağlanma enerjilerini, Ki değerlerini ve potansiyel ligand bağlanma bölgelerini belirledi. Bu eşleşmede kullanılan tüm ligandların ve referans molekülün başarılı bir şekilde kenetlenmesinden sonra, sonuçlar bize ligandların hedef proteinlerle önemli inhibitör kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir (Tablo 12). Ligandlar arasından ADAM10/17'ye yönelik en yüksek inhibisyon kapasitesine sahip olan kampferol ve galangin'in hedef bölgedeki en iyi eşleşmiş pozisyonları, etkileşime girdiği aminoasit kalıntıları ve çeşitli etkileşimleri Şekil 18 ve Şekil 19'da verilmiştir. Tüm ligandlar inhibitör etkinlik gösterirken, referansa göre; ADAM10 için en iyi inhibitör etkinliğe kampferol sahipken, ADAM17 için en iyi etkinliğe sahip olan ligand olarak galangin bulunmuştur.



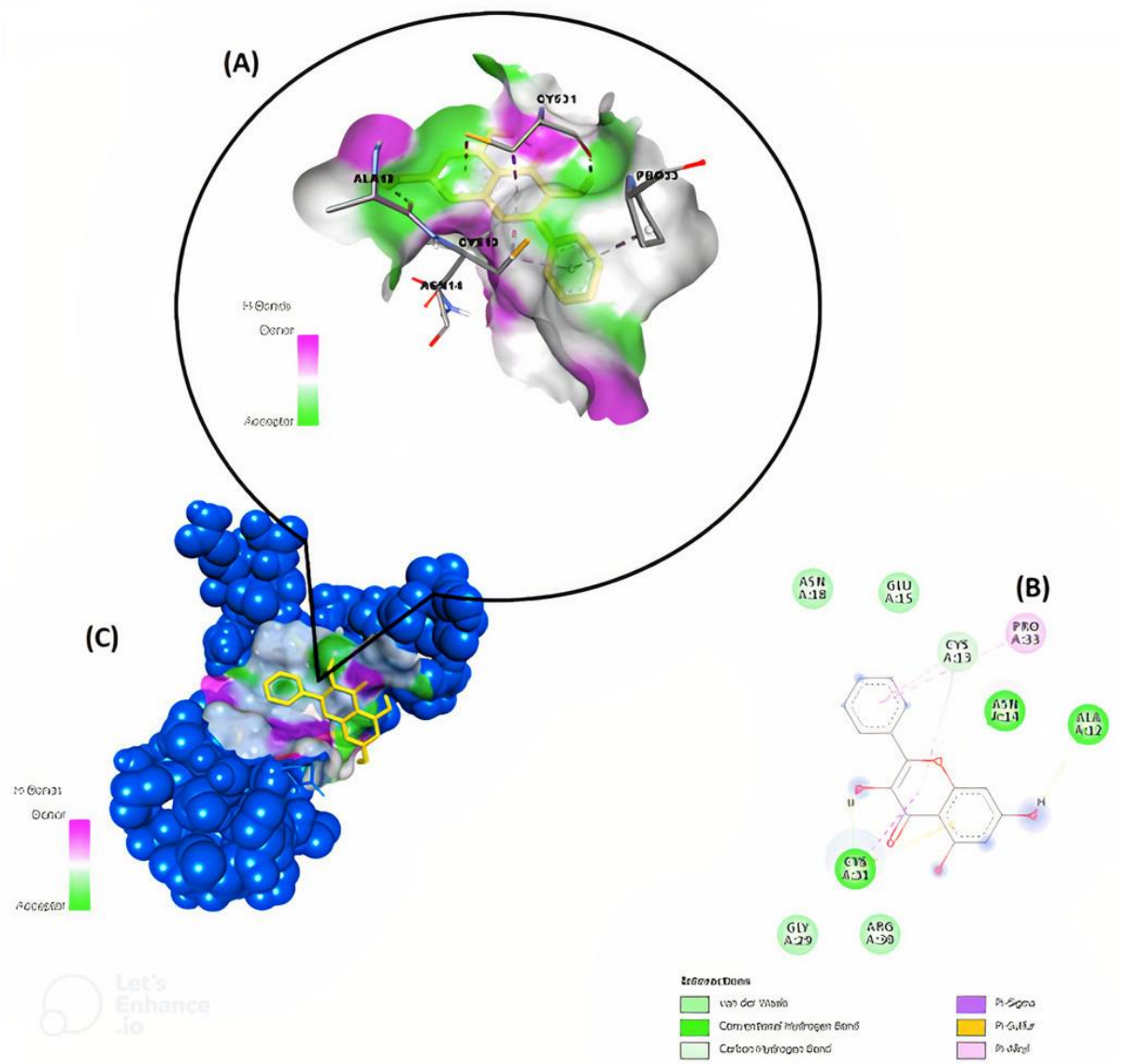
Şekil 18. Kampferolün ADAM10 ile etkileşimi

(C) bağlanma pozisyonu, mavi şekilli molekül reseptörü ve sarı şekilli molekül ligandı gösterir. ADAM10 Ekstraselüler domaininin kaempferol ile iki boyutlu (B) ve üç boyutlu (A) etkileşim analizi.

Tablo 12. İn silico bulgular

Reseptör Adı	Ligand Adı	Bağlanma Enerjisi (kcal/mol)	Ki
ADAM10 Ekstraselüler Domain (Zincir: A) EC: 3.4.24.81	Pinosembrin	-8,05	1,26 µM
	Kafeik Asit	-6,04	37,6 µM
	Klorojenik Asit	-6,96	7,93 µM
	Kuersetin	-8,07	1,21 µM
	Kafeik Asit Fenil Esteri	-8,38	716,06 µM
	Trans-sinamik Asit	-5,49	94,68 µM
	Mirisetin	-7,91	1,59 µM
	Galangin	-8,34	776,6 µM
	Krisin	-8,03	1,31 µM
	Naringenin	-8,45	635,9 nM
	Kampferol	-8,59	505,9 nM
	Reference Molecule*	-4,49	306,5 nM
ADAM17 Membran Proksimal Domain EC: 3.4.24.86	Pinosembrin	-5.30	129.85 µM
	Kafeik Asit	-4.64	398.29 µM
	Klorojenik Asit	-5.21	152.67 µM
	Kuersetin	-5.11	178.68 µM
	Kafeik Asit Fenil Esteri	-5.16	164.77 µM
	Trans-sinamik Asit	-4.77	316.48 µM
	Mirisetin	-4.84	282.89 µM
	Galangin	-5.65	72.29 µM
	Krisin	-5.38	113.77 µM
	Naringenin	-5.54	86.58 µM
	Kampferol	-5.44	103.74 µM
	Referans Molekül*	-6.84	21.99 µM

*referans molekül: $C_{28}H_{41}N_5O_6S$ / GW280264X.

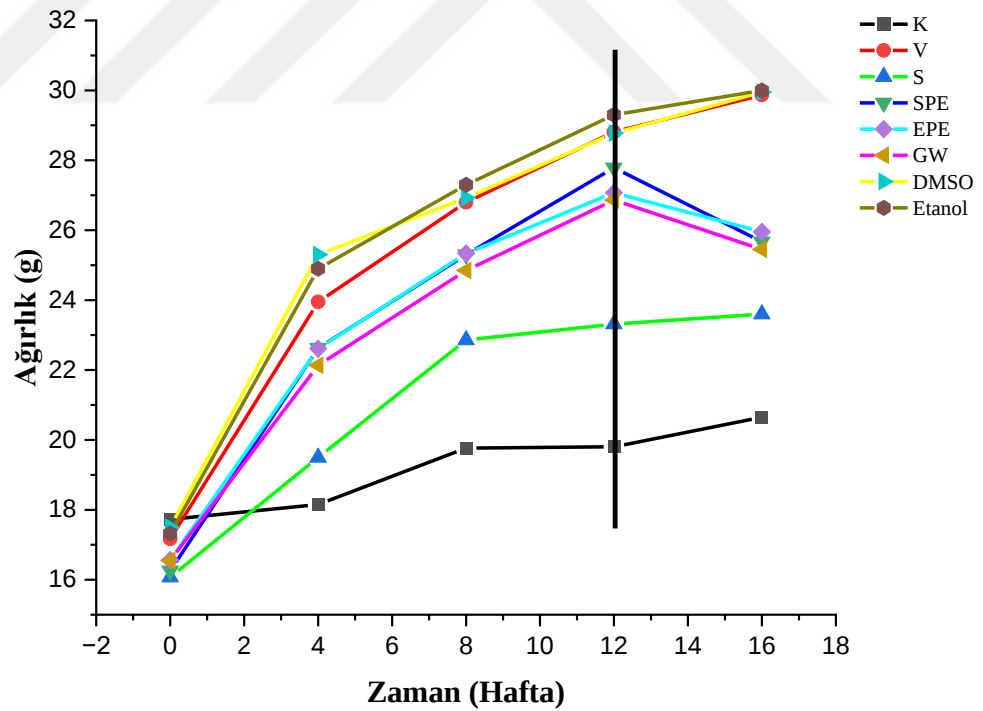


Şekil 19. Galanginin ADAM17 ile etkileşimi

(C) bağlanma pozisyonu, mavi şekilli molekül reseptörü ve sarı şekilli molekül ligandı gösterir. ADAM17 membran proksimal domaininin galangin ile iki boyutlu (B) ve üç boyutlu (A) etkileşim analizi.

4.2. Deney Gruplarının Ağırlık Değerleri

Deney gruplarının başlangıçtan itibaren 16. Haftanın sonuna kadar dört haftada bir ölçülen ağırlıkları Şekil 20’de verilmiştir. Çalışma gruplarının deneye başlangıç ağırlıkları arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,003$). Ancak, 4., 8. ve 12. haftanın ardından V, SPE, EPE, GW, DMSO ve Etanol gruplarında yer alan farelerin ağırlıkları K grubundakilere göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,003$). Bu grupların kendi aralarında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,003$). S grubunda yer alan farelerin ağırlıkları kontrol grubuna göre 8., 12. ve 16. haftanın sonunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,003$). SPE, EPE ve GW gruplarında ki hayvanların ağırlığı 4 haftalık enjeksiyon sonrası 16.haftada V, DMSO ve Etanol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük ($p<0,003$), K grubuna göre anlamlı yüksek ($p<0,003$), S grubuyla ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,003$).



Şekil 20. Deney gruplarının ağırlıkları. Siyah çizgi: SPE, EPE ve GW enjeksiyon başlangıcı.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. Serum Rutin Biyokimya Parametrelerinin Seviyeleri

Deney gruplarının serumlarında ölçülen Glu, TG, TK, ALT, AST ve BUN değerleri Tablo 12’de görülmektedir. 16 haftalık deney sonrasında SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre TK ve TG seviyeleri anlamlı olarak düşük ($p<0,003$), K grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Deneyde kullanılan ekstraktların karaciğer ve böbrek fonksiyonları değerlendirmek için ölçülen parametrelerde ise AST dikkat çekmiştir. S, EPE ve Etanol gruplarında AST seviyeleri K ve V grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,003$). Glu değerleri EPE ve GW gruplarında K grubuna göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0,003$). BUN ve ALT ölçümlerinde ise gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,003$).

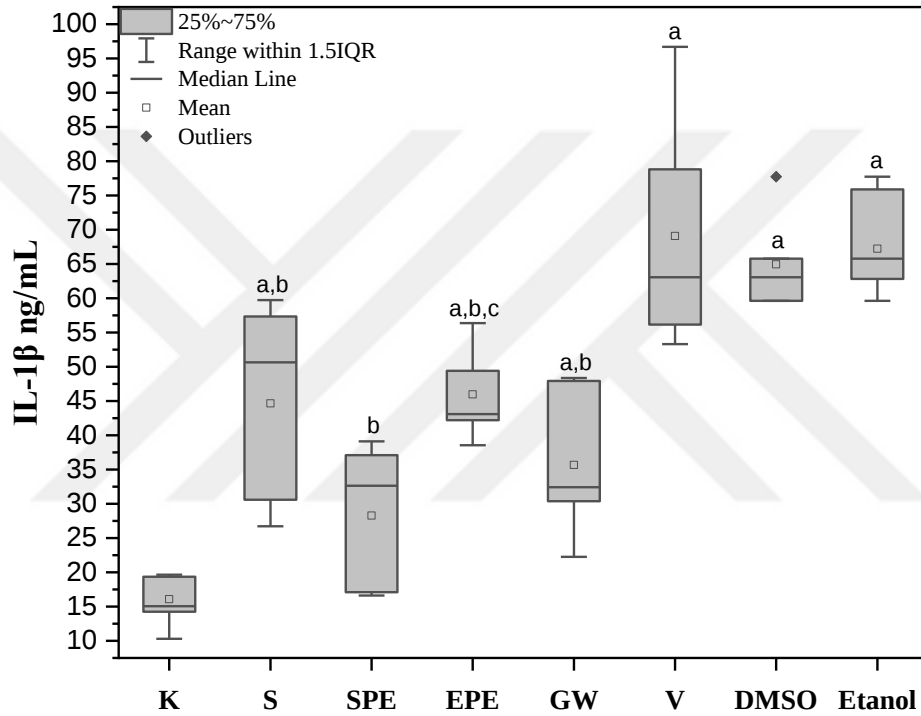
Tablo 13. Serum rutin biyokimya parametrelerinin seviyeleri

Parametreler								
Med (Q1-Q3)	K	V	S	SPE	EPE	GW	DMSO	Etanol
Glu (mg/dL)	162 (161-168)	185 ^a (180,5-186,5)	116 ^{a, b} (109-119)	154 ^{a, b} (152-160)	118 ^{a, b, c} (116-122,5)	133 ^{a, b} (123,5-143,5)	116 ^{a, b, c} (115-118)	115 ^{a, b, c} (109,8-122,5)
TG (mg/dL)	76 (72-82)	114 ^a (110-117)	72 ^b (70-79)	54 ^{a, b} (52-58)	57 ^{a, b} (54,5-62)	57 ^{a, b} (51-62,5)	127 ^a (120,8-132)	97 ^a (92,3-101,3)
TK (mg/dL)	136 (128-154)	1369 ^a (1355,5-1412,5)	134 (129-138)	1226 ^{a, b} (1212-1267)	1246 ^{a, b} (1103-1259)	1285 ^{a, b} (1253-1326)	1350 ^a (1318,2-1404,6)	1410 ^a (1327,5-1505)
ALT (U/L)	42 (38-44)	36 (30-42)	42 (36-46)	20 ^{a, b} (19-22)	40 (36-50)	34 (32-38,5)	25 ^{a, b} (24-26)	35 (34-37)
AST (U/L)	154 (152-154)	163 (161,5-166)	252 ^{a, b} (228-254)	142 ^{a, b} (141-147)	280 ^{a, b, c} (275,5-280,5)	213 ^{a, b, c} (202,5-217)	143 (138,5-147)	240,5 ^a (220,5-265,3)
BUN (mg/dL)	28 (24-30)	28 (27-28,5)	34 (31-34)	30 (26-32)	28 (28-28,5)	28 (22-34)	35 (34-36,5)	43,5 (41,5-46,8)

Sonuçlar; Median (Q1-Q3) olarak ifade edilmiştir. a: K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0,003), b: V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0,003), c: SPE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı (p<0,003)

4.3.2. Serum IL-1 β Seviyeleri

Deney gruplarının serumunda aterosklerozda inflamasyonu değerlendirmek amacıyla ölçülen aterojenik sitokinlerden IL-1 β seviyeleri Şekil 21’de verilmiştir. SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre IL-1 β seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düşüktür ($p<0,003$). Ayrıca SPE grubuyla K grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,003$)

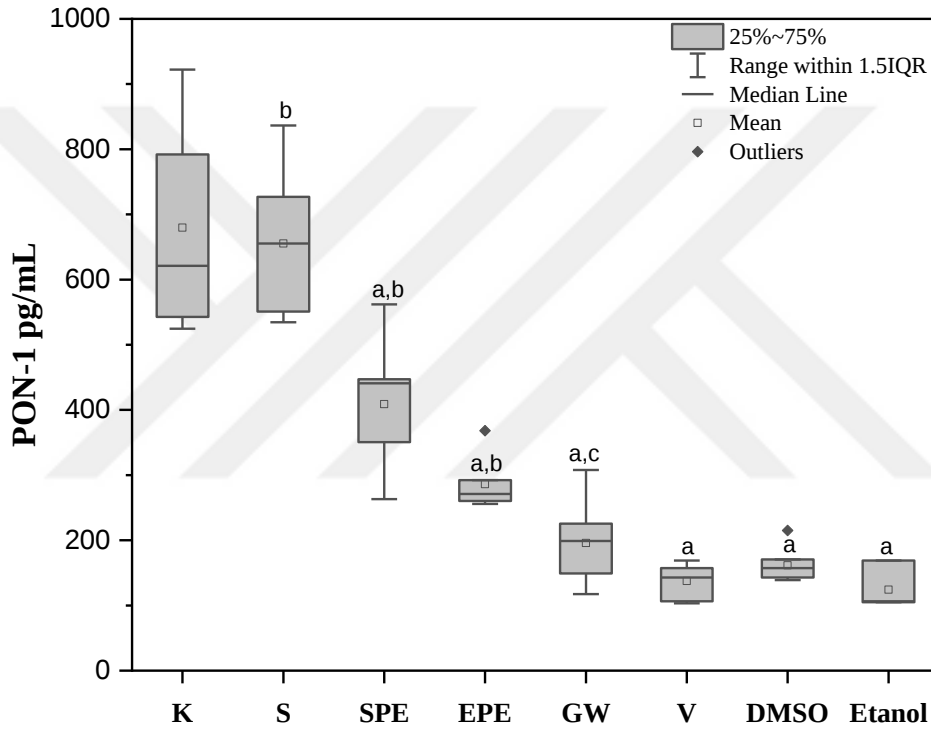


Şekil 21. Serum IL-1 β seviyeleri

a: K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), b: V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), c: SPE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$)

4.3.3. Serum PON-1 Seviyeleri

Deney gruplarının serumunda aterosklerozda oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla ölçülen aterojenik sitokinlerden PON-1 seviyeleri Şekil 22’de verilmiştir. SPE ve EPE gruplarında V grubuna göre PON-1 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı yüksektir ($p<0,003$).

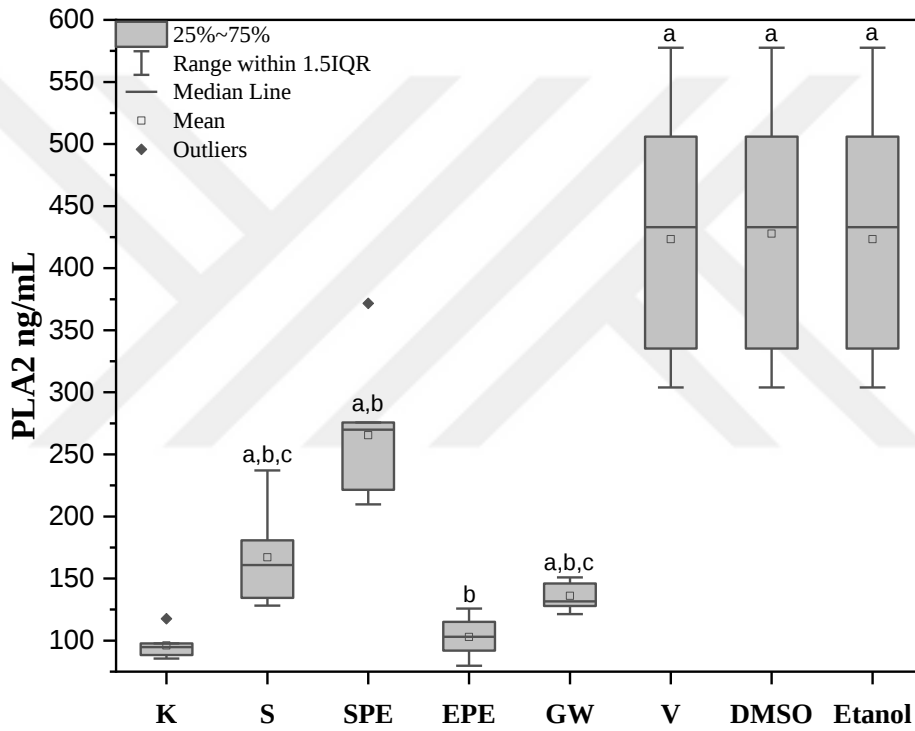


Şekil 22. Serum PON-1 seviyeleri

a: K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), b: V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), c: SPE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$).

4.3.4. Serum PLA2 Seviyeleri

Deney gruplarının serumunda aterosklerozda oksidatif stres ve inflamasyonu değerlendirmek amacıyla ölçülen aterojenik sitokinlerden PLA2 seviyeleri Şekil 23’de verilmiştir. SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre PLA2 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düşüktür ($p<0,003$). Ayrıca EPE grubuyla K grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,003$).

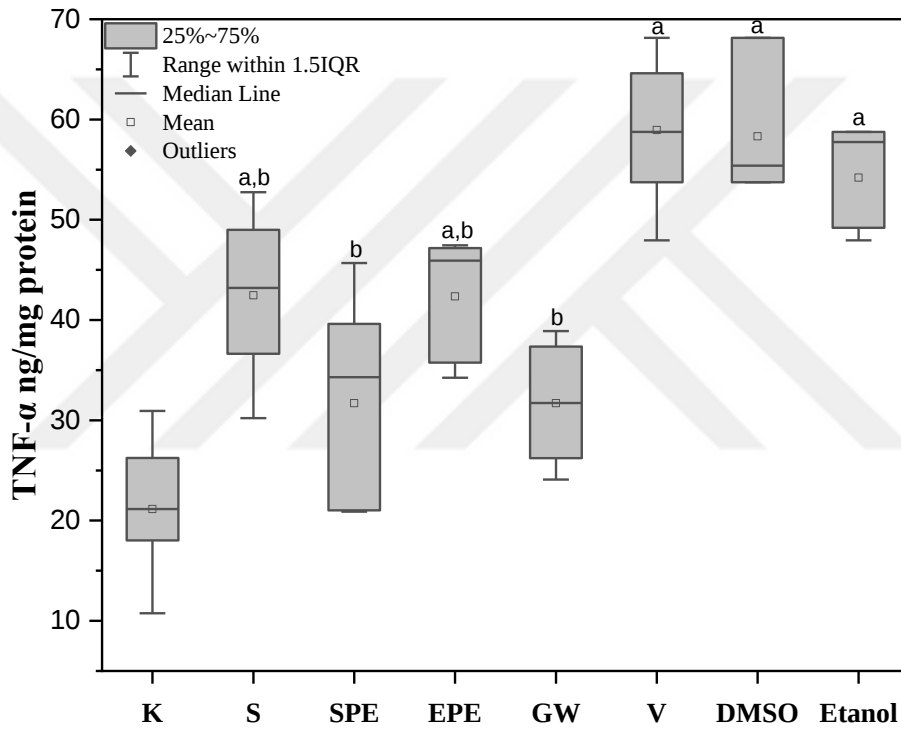


Şekil 23. Serum PLA2 seviyeleri

a: K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), b: V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), c: SPE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$).

4.3.5. Aort Dokusu TNF- α Seviyeleri

Deney gruplarının aortik ark ve aortik kökünde aterosklerozda inflamasyonu değerlendirmek amacıyla ölçülen aterojenik sitokinlerden TNF- α seviyeleri Şekil 24'te verilmiştir. SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre TNF- α seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düşüktür ($p<0,003$). Ayrıca SPE grubuyla K grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,003$).

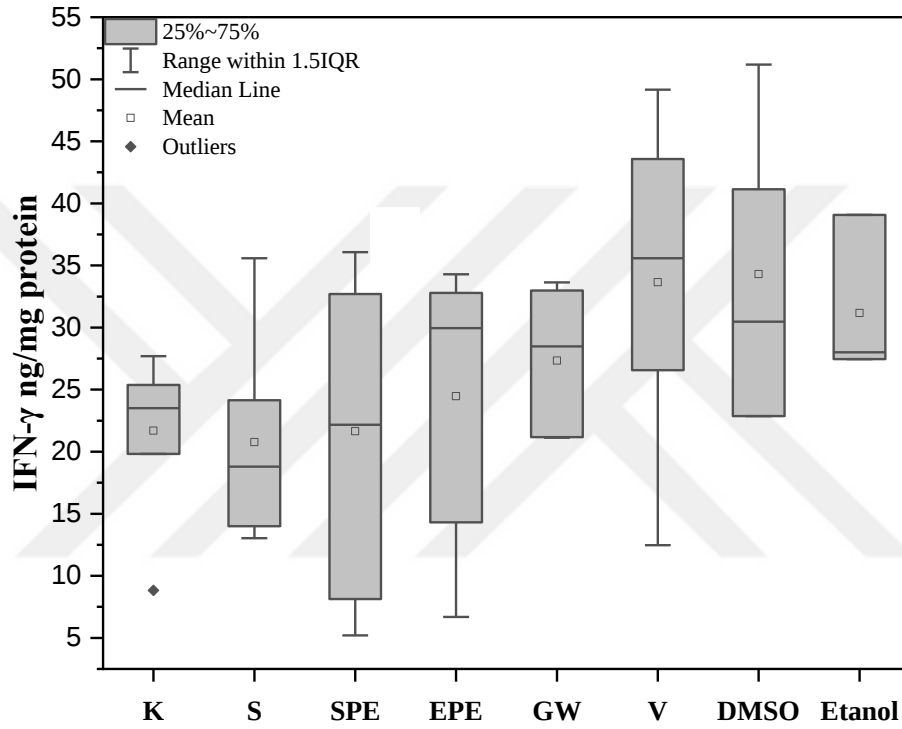


Şekil 24. Aort Dokusu TNF- α Seviyeleri

a: K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), b: V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$).

4.3.6. Aort Dokusu IFN- γ Seviyeleri

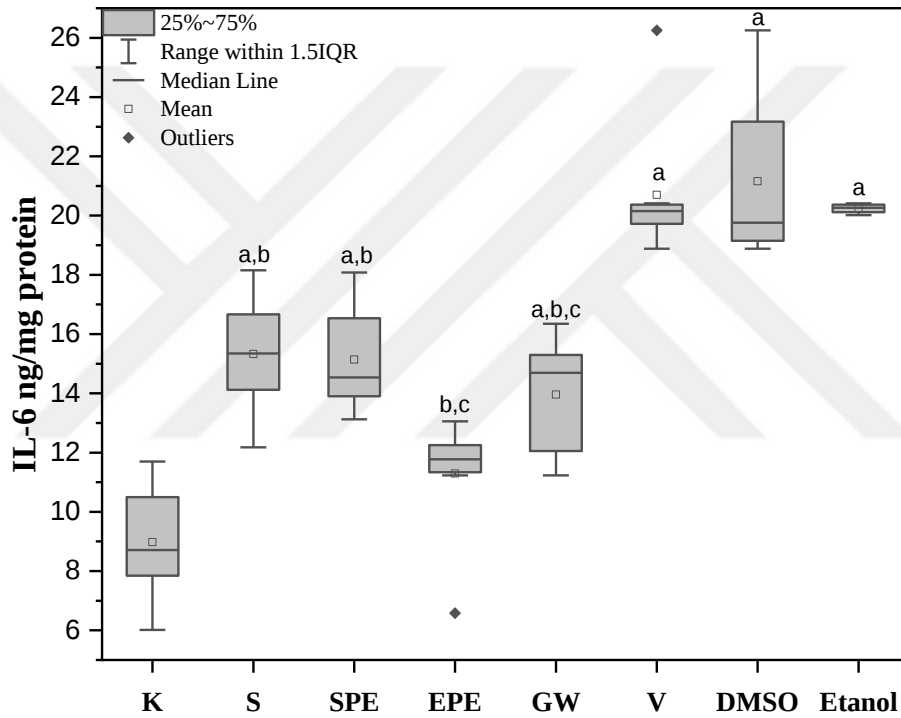
Deney gruplarının aortik ark ve aortik kökünde aterosklerozda inflamasyonu değerlendirmek amacıyla ölçülen aterojenik sitokinlerden IFN- γ seviyeleri Şekil 25'te verilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,003$).



Şekil 25. Aort Dokusu IFN- γ seviyeleri

4.3.7. Aort Dokusu IL-6 Seviyeleri

Deney gruplarının aortik ark ve aortik kökünde aterosklerozda inflamasyonu değerlendirmek amacıyla ölçülen aterojenik sitokinlerden IL-6 seviyeleri Şekil 26’te verilmiştir. SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre IL-6 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düşüktür ($p<0,003$). Ayrıca EPE grubuyla K grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,003$).

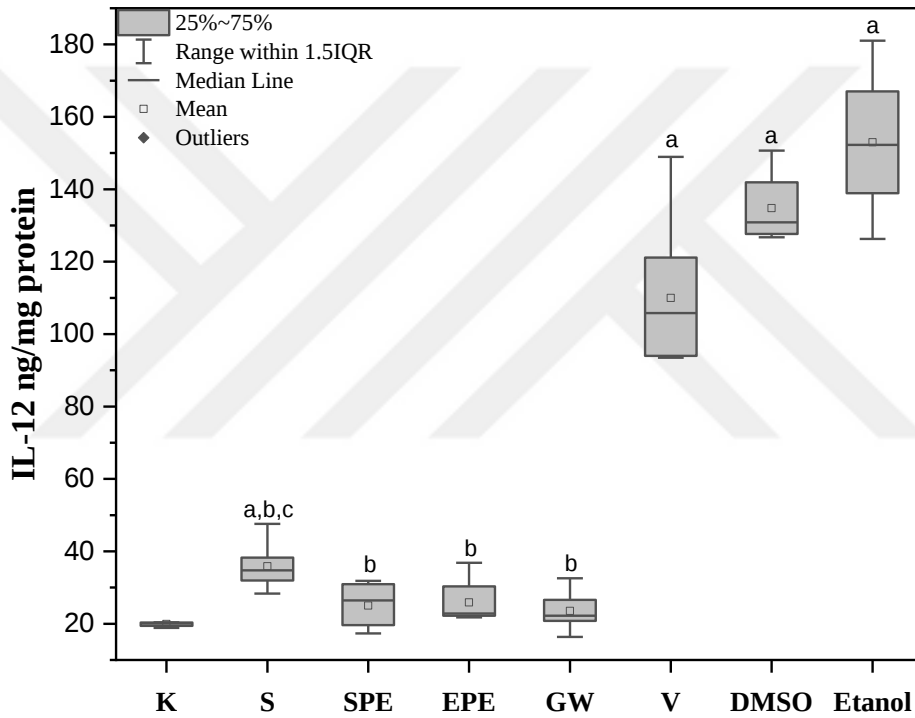


Şekil 26. Aort Dokusu IL-6 Seviyeleri

a: K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), b: V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), c: SPE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$).

4.3.8. Aort Dokusu IL-12 Seviyeleri

Deney gruplarının aortik ark ve aortik kökünde aterosklerozda inflamasyonu değerlendirmek amacıyla ölçülen aterojenik sitokinlerden IL-12 seviyeleri Şekil 27’da verilmiştir. SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre IL-12 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düşüktür ($p<0,003$). Ayrıca EPE grubuyla K grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,003$).

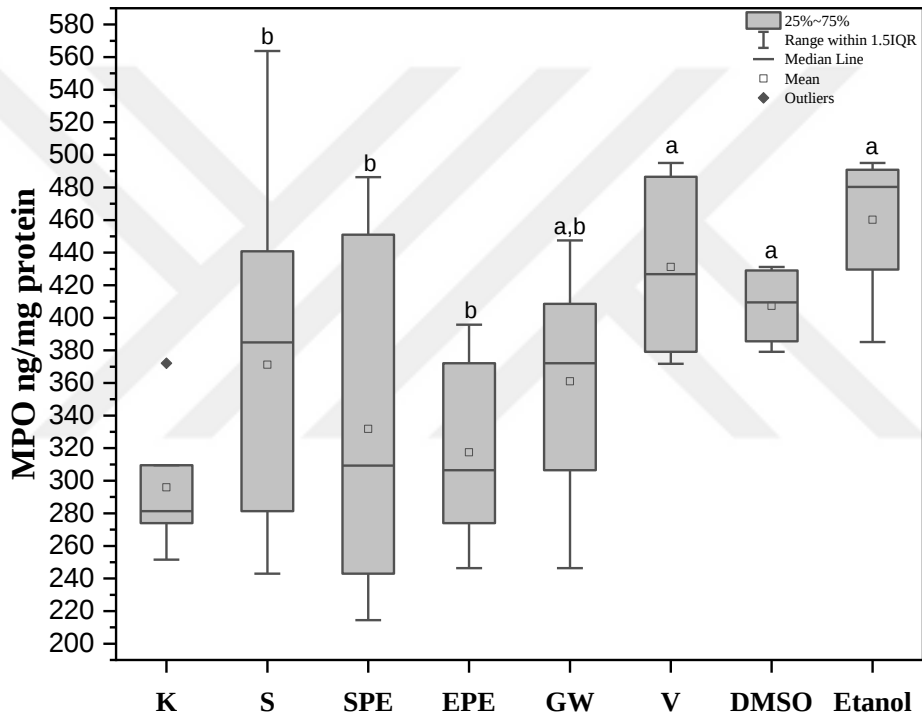


Şekil 27. Aort Dokusu IL-12 seviyeleri

a: K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), b: V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), c: SPE grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$).

4.3.9. Aort Dokusu MPO Seviyeleri

Deney gruplarının aortik ark ve aortik kökünde aterosklerozda inflamasyonu değerlendirmek amacıyla ölçülen aterojenik sitokinlerden MPO seviyeleri Şekil 28’de verilmiştir. SPE ve EPE gruplarında V grubuna göre MPO seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı düşüktür ($p<0,003$). Ayrıca SPE grubuyla K grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p>0,003$).

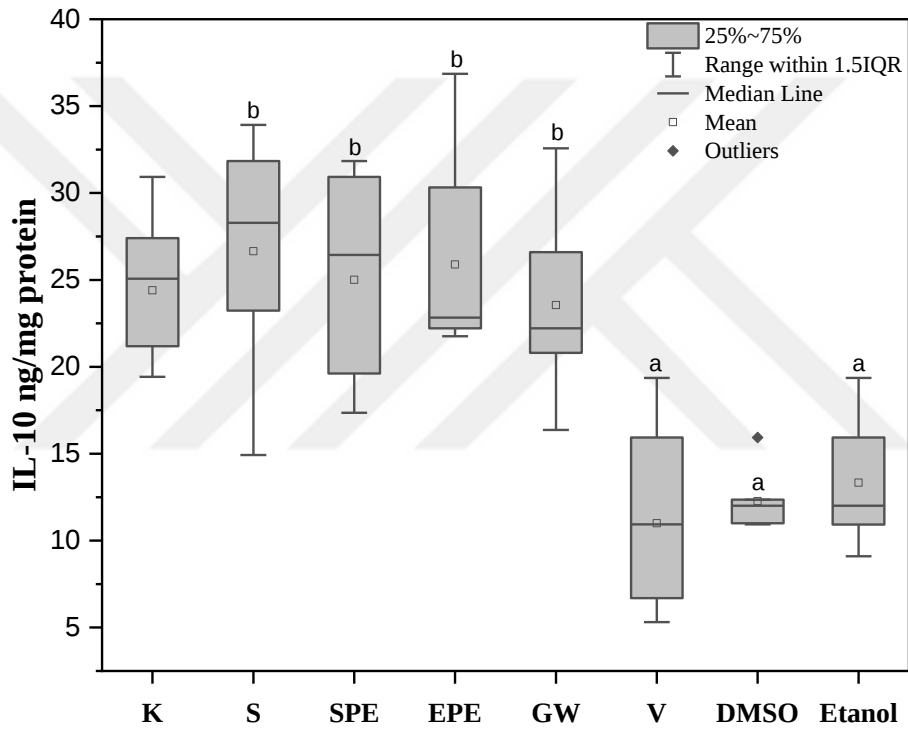


Şekil 28. Aort Dokusu MPO seviyeleri

a: K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$), b: V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p<0,003$).

4.3.10. Aort Dokusu IL-10 Seviyeleri

Deney gruplarının aortik ark ve aortik kökünde aterosklerozda inflamasyonu değerlendirmek amacıyla ölçülen aterojenik sitokinlerden IL-10 seviyeleri Şekil 29'da verilmiştir. SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre IL-10 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı yüksektir ($p < 0,003$). Ayrıca SPE, EPE ve GW grubuyla K grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($p > 0,003$).

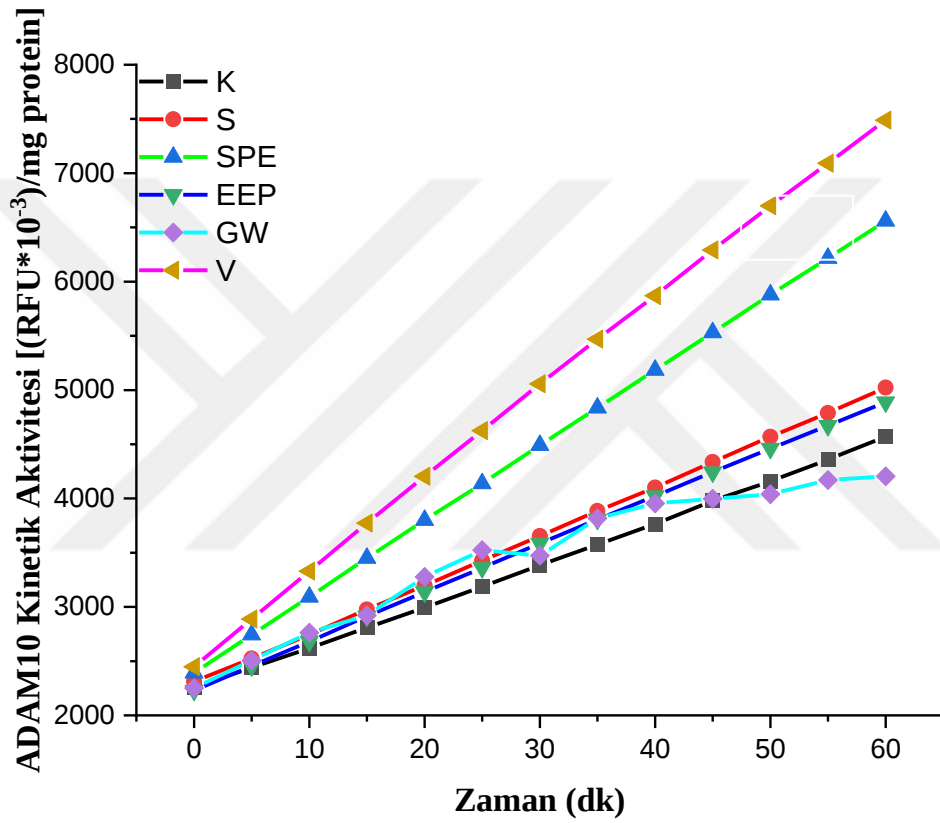


Şekil 29. Aort Dokusu IL-10 seviyeleri

a: K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,003$), b: V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0,003$).

4.3.11. Aort Dokusu ADAM10 Aktivitesi

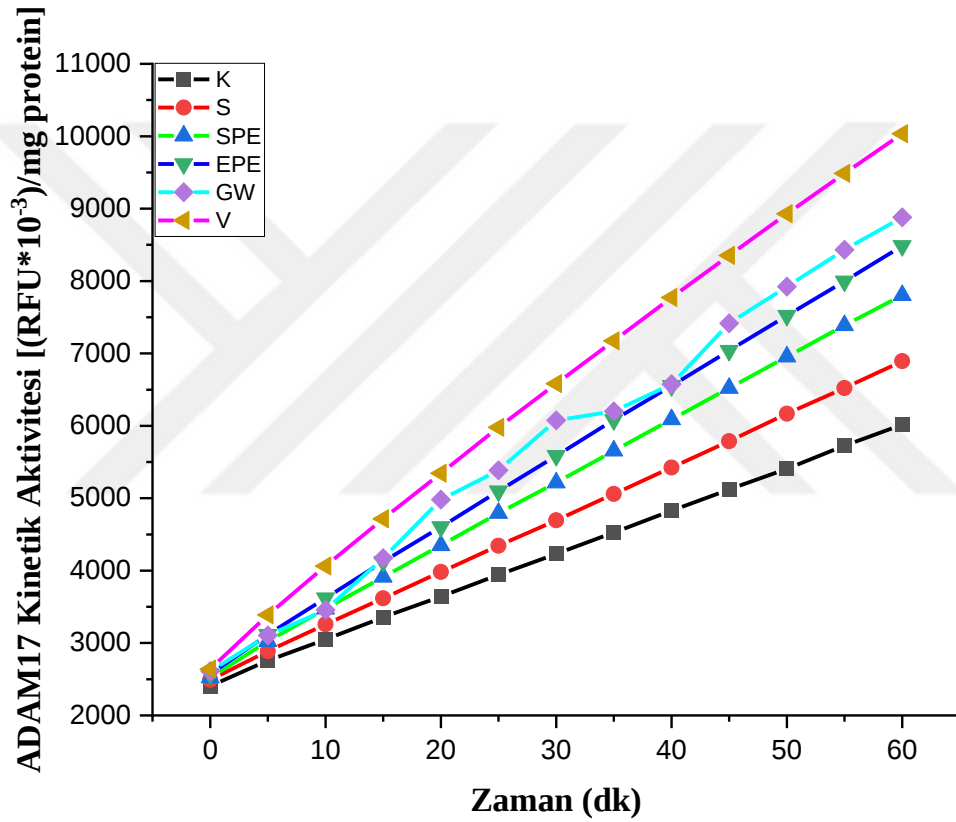
Deney gruplarının aortik ark ve aortik kökünde aterosklerozda aktivitesi değerlendirilen ADAM10'un kinetik ölçüm sonuçları Şekil 30'de verilmiştir. SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre ADAM10 aktivitesi (15., 30., 45. ve 60. dk) istatistiksel olarak anlamlı düşüktür ($p<0,003$).



Şekil 30. Aort Dokusu ADAM10 aktivitesi kinetik ölçüm sonuçları

4.3.12. Aort Dokusu ADAM17 Aktivitesi

Deney gruplarının aortik ark ve aortik kökünde aterosklerozda aktivitesi değerlendirilen ADAM17'nin kinetik ölçüm sonuçları Şekil 31'de verilmiştir. SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre ADAM17 aktivitesi (15., 30., 45. ve 60. dk) istatistiksel olarak anlamlı düşüktür ($p < 0,003$). SPE grubuyla K grubu arasında istatistiksel olarak fark yoktur ($p > 0,003$).



Şekil 31. Aort Dokusu ADAM17 aktivitesi kinetik ölçüm sonuçları

4.4. Histolojik Bulgular

4.4.1. Aortik Kök Dokusu Histolojik Bulguları

Çalışma sonucu elde edilen aortik kök dokusunun Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanmış temsili görüntüsü Resim 2’de, Oil Red O ile boyanmış ışık mikroskobu temsili görüntüsü Resim 3’de, ADAM10 ve Sortilin primer antikoruyla muamele edilmiş görüntüleri ise Resim 4 ve Resim 5’de verilmiştir. Skorlamalar ise Tablo 13 ve Tablo 14’te sunulmuştur.

Tablo 14. Aortik kök histopatolojik hasar skorlaması bulguları (AHHS, median - %25 - %75 interquartlie range).

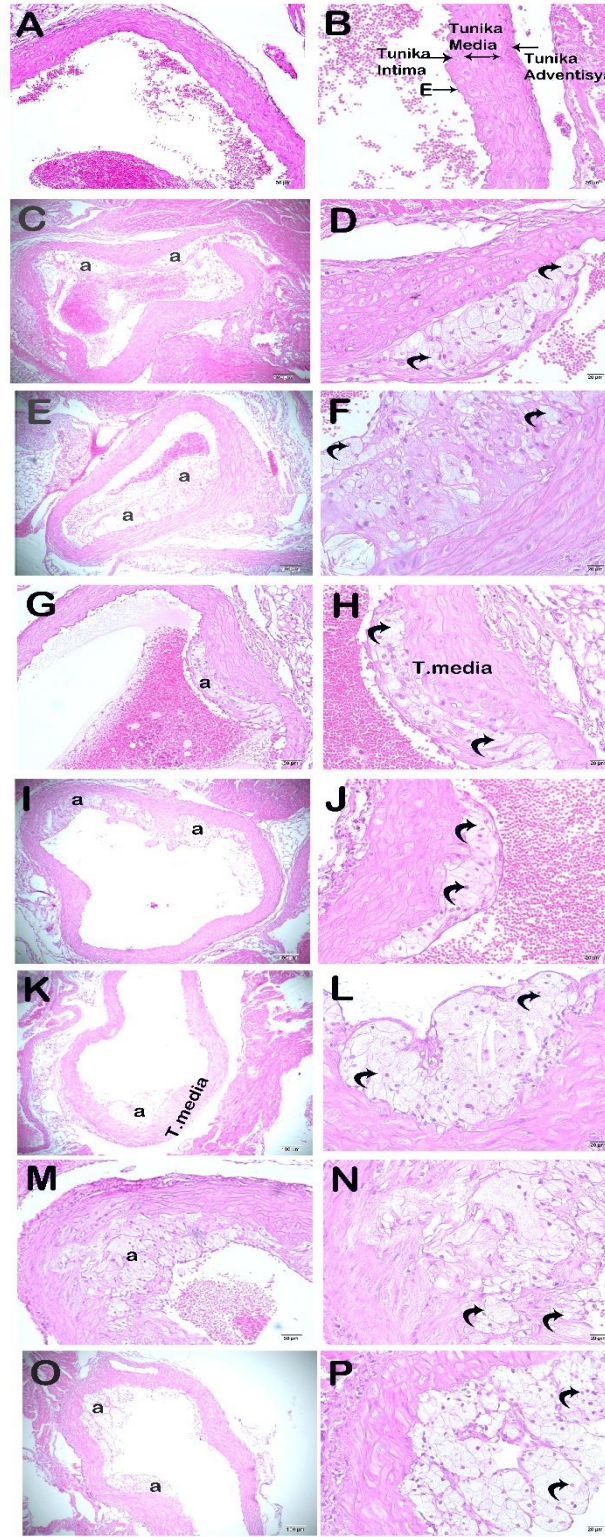
Grup	Subendoteliyal Tutulum	Tunika Media Tutulum	Fibroz Kep	Erode Plak	AHHS
K	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
S	2(2-2) ^a	1(1-2) ^a	0(0-0.5)	0(0-0)	2(2-2) ^a
V	2(2-3) ^a	1(1-1) ^a	0(0-0.5)	0(0-0)	2(2-3) ^a
SPE	1(0.5-1) ^{a,e}	0(0-0.5) ^{b,e,f}	0(0-0.5)	0(0-0)	1(0.5-1) ^{a,e,h}
EPE	0.5(0-1) ^e	0(0-1) ^{b,g,e}	0(0-0)	0(0-0)	0.5(0-1) ^{a,e,h}
GW	0.5(0-1) ^{a,e,h}	0(0-1) ^{b,e}	0(0-0)	0(0-0)	1(0-1) ^{a,e,h}
DMSO	2(2-2.5) ^{a,i,j,k}	1(0-1) ^{a,c}	0(0-1)	0(0-1)	2(2-2.5) ^{a,i,j,k}
Etanol	2(2-2.5) ^{a,i,j,k}	1(0-1) ^{b,d}	0(0-1)	0(0-0)	2(2-2.5) ^{a,i,j,k}

^ap=0,001: K grubuna kıyasla, ^bp=0,001: K grubuna kıyasla, ^cp=0,026: K grubuna kıyasla, ^dp=0,002: K grubuna kıyasla, ^ep=0,001: S grubuna kıyasla, ^fp=0,006: V grubuna kıyasla, ^gp=0,003: V grubuna kıyasla, ^hp=0,001: V grubuna kıyasla, ⁱp=0,001: SPE grubuna kıyasla, ^jp=0,001: EPE grubuna kıyasla, ^kp=0,001: EPE grubuna kıyasla. *Kruskal Wallis/Tamhane T2*

Tablo 15. Sortilin ve ADAM-10 primer antikoru ile inkube edilen aortik kök dokusu immünpozitivite skorlama bulguları (median- %25 - %75 interquartlie range).

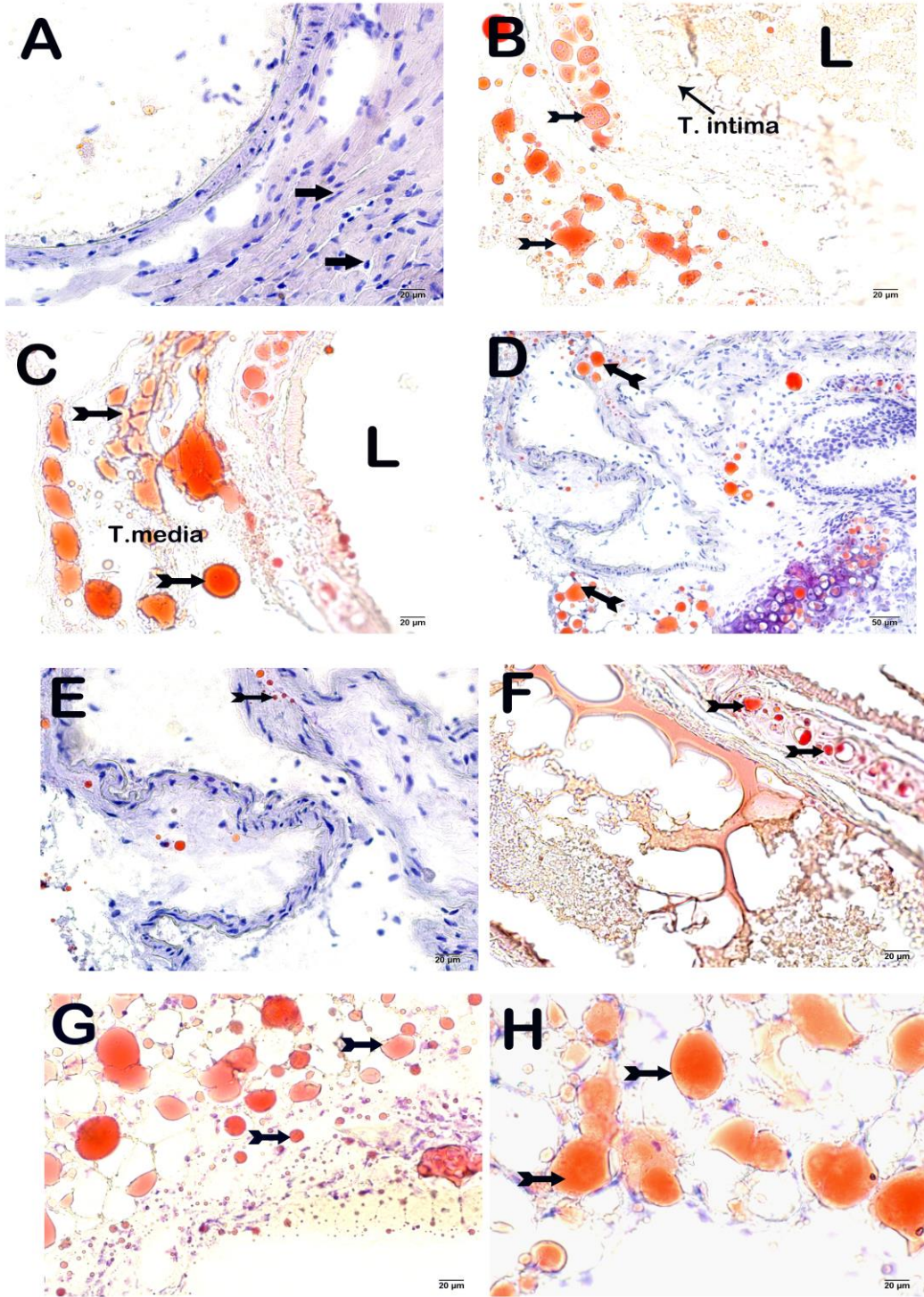
Grup	Sortilin Pozitivite Skoru	ADAM-10 Pozitivite Skoru
K	0(0-0)	0(0-0)
S	3(2-3) ^a	2(2-3) ^a
V	2(2-3) ^a	2(2-2) ^a
SPE	1(0-1) ^{a,b,c}	1(0-1) ^{b,c}
EPE	0(0-1) ^{a,b,c}	0(0-1) ^{b,c}
GW	0(0-0.5) ^{a,b,c}	0(0-1) ^{b,c}
DMSO	2(2-2.5) ^{a,d,e,f}	2(2-3) ^{a,d,e,f}
Etanol	2(2-2) ^{a,d,e,f}	2(2-2) ^{a,d,e,f}

^ap=0,001: K grubuna kıyasla, ^bp=0,001: S grubuna kıyasla, ^cp=0,001: V grubuna kıyasla, ^dp=0,001: SPE grubuna kıyasla, ^ep=0,001: EPE grubuna kıyasla, ^fp=0,001: GW grubuna kıyasla. *Kruskal Wallis/Tamhane T2*



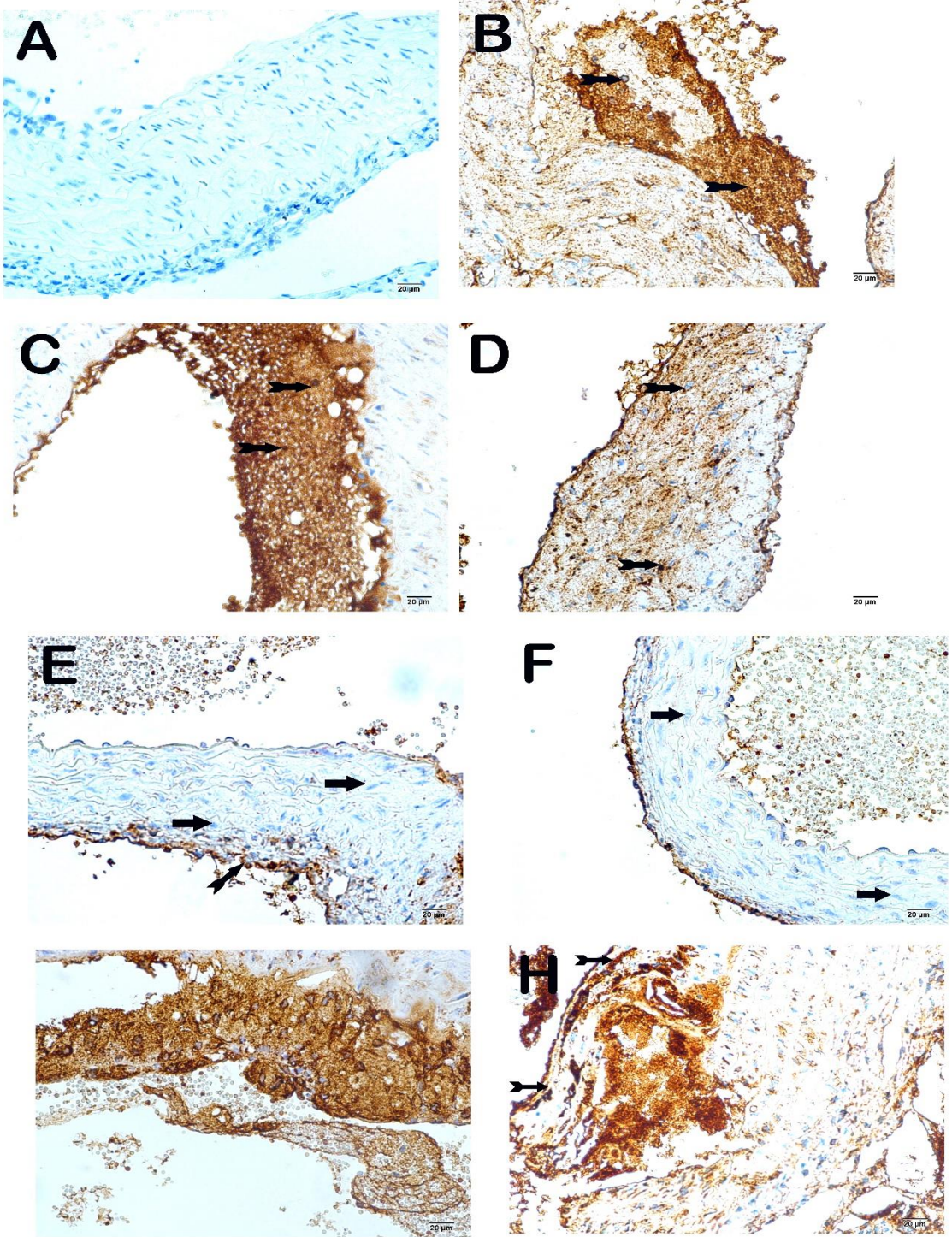
Resim 2. Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanmış aortik kök dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi

Resim 2 (devamı). A(x10)-B(x20) K grubu: Kontrol grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde tunika intima tabakasındaki endotel ve endotel altı bağ dokusunun normal yapıda olduğu izlenmekte. Bunun yanında, Tunika media tabakası ve Tunika adventisya tabakasının normal yapıda olduğu gözlemlenmekte [AHHS skoru: 0(0-0)]. **C(x10)-D(x20) S grubu:** Sham grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde tunika intimada subendoteliyal yaygın adiposit birikimleri (kıvrık ok) izlenmekte. Bunun yanında, tunika mediada yer yer adiposit birikimleri (kıvrık ok) gözlenmekte [AHHS skoru: 2(2-2)]. **E(x10)-F(x20) V Grubu:** Vaka grubu aortik kök kesitlerinde subendoteliyal ve tunika mediada yoğun adiposit birikimleri (kıvrık ok) izlenmekte [AHHS skoru: 2(2-3)]. **G(x10)-H(x20) SPE Grubu:** Sulu propolis uygulama grubu aortik kök kesitlerinde subendoteliyal ve tunika mediada adiposit birikimlerinin (kıvrık ok) azalmış olduğu izlenmekte [AHHS skoru: 1(0.5-1)]. **I(x10)-J(x20) EPE Grubu:** Etanollü propolis uygulama grubu aortik kök kesitlerinde adipositlerin sayıca azalmış (kıvrık ok) azalmış olduğu gözlenmekte [AHHS skoru: 0.5(0-1)]. **K(x10)-L(x20) GW Grubu:** İnhibitör uygulama grubu aortik kök kesitlerinde tunika intima ve tunika media tabakalarındaki adiposit birikimlerinin azalmış (kıvrık ok) azalmış olduğu izlenmekte [AHHS skoru: 1(0-1)]. **M(x10)-N(x20) DMSO Grubu:** DMSO uygulama grubuna ait aortik kök kesitlerinde başta tunika intimanın subendoteliyal tabakasında ve tunika media tabakasında yoğun adiposit birikimleri (kıvrık ok) izlenmekte [AHHS skoru: 2(2-2.5)]. **O(x10)-P(x20) Etanol Grubu:** Etanol uygulama grubuna ait aortik kök kesitlerinde başta tunika intimanın subendoteliyal tabakasında ve tunika media tabakasında yoğun adiposit birikimleri (kıvrık ok) izlenmekte [AHHS skoru: 2(2-2.5)].



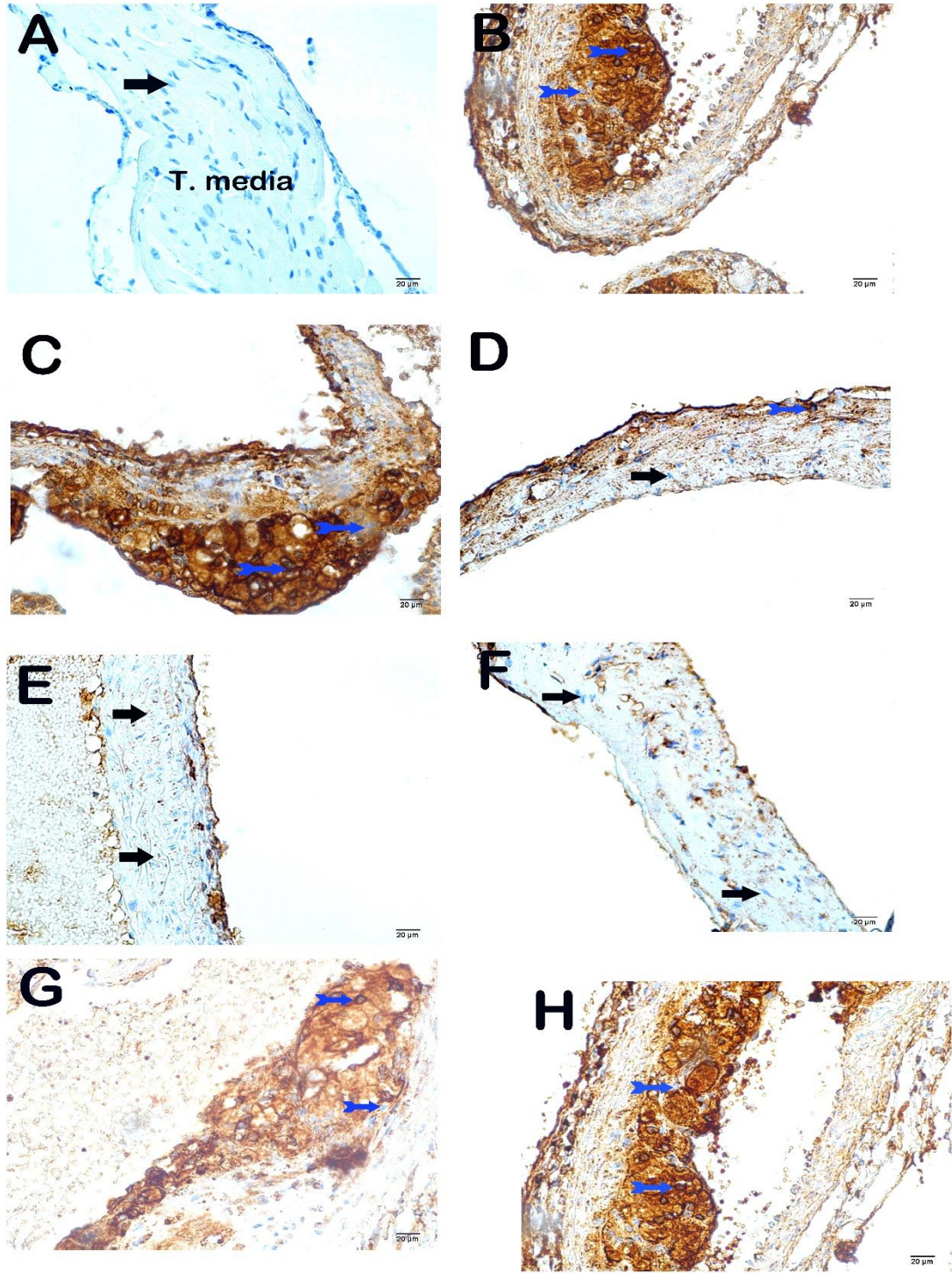
Resim 3. Oil Red O ile boyanmış ve kriyostat yöntemi ile elde edilen aortik kök dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi

Resim 3 (devamı). A(x10) K grubu: Kontrol grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde tunika intima tabakasındaki endotel ve endotel altı bağ dokusunun normal yapıda olduğu izlenmekte (ok). Bunun yanında, Tunika media tabakası ve Tunika adventisya tabakasının normal yapıda olduğu gözlemlenmekte [AHHS skoru: 0(0-0)]. **B(x10) S grubu:** Sham grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde tunika intimada subendoteliyal yaygın adiposit birikimleri (kuyruklu ok) izlenmekte. Bunun yanında, tunika mediada yer yer adiposit birikimleri (kuyruklu ok) gözlenmekte [AHHS skoru: 2(2-2)]. **C(x10) V Grubu:** Vaka grubu aortik kök kesitlerinde subendoteliyal ve tunika mediada yoğun adiposit birikimleri (kuyruklu ok) izlenmekte [AHHS skoru: 2(2-3)]. **D(x10) SPE Grubu:** Sulu propolis uygulama grubu aortik kök kesitlerinde subendoteliyal ve tunika mediada adiposit birikimlerinin (kıvrık ok) azalmış olduğu izlenmekte [AHHS skoru: 1(0.5-1)]. **E(x10) EPE Grubu:** Etanollü propolis uygulama grubu aortik kök kesitlerinde adipositlerin sayıca azalmış (kıvrık ok) azalmış olduğu gözlenmekte [AHHS skoru: 0.5(0-1)]. **F(x10) GW Grubu:** İnhibitör uygulama grubu aortik kök kesitlerinde tunika intima ve tunika media tabakalarındaki adiposit birikimlerinin azalmış (kuyruklu ok) azalmış olduğu izlenmekte [AHHS skoru: 1(0-1)]. **G(x10) DMSO Grubu:** DMSO uygulama grubuna ait aortik kök kesitlerinde başta tunika intimanın subendoteliyal tabakasında ve tunika media tabakasında yoğun adiposit birikimleri (kuyruklu ok) izlenmekte [AHHS skoru: 2(2-2.5)]. **H(x10) Etanol Grubu:** Etanol uygulama grubuna ait aortik kök kesitlerinde başta tunika intimanın subendoteliyal tabakasında ve tunika media tabakasında yoğun adiposit birikimleri (kuyruklu ok) izlenmekte [AHHS skoru: 2(2-2.5)].



Resim 4. Sortilin primer antikoru ile inkübe edilmiş aortik kök kesitlerinin temsili ışık mikroskopik resmi

Resim 4 (devamı). A(x40) K Grubu: Kontrol grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde tunika intima ve tunika mediya tabakasında normal aort dokusu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 0(0-0)]. **B(x40) S Grubu:** Sham grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde başta tunika intimanın subendoteliyal bölgeleri olmak üzere tunika mediya yoğun Sortilin immün-pozitivitesi gösteren çok sayıda hücreler gözlemlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 3(2-3)]. **C(x40) V Grubu:** Vaka grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde tunika intima ve tunika mediya tabakalarında çok sayıdaki hücrelerde yoğun Sortilin immün-pozitivitesi izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 2(2-3)]. **D(x40) SPE Grubu:** Sulu Propolis uygulama grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde subendoteliyal bölgede ve tunika mediya tabakasındaki hücrelerde Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin sayıca azalmış olduğu gözlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 1(0-1)]. **E(x40) EPE Grubu:** Etanollü Propolis uygulama grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 0(0-1)]. **F(x40) GW Grubu:** İnhibitör uygulama grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 0(0-0.5)]. **G(x40) DMSO Grubu:** DMSO grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerin başta tunika intimanın subendoteliyal bölgesi olmak üzere tunika mediya tabakalarında yoğun Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hücreler olduğu gözlemlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 2(2-2.5)]. **H(x40) Etanol Grubu:** Etanol grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerin başta subendoteliyal bölge olmak üzere tunika mediya tabakalarında yoğun sortilin immün-pozitivitesi gösteren çok sayıda hücrelerin olduğu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 2(2-2)].



Resim 5. ADAM10 primer antikoruna ile inkübe edilmiş aortik kök kesitlerinin temsili ışık mikroskopik resmi

Resim 5 (devamı). A(x40) K Grubu: Kontrol grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde tunika intima ve tunika mediya tabakasında normal aort dokusu izlenmekte (ADAM-10 Pozitivite Skoru: 0(0-0)). **B(x40) S Grubu:** Sham grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde başta tunika intimanın subendoteliyal bölgeleri olmak üzere tunika mediya yoğun immün-pozitivitesi gösteren çok sayıda hücreler izlenmekte (ADAM-10 Pozitivite Skoru: 3(2-3)). **C(x40) V Grubu:** Vaka grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde tunika intima ve tunika mediya tabakalarında çok sayıdaki hücrelerde yoğun ADAM-10 immün-pozitivitesi izlenmekte (ADAM-10 Pozitivite Skoru: 2(2-3)). **D(x40) SPE Grubu:** Sulu Propolis uygulama grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde subendoteliyal bölgede ve tunika mediya tabakasındaki hücrelerde immün-pozitivite hücrelerin sayıca azalmış olduğu gözlenmekte (ADAM-10 Pozitivite Skoru: 1(0-1)). **E(x40) EPE Grubu:** Etanollü Propolis uygulama grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu izlenmekte (ADAM-10 Pozitivite Skoru: 0(0-1)). **F(x40) GW Grubu:** İnhibitör uygulama grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerinde ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu izlenmekte (ADAM-10 Pozitivite Skoru: 0(0-1)). **G(x40) DMSO Grubu:** DMSO grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerin başta tunika intimanın subendoteliyal bölgesi olmak üzere tunika mediya tabakalarında yoğun ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hücreler olduğu gözlemlenmekte (ADAM-10 Pozitivite Skoru: 2(2-2.5)). **H(x40) Etanol Grubu:** Etanol grubuna ait aortik kök dokusu kesitlerin başta subendoteliyal bölge olmak üzere tunika mediya tabakalarında yoğun ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren çok sayıda hücrelerin olduğu izlenmekte (ADAM-10 Pozitivite Skoru: 2(2-2)).

4.4.2. Karaciğer Dokusu Histolojik Bulguları

Çalışma sonucu elde edilen karaciğer dokusunun Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanmış temsili görüntüsü Resim 6’de, Oil Red O ile boyanmış ışık mikroskobu temsili görüntüsü Resim 7’de, ADAM10 ve Sortilin primer antikoruyla muamele edilmiş görüntüleri ise Resim 8 ve Resim 9’de verilmiştir. Skorlamalar ise Tablo 15 ve Tablo 16’da sunulmuştur.

Tablo 16. Karaciğer histopatolojik hasar skorlaması bulguları [KHHS, median - %25-%75 interquartlie range].

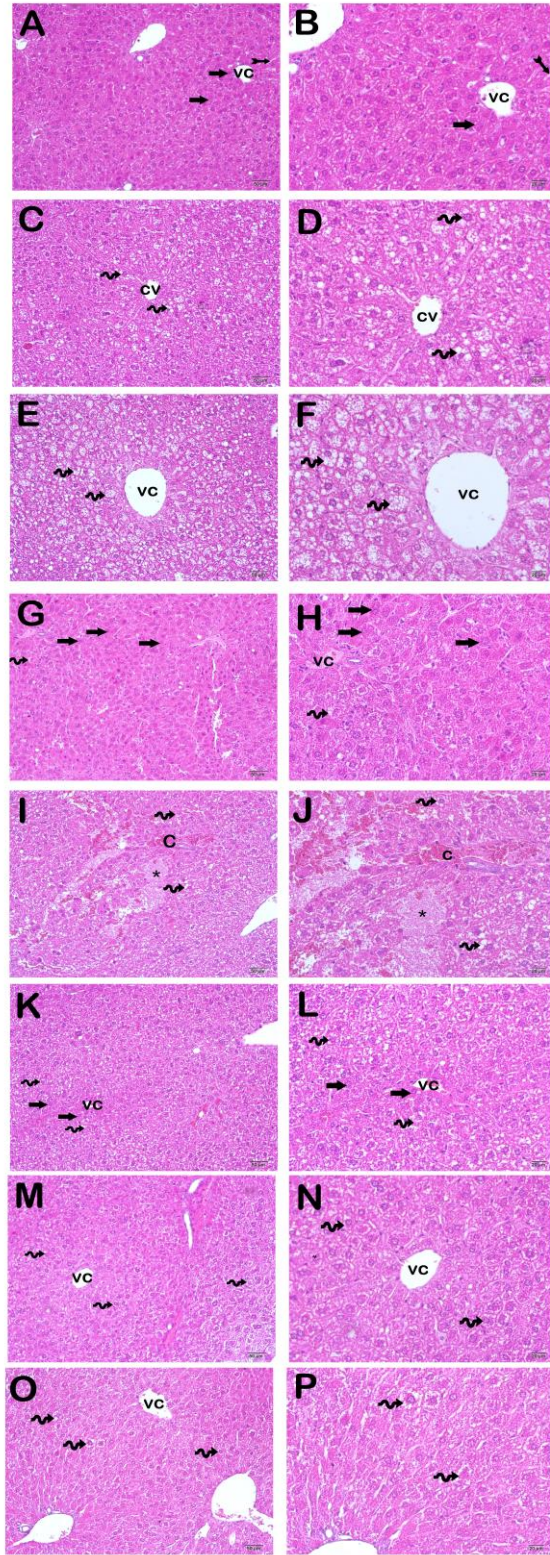
Grup	Dejeneratif Hepatositler	Sentrolöbüler tutulum	Perizonal tutulum	İnflamasyon	Ödematöz alanlar	KHHS
K	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
S	2(2-3) ^a	2(3-3) ^a	2(1.5-2) ^a	0(0-1)	3(2-3) ^a	9(8-10.5) ^a
V	2(2-2) ^a	2(2-3) ^a	2(0.5-1) ^a	0(0-1)	2.5(1.5-3) ^a	9(7-10) ^a
SPE	1(1-2) ^{a,b,c}	2(1-2) ^{a,b,k}	0(0-1) ^{b,d}	0(0-0.5)	1(1-2) ^{a,b,d}	5(3-6) ^{a,b,d}
EPE	1(1-1.5) ^{a,b,c}	1(0-1.5) ^{a,b,c}	0(0-0) ^{b,d}	0(0-0.5)	1(0-1) ^{a,b,d}	3(2-3) ^{a,b,d}
GW	1(1-1.5) ^{a,b,d}	2(1-2) ^{a,b,l}	0(0-0) ^{b,d}	0(0-0.5)	1(1-1) ^{a,b,d}	4(3.5-5) ^{a,b,d}
DMSO	2(2-3) ^{a,e,g,i}	2(2-3) ^{a,e,g,i}	2(0-2) ^{a,i,h}	0(0-1)	1(1-3) ^{a,i,m}	9(6-10) ^{a,e,n,g,i}
Etanol	2(2-3) ^{a,f,h,j}	3(2-3) ^{a,f,h,j}	2(0-2) ^{a,i,h}	0(0-0.5)	3(1-3) ^{a,i,h}	8(5-10) ^{a,f,g,j}

^ap=0,001: K grubuna kıyasla, ^bp=0,001: S grubuna kıyasla, ^cp=0,042: V grubuna kıyasla, ^dp=0,001: V grubuna kıyasla, ^ep=0,002: SPE grubuna kıyasla, ^fp=0,014: SPE grubuna kıyasla, ^gp=0,001: EPE grubuna kıyasla, ^hp=0,002: EPE grubuna kıyasla, ⁱp=0,001: GW grubuna kıyasla, ^jp=0,002: GW grubuna kıyasla, ^kp=0,007: V grubuna kıyasla, ^lp=0,004: V grubuna kıyasla, ^mp=0,032: EPE grubuna kıyasla, ⁿp=0,001: SPE grubuna kıyasla. *Kruskal Wallis/Tamhane T2*

Tablo 17. Sortilin ve ADAM10 primer antikoru ile inkube edilen karaciğer dokusu immünpozitivite skorlama sonuçları [median - %25 - %75 interquartlie range].

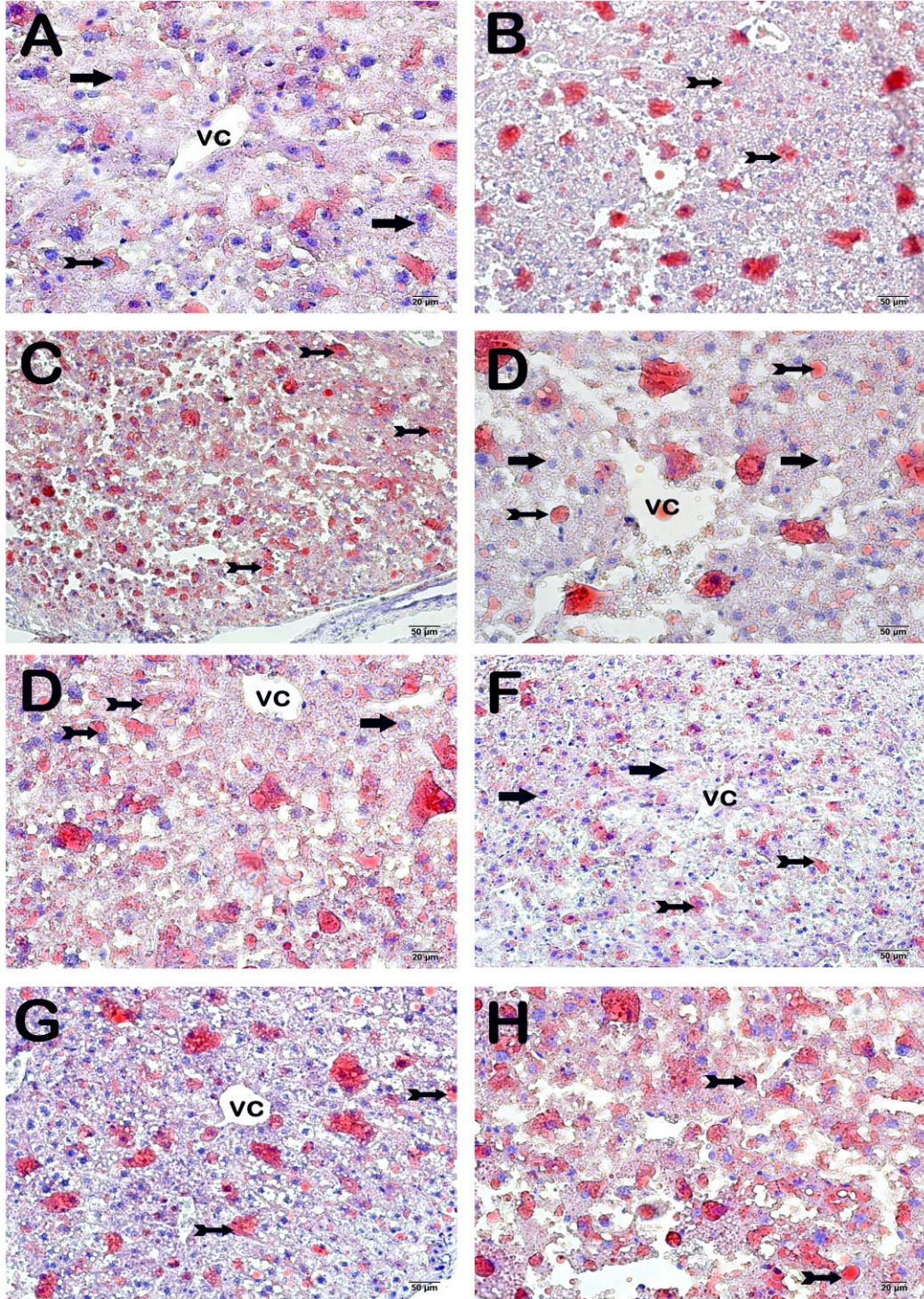
Grup	Sortilin Pozitivite Skoru	ADAM-10 Pozitivite Skoru
K	0(0-0)	0(0-0)
S	2(2-3) ^a	3(3-3) ^a
V	2(2-3) ^a	2(2-3) ^a
SPE	1(1-1.5) ^{a,b,c}	1(1-1.5) ^{b,c}
EPE	1(1-1) ^{a,b,c}	1(1-1) ^{b,c}
GW	1(1-1) ^{a,b,c}	1(1-1) ^{b,c}
DMSO	2(2-3) ^{a,d,e,f}	2(2-3) ^{a,d,e,f}
Etanol	3(2-3) ^{a,d,e,f}	3(2-3) ^{a,d,e,f}

^ap=0,001: K grubuna kıyasla, ^bp=0,001: S grubuna kıyasla, ^cp=0,001: V grubuna kıyasla, ^dp=0,001: SPE grubuna kıyasla, ^ep=0,001: EPE grubuna kıyasla, ^fp=0,001: GW grubuna kıyasla. *Kruskal Wallis/Tamhane T2*



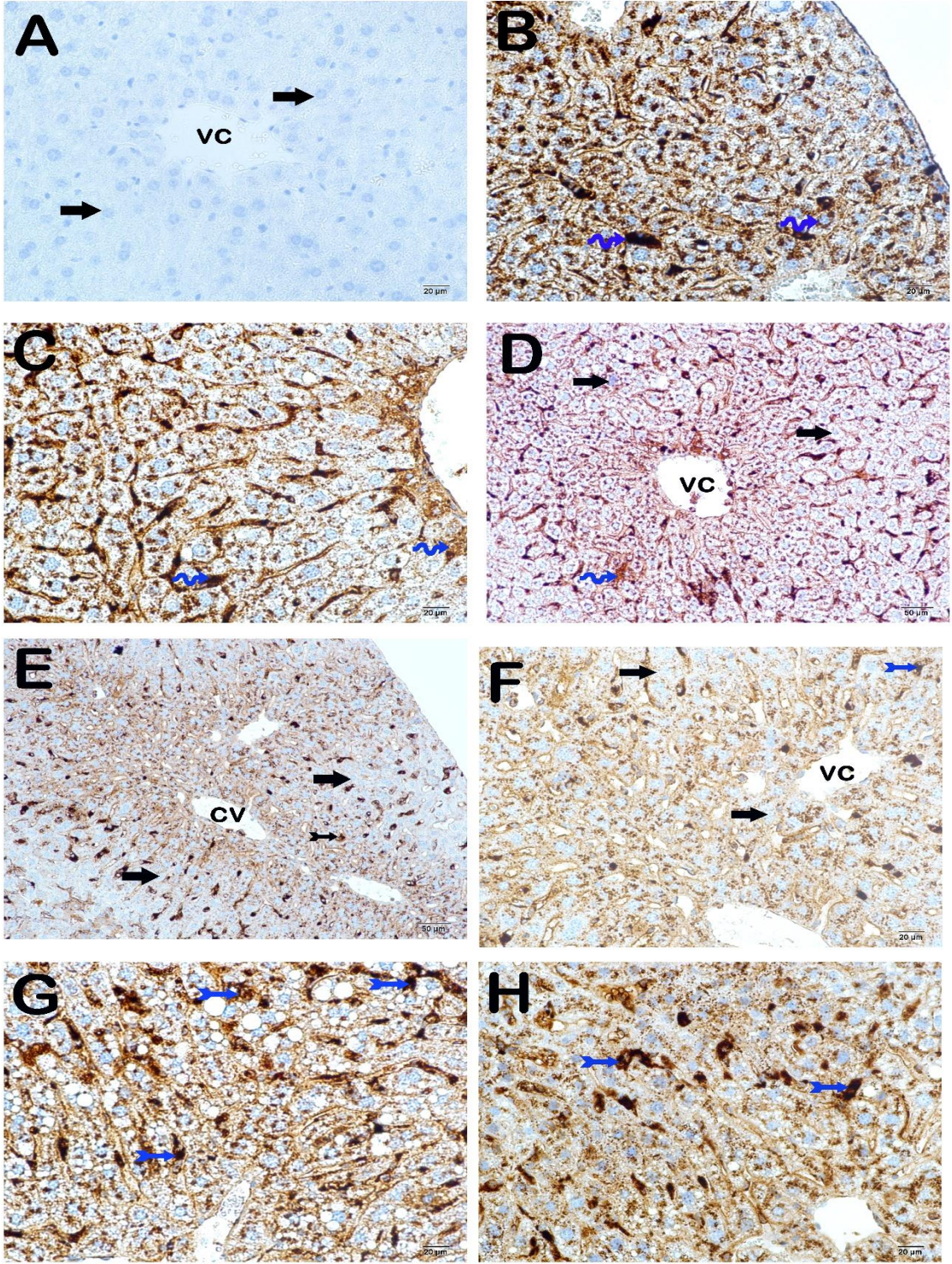
Resim 6. Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanmış karaciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi. Vena Centralis (vc)

Resim 6 (devamı). A(x10)-B(x20) K grubu: Normal yapıdaki hepatositlerden oluşan Remark kordonları ile izlenmekte (ok). Remark kordonları arasında sinüzoidler gözlemlenmekte (kuyruklu ok) [KHHS: 0-0-0]. **C(x10)-D(x20) S grubu:** Çok sayıda lipid dropletleri içeren ve merkezi konumda nükleusları içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) oluşturduğu multifokal hepatik steatozis izlenmekte. Çok sayıda lipid dropletleri içeren ve merkezi konumda nükleusları içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin sentrolobüler ve periportal zon tutulumlu oldukları izlenmekte (kuyruklu ok) [KHHS: 9(8-10.5)]. **E(x10)-F(x20) V grubu:** Sitoplazma içeriklerinde yaygın olarak lipid vakuolleri içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) oluşturduğu multifokal tutumlu sentrolobüler ve periportal zonlarda hepatik steatozis (kuyruklu ok) [KHHS: 9(7-10)]. **G(x10)-H(x20) SPE grubu:** Sitoplazma içeriklerinde yaygın olarak lipid vakuolleri içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) oluşturduğu multifokal steatozisin azalmış olduğu izlenmekte (kuyruklu ok) [KHHS: 5(3-6)]. **I(x10)-J(x20) EPE grubu:** Sentrolobüler ve periportal zonlarda hepatik steatozise neden olan sitoplazmik lipid vakuolleri içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) azalmış olduğu izlenmekte (kuyruklu ok) [KHHS: 3(2-3)]. **K(x10)-L(x20) GW grubu:** Multifokal hepatik steatozise neden olan dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) azalmış olduğu izlenmekle beraber tipik yapıdaki hepatositler izlenmekte (ok) (kuyruklu ok) [KHHS: 4(3.5-5)]. **M(x10)-N(x20) DMSO grubu:** Yaygın olarak sitoplazmik lipid vakuolleri içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) oluşturduğu multifokal tutumlu sentrolobüler ve periportal zonlarda hepatik steatozis (kuyruklu ok) gözlemlenmekte (KHHS: 9(6-10)). **O(x10)-P(x20) Etanol grubu:** Remark kordonlarında multifokal tutumlu sentrolobüler ve periportal zonlarda hepatik steatozise neden olan yaygın sitoplazmik vakol içeriğine sahip dejeneratif hepatositler (kuyruklu ok) izlenmekte [KHHS: 8(5-10)].



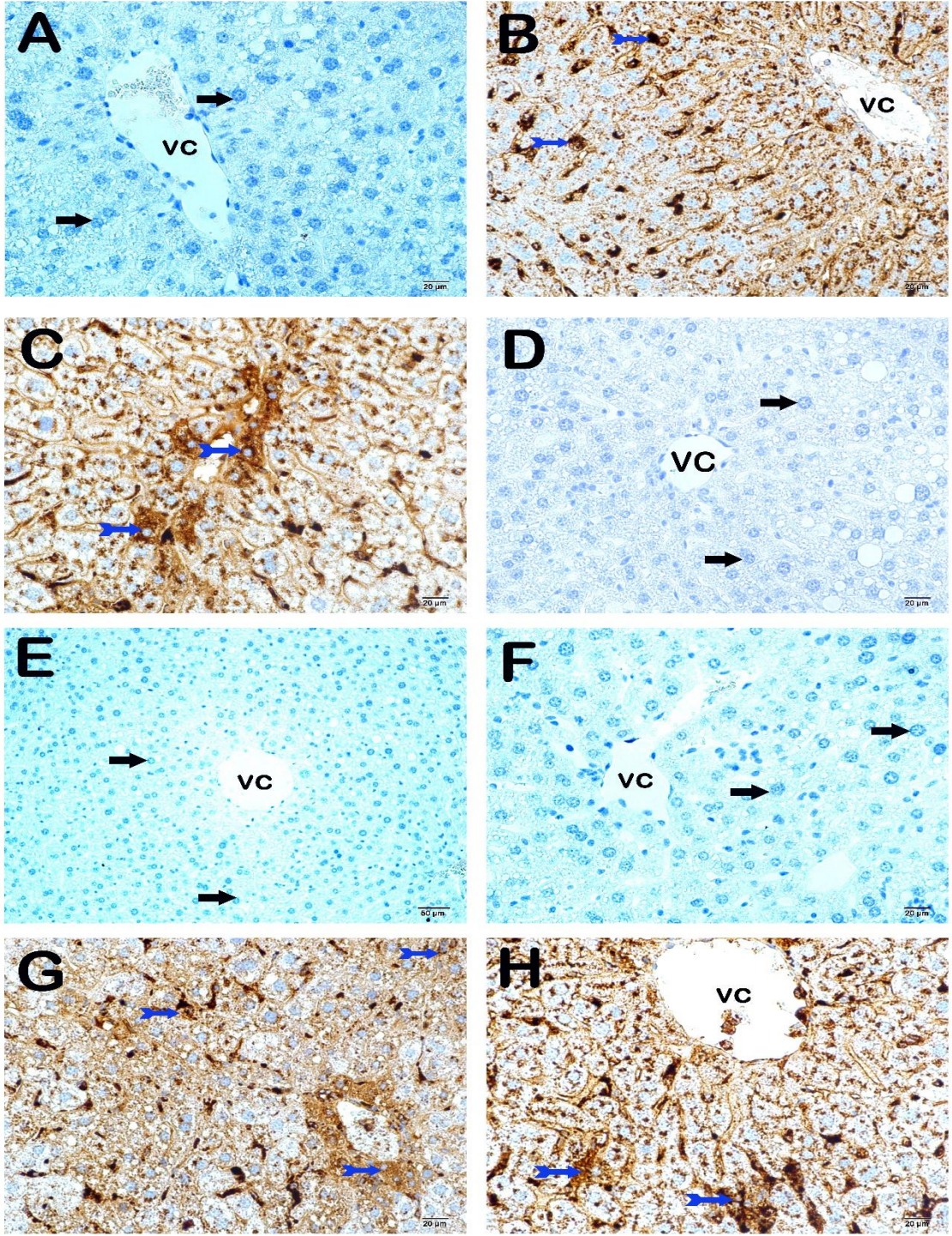
Resim 7. Olive O Red ile boyanmış ve kriyostat yöntemi ile elde edilen karaciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskobik resmi. Vena Centralis (vc)

Resim 7 (devamı). A(x10) K grubu: Normal yapıdaki hepatositlerden oluşan Remark kordonları ile izlenmekte (ok). Remark kordonları arasında sinüzoidler gözlemlenmekte (kuyruklu ok) [KHHS: 0-0-0]. **B(x10) S grubu:** Çok sayıda lipid dropletleri içeren ve merkezi konumda nükleusları içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) oluşturduğu multifokal hepatik steatozis izlenmekte. Çok sayıda lipid dropletleri içeren ve merkezi konumda nükleusları içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin sentrolobüler ve periportal zon tutulumlu oldukları izlenmekte (kuyruklu ok) [KHHS: 9(8-10.5)]. **C(x10) V grubu:** Sitoplazma içeriklerinde yaygın olarak lipid vakuelleri içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) oluşturduğu multifokal tutumlu sentrolobüler ve periportal zonlarda hepatik steatozis (kuyruklu ok) [KHHS: 9(7-10)]. **D(x10) SPE grubu:** Sitoplazma içeriklerinde yaygın olarak lipid vakuelleri içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) oluşturduğu multifokal steatozisin azalmış olduğu izlenmekte (kuyruklu ok) [KHHS: 5(3-6)]. **E(x10) EPE grubu:** Sentrolobüler ve periportal zonlarda hepatik steatozise neden olan sitoplazmik lipid vakuelleri içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) azalmış olduğu izlenmekte (kuyruklu ok) [KHHS: 3(2-3)]. **F(x10) GW grubu:** Multifokal hepatik steatozise neden olan dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) azalmış olduğu izlenmekle beraber tipik yapıdaki hepatositler izlenmekte (ok) (kuyruklu ok) [KHS: 4(3.5-5)]. **G(x10) DMSO grubu:** Yaygın olarak sitoplazmik lipid vakuelleri içeren dejeneratif yapıdaki hepatositlerin (spiral ok) oluşturduğu multifokal tutumlu sentrolobüler ve periportal zonlarda hepatik steatozis (kuyruklu ok) gözlemlenmekte [KHHS: 9(6-10)]. **H(x10) Etanol grubu:** Remark kordonlarında multifokal tutumlu sentrolobüler ve periportal zonlarda hepatik steatozise neden olan yaygın sitoplazmik vakol içeriğine sahip dejeneratif hepatositler (kuyruklu ok) izlenmekte [KHHS: 8(5-10)].



Resim 8. Sortilin primer antikoru ile inkübe edilmiş karaciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi.

Resim 8 (devamı). A(x40) K Grubu: Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde immün-negatif hepatositlerden oluşan karaciğer dokusu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 0(0-0)]. **B(x40) S Grubu:** Sham grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde yoğun Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hepatositlerin çok sayıda olduğu gözlemlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 2(2-3)]. **C(x40) V Grubu:** Vaka grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde Remark kordonlarındaki çok sayıdaki hepatositlerde yoğun Sortilin immün-pozitivitesi izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 2(2-3)]. **D(x40) SPE Grubu:** Sulu Propolis uygulama grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde Remark kordonlarındaki Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hepatositlerin sayıca azalmış olduğu gözlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 1(1-1.5)]. **E(x40) EPE Grubu:** Etanollü Propolis uygulama grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hepatositlerin azalmış olduğu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 1(1-1)]. **F(x40) GW Grubu:** İnhibitör uygulama grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hepatositlerin Remark kordonlarındaki sayısının azalmış olduğu izlenmekte [Sortilin Skoru: 1(1-1)]. **G(x40) DMSO Grubu:** DMSO grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerin başta sentroportal bölge olmak üzere perizonal alanlarda yoğun Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hepatositlerin olduğu gözlemlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 2(2-3)]. **H(x40) Etanol Grubu:** Etanol grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerin başta Remark kordonlarında yoğun sortilin immün-pozitivitesi gösteren çok sayıda hepatositlerin olduğu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 3(2-3)].



Resim 9. ADAM-10 primer antikoru ile inkübe edilmiş Karaciğer dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi.

Resim 9 (devamı). A(x40) K Grubu: Kontrol grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde immün-negatif normal yapıdaki hepatositlerden oluşan karaciğer dokusu izlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 0(0-0)]. **B(x40) S Grubu:** Sham grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde Remark kordonlarında yoğun ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hepatositlerin çok sayıda olduğu gözlemlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 3(3-3)]. **C(x40) V Grubu:** Vaka grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde başta sentrolobüler bölgede olmak üzere çok sayıda hepatositlerde yoğun ADAM-10 immün-pozitivitesi gözlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 2(2-3)]. **D(x40) SPE Grubu:** Sulu Propolis uygulama grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hepatositlerin sayıca azalmış olduğu gözlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 1(1-1.5)]. **E(x40) EPE Grubu:** Etanollü Propolis uygulama grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hepatositlerin Remark kordonlarındaki sayısının azalmış olduğu izlenmekte [ADAM-10 Skoru: 1(1-1)]. **F(x40) GW Grubu:** İnhibitör uygulama grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerinde ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hepatositlerin Remark kordonlarındaki sayısının azalmış olduğu izlenmekte [ADAM-10 Skoru: 1(1-1)]. **G(x40) DMSO Grubu:** DMSO grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerin başta sentroportal bölge olmak üzere perizonal alanlarda yoğun ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hepatositlerin olduğu gözlemlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 2(2-3)]. **H(x40) Etanol Grubu:** Etanol grubuna ait karaciğer dokusu kesitlerin başta Remark kordonlarında yoğun ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren çok sayıda hepatositlerin olduğu izlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 3(2-3)].

4.4.3. Kalp Dokusu Histolojik Bulguları

Çalışma sonucu elde edilen kalp dokusunun Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanmış temsili görüntüsü Resim 10'da, ADAM10 ve Sortilin primer antikoruyla muamele edilmiş görüntüleri ise Resim 11 ve Resim 12'de verilmiştir.

Tablo 18. Kalp histopatolojik hasar skorlaması bulguları (KAHHS, median - %25 -%75 interquartlie range).

Grup	Adiposit Subendokardiyale Tabakası Tutulum	Adiposit Miyokardiyum Tutulum	Dejeneratif Kardiyomiyositler	Ödematöz Alanlar	KAHHS
K	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-1)
S	2(2-2) ^a	1(1-2) ^a	1(1-1) ^a	1(1-1)	6(5-6) ^a
V	2(2-2) ^a	1(1-2) ^a	1(1-1) ^a	1(1-1.5)	5(5-7) ^a
SPE	1(0-1) ^{b,c}	0.5(0-1) ^{b,c}	0(0-0) ^{b,c}	0(0-0) ^{b,c}	1(1-2) ^{b,c}
EPE	0(0-1) ^{b,c}	0(0-0) ^{b,c}	0(0-0) ^{b,c}	0(0-0) ^{b,c}	0(0-1) ^{b,c}
GW	0(0-0.5) ^{b,c}	0(0-0) ^{b,c}	0(0-0) ^{b,c}	0(0-0) ^{b,c}	0(0-1.5) ^{b,c}
DMSO	2(2-2) ^{a,d,e,f}	2(2-2) ^{a,d,e,f}	1.5(0-1) ^{g,h,e,i}	1(0-1) ^{g,h,e,j}	5(4.5-6) ^{a,d,e,f}
Etanol	2(2-2.5) ^{a,d,e,f}	2(2-2) ^{a,d,e,f}	1(0-1) ^{a,d,e,f}	1(1-1) ^{a,d,e,f}	7(6-7.5) ^{a,d,e,f}

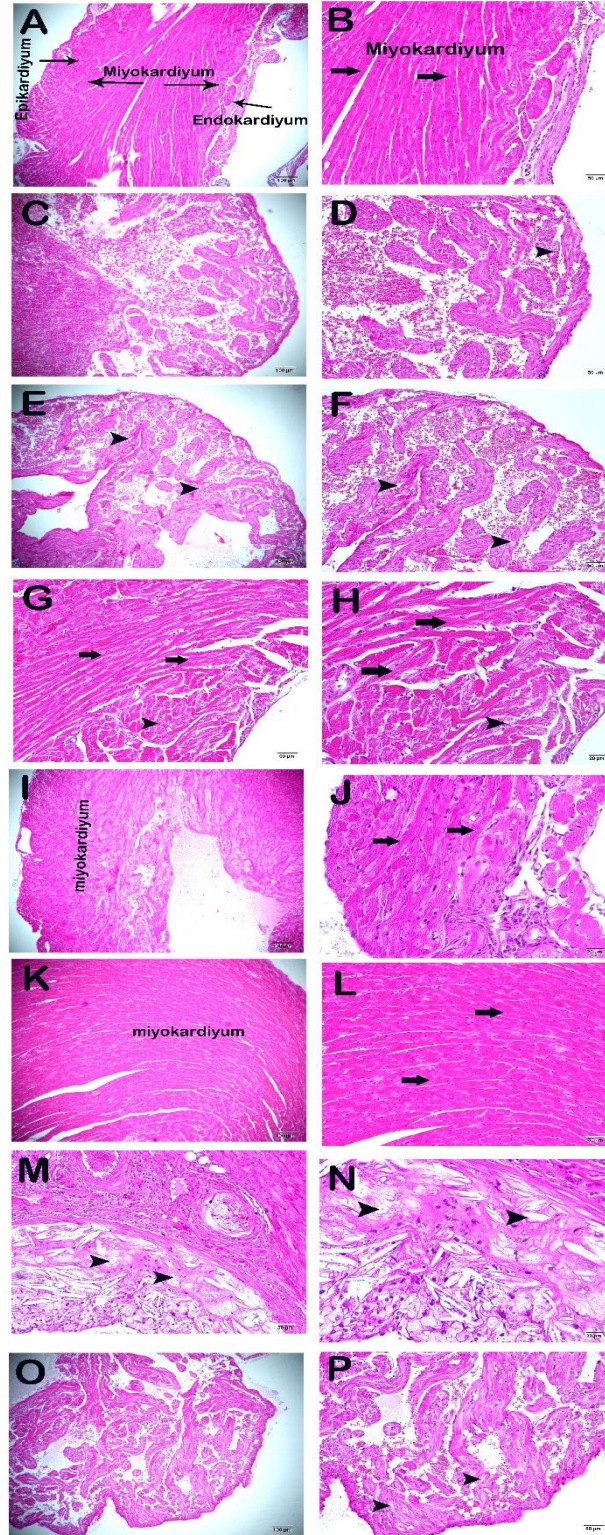
^ap=0,001: K grubuna kıyasla, ^bp=0,001: S grubuna kıyasla, ^cp=0,001: V grubuna kıyasla, ^dp=0,001: SPE grubuna kıyasla, ^ep=0,001: EPE grubuna kıyasla, ^fp=0,001: GW grubuna kıyasla, ^gp=0,001: K grubuna kıyasla, ^hp=0,009: EPE grubuna kıyasla, ⁱp=0,026: GW grubuna kıyasla, ^jp=0,026: GW grubuna kıyasla. *Kruskal Wallis/Tamhane T2*

Tablo 19. Sortilin ve ADAM-10 primer antikoru ile inkube edilen kalp dokusu immünpozitivites skorlama sonuçları (median- %25 - %75 interquartlie range).

Grup	Sortilin Pozitivite Skoru	ADAM-10 Pozitivite Skoru
K	0(0-0)	0(0-0)
S	2(1-2) ^a	2(1.5-2) ^a
V	2(1.5-2) ^a	2(1-2) ^a
SPE	1(1-1) ^{a,b,c}	0(0-1) ^{b,c}
EPE	0(0-0.5) ^{a,b,c}	1(0-1) ^{b,c}
GW	1(0.5-1) ^{a,b,c}	1(0-1.5) ^{b,c}
DMSO	2(1-2) ^{a,d,e,f}	2(1-2) ^{a,d,e,f}
Etanol	1(1-2) ^{a,d,e,f}	2(2-2) ^{a,d,e,f}

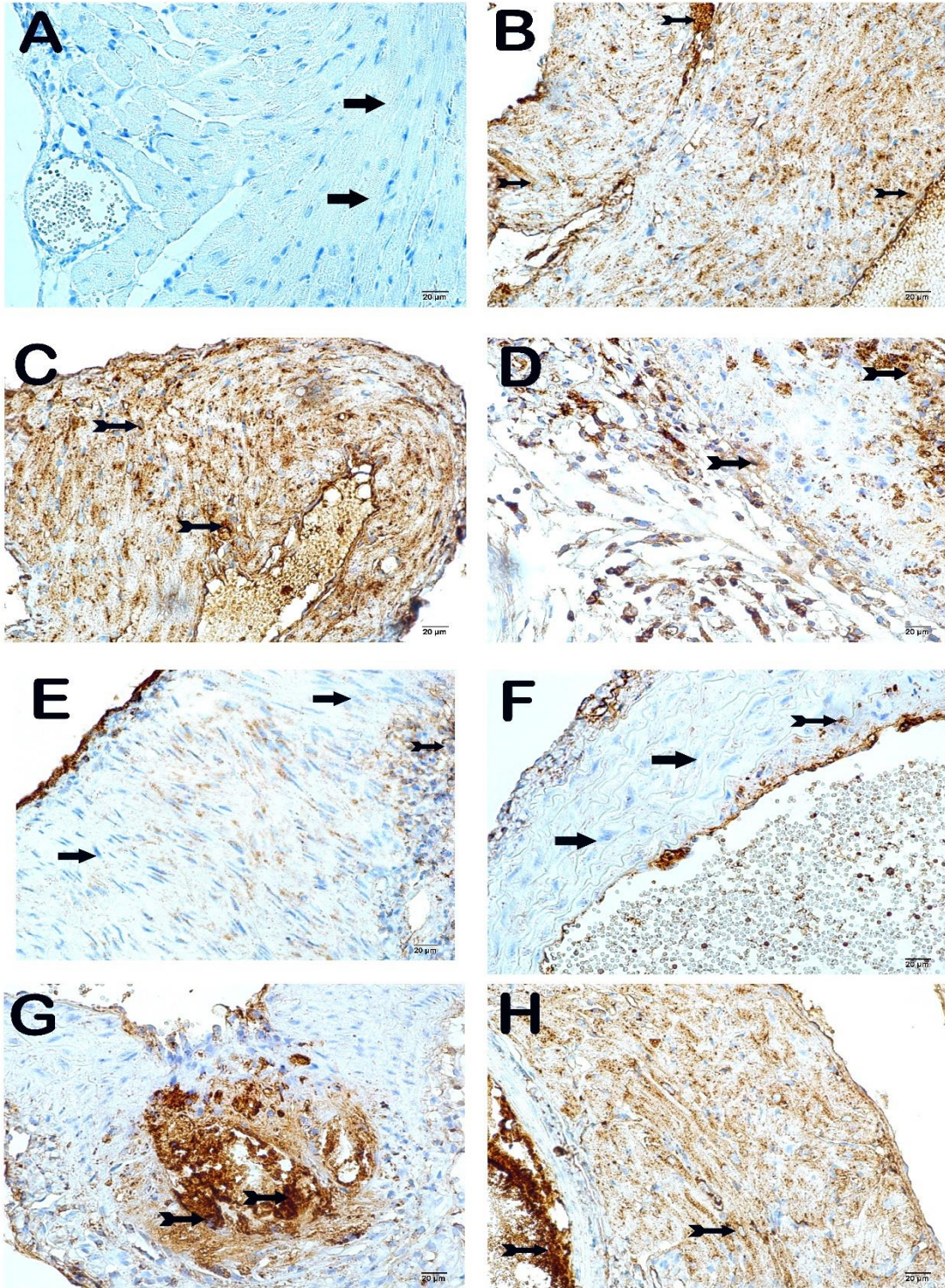
^ap=0,001: K grubuna kıyasla, ^bp=0,001: S grubuna kıyasla, ^cp=0,001: V grubuna kıyasla, ^dp=0,001: SPE grubuna kıyasla,

^ep=0,001: EPE grubuna kıyasla, ^fp=0,001: GW grubuna kıyasla. *Kruskal Wallis/Tamhane T2*



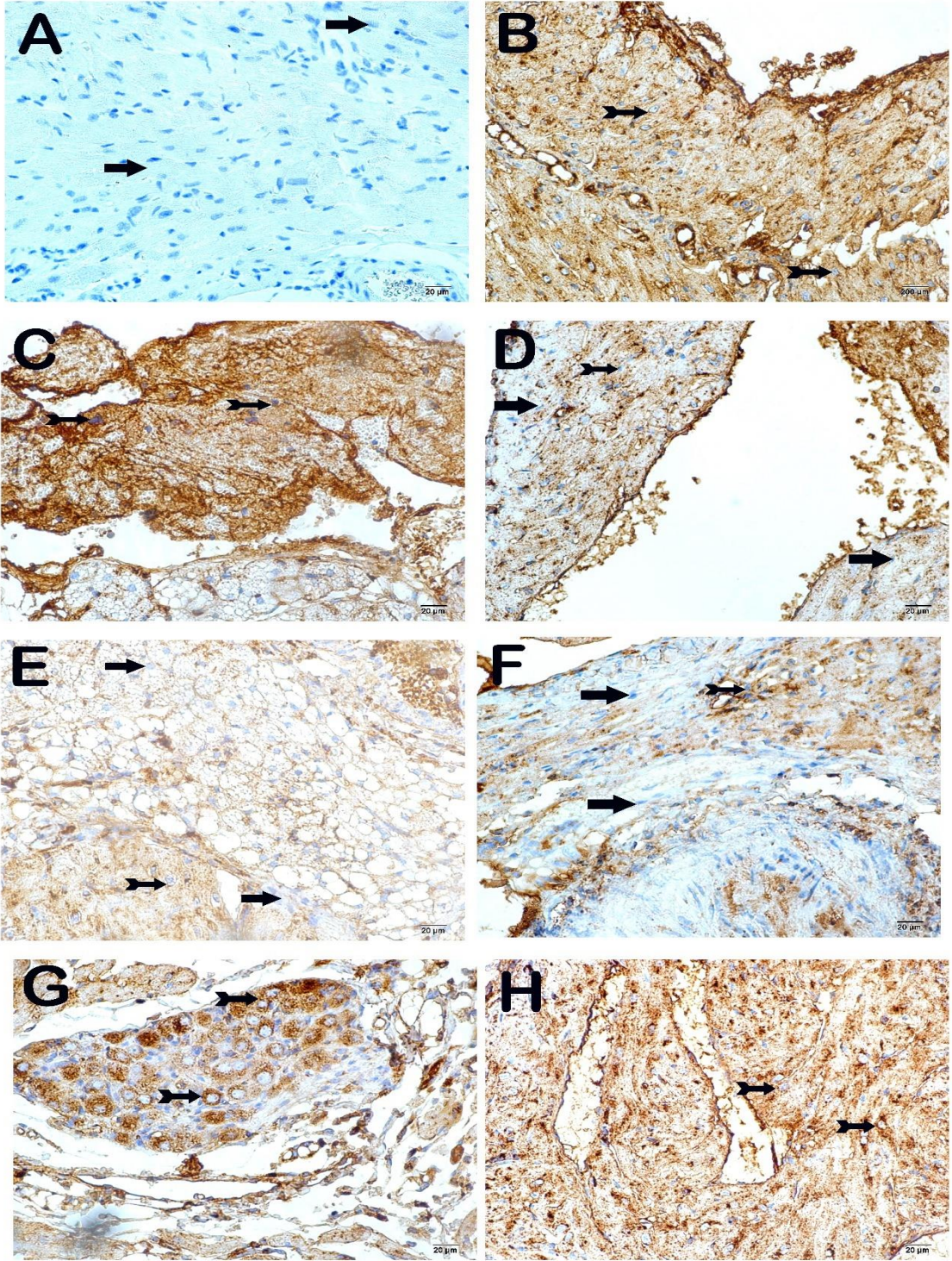
Resim 10. Harris Hematoksilen ve Eozin G ile boyanmış kalp dokusuna ait kesitlerin temsili ışık mikroskopik resmi.

Resim 10 (devamı). A(x10)-B(x20) K grubu: Kontrol grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde Endokardiyum tabakasında endotel ve subendokardiyale tabaksının düzgün sınırlı olduğu gözlemlenmekte (ok). Bunun yanında, Miyokardiyum tabakasında normal yapıdaki kardiyomiyositlerin bulunduğu ve epikardiyumun (viseral perikardiyum) tabakalarının normal yapıda olduğu izlenmekte [KAHHS skoru: 0(0-1)]. **C(x10)-D(x20) S grubu:** Sham grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde başta endokardiyumun subendokardiyale tabakası olmak üzere miyokardiyum tabakasında yaygın adiposit birikimleri (ok başı) izlenmekte [KAHHS skoru: 6(5-6)]. **E(x10)-F(x20) V Grubu:** Vaka grubu kalp dokusu kesitlerinde endokardiyumun miyokardiyum tabakasında yoğun adiposit birikimleri ok başı) izlenmekte [KAHHS skoru: 5(5-7)]. **G(x10)-H(x20) SPE Grubu:** Sulu propolis uygulama grubu kalp dokusu kesitlerinde subendotelial ve miyokardiyum tabakasında adiposit birikimlerinin (ok başı) azalmış olduğu izlenmekte [KAHHS skoru: 1(1-2)]. **I(x10)-J(x20) EPE Grubu:** Etanolü propolis uygulama grubu kalp dokusu kesitlerinde adipositlerin sayıca azalmış (ok başı) azalmış olduğu gözlenmekte [KAHHS skoru: 0(0-1)]. **K(x10)-L(x20) GW Grubu:** İnhibitör uygulama grubu kalp kesitlerinde endokardiyumun subendokardiyale ve miyokardiyum tabakalarındaki adiposit birikimlerinin azalmış (ok başı) azalmış olduğu izlenmekte [KAHHS skoru: 1(0-1.5)]. **M(x10)-N(x20) DMSO Grubu:** DMSO uygulama grubuna ait kalp kesitlerinde başta endokardiyumun subendotelial tabakasında ve miyokardiyum tabakasında yoğun adiposit birikimleri (ok başı) izlenmekte [KAHHS skoru: 5.5(4.5-6)]. **O(x10)-P(x20) Etanol Grubu:** Etanol uygulama grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde başta endokardiyumun subendokardiyale tabakasında ve miyokardiyum tabakasında yoğun adiposit birikimleri (ok başı) izlenmekte [KAHHS skoru: 7(6-7)].



Resim 11. Sortilin primer antikoru ile inkübe edilmiş kalp dokusu kesitlerinin temsili ışık mikroskopik resmi.

Resim 11 (devamı). A(x40) K Grubu: Kontrol grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde endokardiyumun subendokardiyale ve miyokardiyum tabakasında bulunan hücreler ve normal kalp dokusu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 0(0-0)]. **B(x40) S Grubu:** Sham grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde başta endokardiyum olmak üzere miyokardiyum tabakasında yoğun Sortilin immün-pozitivitesi gösteren çok sayıda hücreler gözlemlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 2(1-2)]. **C(x40) V Grubu:** Vaka grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde subendokardiyale ve miyokardiyum tabakalarında çok sayıdaki hücrelerde yoğun Sortilin immün-pozitivitesi izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 2(1.5-2)]. **D(x40) SPE Grubu:** Sulu Propolis uygulama grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde subendokardiyale bölgesinde ve miyokardiyum tabakasındaki hücrelerde Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin sayıca azalmış olduğu gözlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 0.5(0-0.5)]. **E(x40) EPE Grubu:** Etanollü Propolis uygulama grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 0(0-0.5)]. **F(x40) GW Grubu:** İnhibitör uygulama grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde endokardiyumun subendokardiyale bölgesinde ve miyokardiyum tabakasındaki Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 0.5(0-1)]. **G(x40) DMSO Grubu:** DMSO grubuna ait kalp dokusu kesitlerin başta miyokardiyumun subendoteliyal bağ dokusunda olmak üzere miyokardiyum tabakalarında yoğun Sortilin immün-pozitivitesi gösteren hücreler olduğu gözlemlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 2(2-2.5)]. **H(x40) Etanol Grubu:** Etanol grubuna ait kalp dokusu kesitlerin başta subendoteliyal bölge olmak üzere miyokardiyum tabakalarında yoğun sortilin immün-pozitivitesi gösteren çok sayıda hücrelerin olduğu izlenmekte [Sortilin Pozitivite Skoru: 2(2-2)].



Resim 12. ADAM-10 primer antikoru ile inkübe edilmiş kalp dokusu kesitlerinin temsili ışık mikroskopik resmi.

Resim 12 (devamı). A(x40) K Grubu: Kontrol grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde endokardiyum ve miyokardiyum tabakasında normal kalp dokusu izlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 0(0-0)]. **B(x40) S Grubu:** Sham grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde başta endokardiyumun subendokardiyale bölgeleri olmak üzere miyokardiyum yoğun immün-pozitivitesi gösteren çok sayıda hücreler izlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 3(2-3)]. **C(x40) VGrubu:** Vaka grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde endokardiyum ve miyokardiyum tabakalarında çok sayıdaki hücrelerde yoğun ADAM-10 immün-pozitivitesi izlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 2(2-3)]. **D(x40) SPE Grubu:** Sulu Propolis uygulama grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde endokardiyumun subendokardiyale bölgesinde ve miyokardiyum tabakasındaki hücrelerde immün-pozitivite hücrelerin sayıca azalmış olduğu gözlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 1(0-1)]. **E(x40) EPE Grubu:** Etanollü Propolis uygulama grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu izlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 1(0-1)]. **F(x40) GW Grubu:** İnhibitör uygulama grubuna ait kalp dokusu kesitlerinde endokardiyumun subendokardiyale bölgesinde ve miyokardiyum tabakasındaki ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hücrelerin azalmış olduğu izlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 1(0-1.5)]. **G(x40) DMSO Grubu:** DMSO grubuna ait aort dokusu kesitlerin başta endokardiyumun subendokardiyale bölgesi olmak üzere miyokardiyum tabakalarında yoğun ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren hücreler olduğu gözlemlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 2(1-2)]. **H(x40) Etanol Grubu:** Etanol grubuna ait kalp dokusu kesitlerin başta subendotelial bölge olmak üzere miyokardiyum tabakalarında yoğun ADAM-10 immün-pozitivitesi gösteren çok sayıda hücrelerin olduğu izlenmekte [ADAM-10 Pozitivite Skoru: 2(2-2)].

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya'daki ölümlerin en önemli nedeni olan kardiyovasküler hastalıkların etiyolojisinde başta ateroskleroz olmak üzere dislipidemi, yüksek kan basıncı, yüksek kan glukozu, artmış inflamatuvar belirteçler, oksidatif stres ve protrombotik durum gibi kardiyometabolik risk faktörleri yer almaktadır (3). Bu risk faktörleri arasında en fazla çalışılanı ise şüphesiz ki en yaygın olarak görülen ateroskleroz sürecidir. Ateroskleroz, insan sağlığına zararlı kronik bir kardiyovasküler hastalık olup dünyadaki en önemli ölüm nedenlerinden biridir. Aterosklerozdaki ana lezyonlar, düz kas hücresi ve fibröz matriks proliferasyonu ile birlikte arterin bazı kısımlarında lipid birikimi ile başlar ve yavaş yavaş aterosklerotik plak oluşumu ile karakterize edilir. Ateroskleroz çocukluk çağında oluşmaya başlar ve on yıllarca sessiz bir şekilde ilerler. Gelişen aterosklerotik plak zamanla damar lümeninde daralmaya neden olarak kan basıncında artış ve dolaşım bozukluğuna neden olduğu bilinmektedir (8, 9). Hatta bu lezyon bölgesinin yırtılarak veya erozyona uğrayarak trombüs oluşumuna yol açarak çevre dokularda iskemiye neden olduğu da bilinmektedir. Ateroskleroz gelişimine dislipidemi, inflamasyon, obezite ve diyabet gibi metabolik bozukluklar da katkı sağlar (150).

Ateroskleroza neden olan veya aterosklerozun neden olduğu birçok patoloji biliniyor olmasına olmasına rağmen aterosklerotik lezyonun patobiyolojisine ilişkin bilgiler oldukça sınırlıdır. Arterlerde ateroskleroza ilişkin patolojik değişiklikler ameliyat sırasında ve kadavralardan elde edilen kesitsel çalışmalar ile ortaya konulmuştur (151-154). Mevcut invaziv olmayan görüntüleme teknikleride günümüzde aterosklerotik lezyonlarla ilgili sınırlı bilgiler sunmaktadır. Aslında günümüzde aterosklerotik lezyon bölgesi ile ilgili bilgilerin sınırlı kalmasında, birçok kimyasal ve hücrel etkileşimde önemli rol oynamaktadır (155, 156).

Bu nedenlerle çalışmamızı ateroskleroz sürecinde güçlü hipotezlerle desteklenen dislipidemi ve inflamasyon kapsamında gerçekleştirdik.

İnflamasyonun aterosklerotik plağın oluşumu ve gelişiminde önemli bir rol oynadığı kanıtlanmıştır. Erken evre aterosklerozda, endotel hasarı, anormal lipid metabolizması ve hemodinamik hasar görülmekle birlikte, aterojenik sürece endotel hücrelerdeki (EC) inflamatuvar değişikliklerin eşlik ettiği düşünülmektedir (157). Endotel hücrelerin aktivasyonu ile ICAM-1, VCAM-1, E-selektin, P-selektin ve diğer inflamatuvar faktörler, endotele bağlanan ve arter duvarına sızan lenfositleri ve monositleri içeri çekerek

inflamasyonu başlatır (158). EC'lerin yanı sıra makrofajlar, lenfositler (T ve B hücreleri), dendritik hücreler (DC'ler), vasküler düz kas hücreleri (VSMC'ler), IL'ler, adezyon molekülleri ve TNF- α gibi birçok hücre ve sitokin bu sürece dahil olur (159).

Geç evre aterosklerozda çok sayıda makrofaj ve diğer inflamatuvar sitokinler damar duvarına sızar, MMP'ler salgılar ve plağın hücre dışı matriksindeki kollajen liflerini bozarak plak rüptürü, kanama ve tromboza neden olur (160, 161).

İnflamasyonun ateroskleroz sürecine olan etkisi göz önüne alındığında belki de bu inflamatuvar ajanların ve adhezyon moleküllerinin en önemli düzenleyicilerinden biri olan ADAM proteazların bu sürece katkısının değerlendirilmesi önemlidir. ADAM proteazlar, çinko (Zn^{2+}) bağımlı proteolitik aktiviteye sahip tip 1 transmembran proteinleridir. İnsan genomunda toplam 22 ADAM tanımlanmış olup, tanımlanan ADAM proteinlerinin yaklaşık yarısı sadece testis ve epididim dokularına spesifikken diğer yarısı hemen hemen tüm dokular tarafından sentezlenmektedir (11).

Tüm ADAM'lar arasında özellikle inflamatuvar sürece direkt etkilerinden dolayı en çok çalışılan ve yapısı en iyi aydınlatılan ADAM10 ve ADAM17'dir. ADAM10 ve ADAM17'nin Hb-EGF gibi EGFR ligandlarının, çeşitli sinyal yollarının (NOTCH sinyal yolağı), çeşitli inflamatuvar ajanların; TNF- α , interlökinler ve adezyon moleküllerinin ektodomainlerini kırıp aktif hale getirilebileceği gibi, bu ligandların reseptörlerini de sheddaz işlemiyle hem aktivasyon hem de inaktivasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (14). Son yıllarda daha çok romatoid artrit, kanser gibi çeşitli hastalıkların patofizyolojisinde rol oynadığı bildirilen ADAM proteazlarının son yapılan çalışmalarda kardiyovasküler hastalıkların temelinde yer alan ateroskleroz gelişiminde hem dislipidemi hem de inflamatuvar süreçte etkili olduğu ortaya konmuştur. İnsan aterosklerotik plaklarından izole edilen mikropartiküller üzerinde yapılan çalışmada ADAM17 aracılığıyla TNF α , TNFR ve EPCR seviyelerinin arttığı ve buna bağlı olarak inflamasyon ve aterosklerotik plak oluşumunun indüklendiği bildirilmiştir (121). Ayrıca ADAM10 ve ADAM17 aktivitesiyle aktifleşen NOTCH sinyal yolağı aracılığıyla endotel hücrelerinde inflamatuvar sitokinlerin salınmasının neden olabileceği bildirilmiştir (113). Yine NOTCH sinyal yolağı aktivitesiyle M1 makrofajlar İnterlökin (IL-1,IL-6,IL-12,IL-15,IL-18, IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-15, IL-18), makrofaj migrasyon inhibitör faktör (MIF), TNF- α gibi sitokinlerin salınımında artış, NOTCH sinyal yolağının inhibisyonuyla M2 makrofajlar aracılığıyla transformin büyüme faktörü beta (TGF- β) gibi sitokinlerin salınımında azalış gözlenmiştir. Bu nedenle

ADAM10/17'nin ateroskleroz sürecindeki inflamasyona direkt katkısı olduğu düşünülmektedir. Ayrıca ADAM10'un substratı olan sortilinde VLDL sekresyonunu artırarak endojen lipid metabolizmasında rol oynadığı bilinmektedir (162).

Tüm bu bilgiler ışığında ADAM10 ve ADAM17'nin ateroskleroza neden olduğunu söylemek zor iken, ateroskleroz sürecinin gelişimine olan katkısı ise daha az tartışılır konumdadır. Farklı patolojilere ilişkin çalışmaların daha da derinletilmesi amacıyla ADAM10 ve ADAM17 knockout fareler üretilmişler fakat embriyonik dönemde, prenatal dönemde veya doğumdan kısa süre sonra çeşitli nedenlerle (çoğunlukla kardiyak gelişim bozukluğu) öldüğü bildirilmiştir. Her ne kadar bu farelerde üzerinde yapılan kısıtlı çalışmalarda inflamasyona karşı çok güçlü pozitif sinyaller alınsa da ADAM17'nin normal fizyolojik şartlar gelişim ve farklılaşma için önemli rol oynadığı sonucuna varılmıştır (163, 164).

Buradan hareketle araştırmacılar ADAM proteazların sınırlı inhibisyonlarının bazı hastalıklarının ağır seyretmesinin önüne geçebileceğini öne sürmüşler ve bunun üzerine ADAM10 ve ADAM17 proteazlarının inhibisyonu için çeşitli kimyasal ajanlar geliştirilmiş ve çeşitli aşamalarda çalışmalara devam etmektedir (11). Çalışmamızda kullandığımız GW280264X ise ADAM10 ve ADAM17 inhibitörü olarak tanımlanmış kimyasal bir ajandır. Çeşitli antikanser çalışmalarında *in vitro* ve *in vivo* etkinliği değerlendirilmiş ve olumlu sonuçlar alınmıştır (165). Ancak bu inhibitörün deneysel ateroskleroz gelişimi üzerine etkinliği değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada GW280264X'in antiaterojenik aktivitesi ilk defa değerlendirildi.

Günümüzde kullanılan ilaçların yan etkilerinin ve toksisitelerin artması nedeniyle insanlar sağlıklı yaşamak adına doğal ürünlerin tüketimine yönelmiştir. Arı ürünlerinde doğal ürün pazarında önemli bir yere sahiptir. İnsanlar arı ürünlerinden özellikle propolis, bal ve poleni sıklıkla tüketmektedir. Propolis en yüksek biyolojik aktiviteye sahip arı ürünüdür. Propolis muhteviyatında bulundurduğu onlarca polifenol ve flavonoidler sayesinde yüksek antiinflamatuvar ve antioksidan aktiviteye sahiptir. Reçinemsî yapısı nedeniyle propolis organik çözücülerde (etanol, metanol, DMSO gibi) iyi bir şekilde çözünürken, suda daha az çözünmektedir (131-135). Ancak organik çözücülerin sağlığa olan olumsuz etkileri göz önüne alındığında sulu propolis tüketiminin daha sağlıklı olduğu bilinmektedir. Literatürde sınırlı sayıda da olsa su haricindeki çeşitli çözücülerle ekstrakte edilmiş propolisin çeşitli antiaterojenik etkileri farklı metodlarla incelenmiş ve olumlu

sonuçlar ortaya konulmuştur (166). Ancak sulu propolis ekstraktının hem ateroskleroz gelişimine hemde ateroskleroz gelişim sürecinde artan ADAM10/17 aktivitesi üzerine etkileri araştırılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda hem sulu hem de etanollü propolisin antiaterojenik ve ADAM10/17 aktivitesi üzerine etkileri hem *in silico* hem de *in vivo* olarak araştırıldı.

Çalışmada kullanılan propolisin içerik tayininde belirlenen başlıca 11 polifenol/flavonid'in (133) ve yine çalışmamızda kullanılan sentetik kimyasal inhibitör (GW280264X)'ün ADAM10 ve ADAM17 enzimleri üzerine aktivitesi *in silico* olarak değeriendirilmiştir.

ADAM10 için katalik domain, disintegrin domain ve sisteince zengin bölgeninde içinde yer aldığı ekstraselüler domain hedef olarak belirlenmiştir. Normal şartlarda Şekil 4'de gösterildiği gibi sisteince zengin domainin ADAM10'un katalitik bölgesinin inaktif konumda kalmasına neden olduğu bilinmektedir (167). Çalışmamızda ligand olarak değeriendirdiğimiz bütün polifenoller ve flavanoidler ADAM10'un katalik domaini üzerinden bağlanarak inhibitör etkinlik göstermişlerdir. Ancak GW280264X (Ki:-4,99 kcal/mol) ile kıyaslandığında en iyi inhibitör etkinliği kampferol (Ki: -8,59 kcal/mol) göstermiştir (Şekil 18). Kampferol protein zincirindeki Gly³²⁶, Val³²⁷, His³⁸³, Glu³⁸⁴, Tyr⁴¹⁵, Thr⁴²² ve Tyr⁶³⁸ rezidüleri ile non kovalent etkileşimler (Hidrojen bağı, van der Waals etkileşimler, pi sigma, pi-pi etkileşimi gibi) kurarak inhibitör etkinlik göstermiştir.

ADAM17 için substratların tanımlanmasından sorumlu, disülfid köprüleri içeren membran proksimal domain hedef olarak belirlenmiştir (168). Çalışmamızda ligand olarak değeriendirdiğimiz bütün polifenoller ve flavanoidler ADAM17'nin membran proksimal domaini üzerinden bağlanarak inhibitör etkinlik göstermişlerdir. Ancak GW280264X (Ki:-6,84 kcal/mol) ile kıyaslandığında en iyi inhibitör etkinliği galangin (Ki: -5,65 kcal/mol) göstermiştir (Şekil 19). Galangin protein zincirindeki Cys¹³, Cys³¹, Ala¹², Asn¹⁴ ve Pro³³ rezidüleri ile non kovalent etkileşimler (Hidrojen bağı, van der Waals etkileşimler, pi sigma, pi-sülfür gibi) kurarak inhibitör etkinlik göstermiştir. Ligandların membran proksimal domain üzerinde yer alan disülfid köprülerini kırarak konformasyonel değışikliğe neden olduğu ve buna bağılı olarak inhibitör etkinlik gösterdiği öngörülmektedir.

Bu ligandların hedef proteinler üzerindeki etkinliği ilk kez bu çalışma kapsamında değeriendirilmiştir. Bu bulgulardan sonra propolisin ve inhibitörün ateroskleroz gelişim sürecine olası etkileri daha fazla merak uyandırmış ve akabinde *in vivo* alışma yapılmıştır.

Ancak daha öncede bahsedildiği gibi aterosklerozun teşhisi ve takibi oldukça karmaşık zorludur.

İnsanlarda aterogenezi tanımlamadaki bu zorluklar göz önüne alındığında, hayvan modelleri lezyon oluşumunun başlamasından ve olgunlaşmasından sorumlu mekanizmalar hakkında değerli bilgilere aracılık etmişlerdir. Yıllar boyunca birçok hayvan modeli ateroskleroz için kullanılmıştır, ancak tarihsel olarak maymunlar, domuzlar ve tavşanlar üzerinde yapılan çalışmaların bir üstünlüğü olmuştur (169-173).

Günümüz ateroskleroz araştırmalarında ise fare modellerinin kullanımı oldukça yaygınlaşmıştır. İlk fare çalışmalarında ağırlıklı olarak doymuş yağ, kolesterol ve kolat ile desteklenmiş bir diyetle beslenen C57BL/6 fareler kullanıldı (174). Ancak günümüzde C57BL/6 farelerin yerini, büyük ölçüde ya endojen olarak hiperlipidemik olan ya da diyetle bağlı hiperlipidemiye duyarlı olan genetik olarak manipüle edilmiş fareler almıştır. En yaygın olarak kullanılan genetik olarak manipüle edilmiş fareler, ApoE^{-/-} ve LDLR^{-/-} farelerdir. ApoE^{-/-} normal fare diyeti ile hiperlipidemik profile sahip olup aterosklerotik lezyonlar oluştururken (175, 176); LDLR^{-/-}, önemli lezyonlar geliştirmek için diyet ile doymuş yağ ve kolesterol takviyesi gerektirir (177, 178). Fare türü kadar cinsiyetinin de ateroskleroz çalışmalarının sonuçları üzerinde büyük bir etkisi olabileceği açıktır (179, 180). Birçok çalışma, daha büyük ölçüde ateroskleroz geliştirecekleri varsayımı nedeniyle dişi fareleri kullanmıştır. Hatta bu hipotezlerini dişilerde daha büyük lezyonların geliştiğini göstererek doğrulamışlardır (181, 182), ancak bu bulgular daha sonra ki bazı çalışmalar ile tutarlılık göstermemiştir (179, 183). Ayrıca dişilerde yüksek oranda sentezlenen östrodiol'ün ateroskleroza karşı koruyucu etkinlik gösterdiği bilinmektedir.

Bu nedenlerle çalışmamızda deneysel ateroskleroz modeli oluşturmak için 6-8 haftalık erkek ApoE^{-/-} fareleri kullandık. Normal diyet ile aterosklerotik lezyon göstermesine rağmen çalışmamızda aterojenik diyet kullanılarak aterosklerotik lezyon oluşumu ve gelişimi hızlandırılmıştır (184). Yüksek kolesterolü diyet 16 hafta boyunca günlük 4-6 g/hayvan olacak şekilde uygulandı (185).

Çalışmanın başlangıcından itibaren 4 haftada bir hayvanların ağırlığı aynı zamanda tartılmıştır. Başlangıçta gruplar arasında anlamlı bir ağırlık farkı yoktu ($p>0,003$), ancak 4., 8., 12. ve 16. hafta sonunda tüm deney grupları, K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0,003$). SPE, EPE ve GW grupları ile V grubu arasında ise 4., 8., ve 12. hafta sonunda istatistiksel olarak fark yoktu, ancak 12 haftadan itibaren başlayan ve 4 hafta

süren tedavi sonucunda 16. haftanın sonunda V grubuna göre ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur ($p<0,003$). Aterojenik diyet ile beslenen ApoE^{-/-} fareler C57BL-6J'lere göre fazla kilo almışlardır. V, DMSO ve Etanol grupları arasında ise 4., 8., 12. ve 16. hafta sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,003$). SPE, EPE ve GW 12.haftadaki ağırlıklarına göre 16. haftanın sonunda sırasıyla %7,6 , %4,2 , %5,3 oranında ağırlık kaybına neden olarak obeziteye ve obezite ile ilişkili komplikasyonlara karşı koruyucu etki göstermişlerdir. Ayrıca bu gruplar arasında 16. haftanın sonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,003$).

İchi ve arkadaşları yüksek yağlı diyet ile obezite indükledikleri ratlarda intragastrik etanollü propolis uygulamasının yağ doku kütleindeki azalışa bağlı olarak kilo artışını önlediğini belirtmişlerdir (186). Koya-Miyata ve arkadaşları yüksek yağlı diyet ile besledikleri C57BL-6J farelerde intragastrik etanollü propolis takviyesinin SREBP-1 ve SREBP2'nin ekspresyonlarını aşağı yönlü regüle ettiğini, buna bağlı olarak yağ asidi ve kolestreol sentezini inhibe ederek visceral yağ birikimini azalttığını belirtmişlerdir (187).

Literatürde sulu propolis ekstraktının hayvan ağırlığına etkisine ilişkin herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Ancak çalışmamızda kullandığımız propolisin içeriğinde bulunan en önemli moleküllerden biri olan trans-sinamik asit'in yüksek yağlı diyet ile beslenen C57BL-6J farelerde kilo kaybına neden olduğu bildirilmiştir (188).

Literatürde GW280264X'in metabolik bozukluklara ilişkin herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda gözlemlenen antiobezite etkisi ilk kez değerlendirilmiştir. TNF- α 'nın obez insan ve farelerde, BKİ, hiperinsulinemi ile pozitif korelasyon gösterdiği bilinmektedir. Dolayısıyla ADAM10/17 inhibisyonu ile birlikte TNF- α seviyelerinde azalmaya bağlı olarak kilo kaybı gerçekleştiği öngörülmektedir (189).

Bu veriler ışığında çalışmamızda hayvan ağırlık verileri hem mevcut literatürle uyum gösterirken hem de literatüre orijinal bilgiler kazandırmıştır.

in silico çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulguları *in vivo* olarak değerlendirmek için aterosklerotik lezyonun yoğun olduğu aortik ark ve aortik kökü içeren doku homejenatında ADAM10/17'nin aktivitesi florometrik olarak ölçüldü. V grubunda ADAM10/17 aktivitesi beklendiği gibi çözücü grupları hariç diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,003$). SPE, EPE ve GW grubunda ADAM10/17 aktivitesindeki azalış kinetik ölçüm ile doğrulanmıştır. Bu tedavi grupları arasında en iyi etkinliği SPE grubu göstermiştir. SPE grubundaki ADAM17 aktivitesiyle K

grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,003$). Bunun en önemli nedenlerinden birinin deneyde kullanılan dozlar olduğu düşünülmektedir.

Sommer ve arkadaşları C57BL-6J farelerde oluşturdukları deneysel spinal kord hasarı çalışmasında inflamasyona karşı GW280264X'i 1 hafta boyunca 100 µg/kg i.p. olarak uygulamışlar ve olumlu sonuçlar almışlardır (190). Urriola ve arkadaşları ratlarda gerçekleştirdiği germ hücre apoptoz çalışmasında ADAM17 aktivitesinin rolünü değerlendirmek amacıyla 10µM'luk GW280264X'i 20 gün boyunca uygulamışlardır (191). Propolisin ise farelere farklı dozlar ve sürelerde i.p. enjeksiyon ile birçok çalışma vardır (192). Bu nedenlerle doz çalışması yaparak hem hayvan sayısını hemde tüketilecek sarf malzemenin engellenmesi amacıyla GW, SPE ve EPE için belirlenen dozlar sırasıyla 100 µg/kg, 400 mg/kg ve 200 mg/kg'dır. SPE'nin ADAM17'ye karşı hem EPE'den hem de GW'den daha iyi inhibitör etkinlik göztermesinin bir başka nedeni de yine doza bağımlı olarak bileşiminde en bol bulunan kafeik asit (K_i ; ADAM17 için -4,64) olduğu düşünülmektedir (133).

Çalışmamız sonucu elde edilen serum örneklerinde metabolik durumu gözlemlemek için Glu, TG ve TK, ekstraktların karaciğer ve böbrek fonksiyonlarına olası etkilerini ise ALT, AST ve BUN seviyelerini enzimatik kolorimetrik yöntemle ölçerek belirlendi.

V grubunda Glu değerleri literatürle uyumlu olarak diğer tüm gruplara istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,003$) (193). SPE, EPE, GW, DMSO ve Etanol gruplarında ise K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşük Glu seviyeleri ölçülmüştür ($p<0,003$). Propolisin TNF- α , IL-6 başta olmak üzere çeşitli inflamatuvar ajanların seviyelerini düşürerek kan glukoz seviyelerini azalttığı bildirilmiştir. Guan ve arkadaşları yüksek yağlı diyet ile beslenen C57BL-6J Farelerde STZ indüklü DM2 modelinde propolisin iskelet kasında glukoz transporter 4 (GLUT4)'ün membrana translokasyonunu artırdığı ve propolis tedavisinin kan glukoz seviyeleri azalttığını bildirmişlerdir (194). Al Ghamdi ve arkadaşlarının BALB/c farelerde oluşturduğu DM modelinde etanollü propolisin kan glukoz seviyelerini azalttığını vurgulamışlardır (195).

Literatürde GW280264X'in kan glukoz seviyelerine ilişkin etkisini araştıran herhangi bir çalışma yoktur. Ancak iki nedenle kan glukoz seviyelerine etki etmiş olabilir; bunlardan ilki tıpkı propolis gibi başta TNF- α , IL-6, Pref-1 gibi moleküllerin aşağı yönlü regülasyonu, bir diğeri ise GW280264X'in çözücüsü olan DMSO'nun GLUT4'ün membrana translokasyonunu indüklemesi olarak değerlendirilmiştir (196, 197).

Ateroskleroz sürecinde önemli rol oynayan TG ve TK seviyeleri literatürle uyumlu olarak, V grubunda K, S, SPE, EPE ve GW grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksektir ($p<0,003$) (198). Brezilya propolisi içeren peletlerle (%0.05 ve %0.5) beslenen sıçanlar, doza bağımlı bir şekilde plazma trigliseritlerinde ve toplam kolesterolde azalış gözlemlenmiştir (186). Öte yandan, Hırvat propolis etanol ekstraktının C57BL-6N farelere (50 mg/kg/gün) 30 gün boyunca oral yoldan verilmesi, serum trigliserid (~%11), toplam kolesterol (~%19) ve LDL-K (~%35) düzeylerini düşürdüğü bildirilmiştir (199).

Etanollü propolis ekstraktının intraperitoneal enjeksiyonları (100 mg/kg, 12 hafta boyunca haftada iki kez) ob/ob farelerin toplam kolesterol düzeylerini hafifçe düşürürken, trigliserit düzeylerini etkilemediği belirtilmiştir (200). Sulu propolis ekstraktının ve GW280264X'in farelerde TG ve TK değerlerine ilişkin literatürde bilgi bulunamamıştır.

Karaciğer ve böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için ölçülen ALT, AST ve BUN değerlerinden, anlamlı farkı AST verileri sunmuştur. AST seviyeleri S, EPE ve Etanol grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur ($p<0,003$). S, EPE ve çözücüsü Etanol gruplarında AST seviyelerinin yükselmesi açıklanabilir bir bulgudur ve literatürle uyumludur (201, 202). S grubunun V grubuna göre yüksek AST profiline sahip olmasının nedenlerinden biride ApoE'dir. S grubunda aterosjenik diyet ile beslenen C57BL-6J fareler ApoE'ye sahip olduğu için karaciğere daha fazla lipid girişine maruz kalır. Buna bağlı olarakta AST seviyeleri yükselmiş olabilir.

Aterosklerotik plak oluşumu ve gelişiminin en önemli risk faktörleri arasında yüksek LDL-K seviyelerinin önemi bilinmektedir (28, 203, 204). Ancak PCSK-9 inhibitörü ile LDL-K seviyeleri yeterince düşürüldüğünde bile önemli ölçüde kardiyovasküler risk devam etmektedir (205, 206). Son yıllarda aterosklerozun her evresinde inflamasyon sürecinin aktif olduğuna dair bilgiler artmaktadır. LDL-K'nin intimada birikimi ve oksidasyonu, inflamasyonu şiddetlendirip aterosklerozu tetikletmektedir. Bu nedenle aterosklerozda inflamasyona müdahale oldukça önemlidir (207-209).

İnflamatuvar sürecin aktörleri olan sitokinler, öncelikle bağışıklık sisteminde otokrin, parakrin veya endokrin yollarla haberciler olarak işlev gören küçük glikoproteinlerdir. Sitokinler, spesifik reseptör komplekslerine bağlanır ve bu kompleksler, hedef hücrelerde gen ekspresyonunu modüle etmek için giderek daha iyi karakterize edilen sinyal transdüksiyon yolları aracılığıyla sinyal verir. Büyük, yapısal olarak ilişkili üst ailelerde 100'den fazla sitokin tanımlanmıştır ve bunlar, bağışıklık sistemi içinde ve ötesinde

çok çeşitli düzenleyici ve efektör işlevlere aracılık eder. Sitokinler, entegre kademeli olarak efektör fonksiyonlarını kolaylaştırarak koordineli bir şekilde düzenlenme eğilimindedir; bununla birlikte, bazı sitokinler bu hiyerarşi içinde çok önemli konumları işgal ediyor gibi görünmektedir ve bu nedenle önemli terapötik fırsatlar sunmaktadır (210).

TNF- α , TNFRI ve TNFRII'ye bağlanabilen homotrimerik bir sitokin olup çeşitli moleküler ve hücresel olayları etkilemektedir. Endoplazmik retikulumdan membrana geçen TNF- α burada fonksiyonel bir zar proteini olarak kalır veya zara bağlı bir parçalayıcı enzim olan TNFa dönüştürücü enzimin (TACE;ADAM17) etkisiyle çözünür forma dönüşür. Çözünür forma dönüşen TNF- α , ADAM10/17 substratı olan TNFRI veya TNFRII'ye bağlanarak; lökosit aktivasyonunu ve olgunlaşmasını, sitokin ve kemokin salınımını, ve reaktif oksijen ve nitrojen ara maddelerinin üretimini düzenler. Bu rolleriyle TNF- α inflamatuvar sürecin tam merkezinde yer almaktadır (211, 212).

Dokuda ölçtüğümüz TNF- α ; SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,003$). Hatta SPE ve GW gruplarıyla K grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,003$). Literatürde çeşitli deneysel çalışmalar sonucunda propolisin TNF- α seviyelerini aşağı yönlü regüle ettiğini gösteren bir çok çalışma vardır (213, 214).

TNF- α 'nın yanı sıra aterosklerozda rol oynayan sitokinlerden biri de IL-1 β 'dir. Kapsamlı klinik bir çalışma olan CANTOS'da monoklonal IL-1 β inhibitörünün ateroskleroza tedavi etmedeki etkinliği gösterilmiştir (215).

IL-1 β başlıca monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından sentezlenir (216). Daha sonra hedef dokuda ADAM17 substratı olan IL-1R'üne bağlanır. Sinyal IL-1R ilişkili kinazlar veya yine ADAM10/17 substratı olan TNFR ilişkili faktör 6 (TRAF-6) iletilir. IL-1 β uyarısı sonrasında IL-6, ICAM-I, VCAM-I, mononükleer fagositleri(MCP-1), MMP-1, MMP-8 ve MMP-13'ün seviyeleri artar. IL-6 aterosklerotik trombüs oluşumu ile ilişkili olan CRP, fibrinojen gibi akut faz reaktanlarının seviyesini artırırken, MMP'ler kollejenaz aktiviteleri ile aterosklerotik fibröz plağın yırtılmasında rol oynar (217-220).

Çalışmamızda SPE, EPE ve GW gruplarında serum IL-1 β seviyeleri, V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüktür ($p<0,003$). Aterojenik diyetle beslenen V grubunda artan IL-1 β seviyeleri 4 haftalık tedavi sonrasında SPE, EPE ve GW gruplarında sırasıyla %60, %35, %47 oranında azalmıştır. SPE, EPE ve GW gruplarını kendi arasında kıyaslandığında, SPE'nin daha yüksek etkinlik gösterdiği gözlenmiştir ($p<0,003$). SPE'nin EPE ve GW'den

daha yüksek dozda uygulanmasının bu sonuca neden olduğu öngörülmektedir. Sonuç olarak ADAM10/17, IL-1 β sinyal yolağında iki anahtar molekülün sheddazından sorumludur. GW280264X uygulamasıyla IL-1R aktivitesi inhibe edilmiş ve geri besleme mekanizması bozulmuştur. Propolis ekstraktlarının ADAM10/17 aktivitesini inhibe ederek IL-1 β sinyal yolağını kesintiye uğrattığı öngörülmektedir. Ayrıca intima bölgesinde biriken ve okside olan LDL-K'ün ilettiği proinflatuvar üretim sinyalini antioksidan aktivitesi ile de azaltmış olabilir (221-224).

Lp-PLA2, aterosklerotik plak gelişimi ve stabilitesi hakkında bilgi sağlayan, vasküler spesifik inflamasyonun yeni bir biyobelirteçtir. Yüksek serum Lp-PLA2 seviyeleri, yırtılmaya eğilimli aterosklerotik plağın göstergesidir ve koroner arter hastalığı, miyokard infarktüs ve inme dahil olmak üzere kardiyovasküler riskin güçlü bir bağımsız göstergesidir (225, 226).

Biyolojik olarak Lp-PLA2, arteriyel intimada fizyolojik olarak çalışan vasküler spesifik proinflatuvar bir enzimdir. Lp-PLA2, özellikle nekrotik çekirdekli plaklarda ve rüptüre plaklarda olmak üzere aterosklerotik plakta lokalize olur (227). Rüptüre eğilimli plaklarda yüksek seviyelerde PLA2 bulunur ve PLA2'nin bu plaklardan dolaşıma salındığı bilinmektedir.

Lp-PLA2 başlıca makrofajlar tarafından üretilir ve daha sonra LDL'nin ApoB kısmı ve lipoprotein(a) dahil olmak üzere çeşitli lipoproteinlere bağlanır (228). Koroner ve karotis dokusunun immün boyanması ile yırtılmaya eğilimli plakların ince fibröz başlığında Lp-PLA2'nin varlığını gösterilmiştir (227, 229, 230).

Lp-PLA2, subendotelial boşlukta oksitlenmiş LDL partiküllerinden fosfolipidleri hidrolize eder bunun sonucunda oksitlenmiş yağ asitleri ve lizofosfatidilkolin (lizoPC) oluşur, ayrıca monositlerin kemoatraksiyonu, adezyon moleküllerinin ekspresyonu ve endotelial NO üretimi artar (231, 232). Bu şekilde, monositlerin makrofajlara ve nihayetinde köpük hücrelere dönüşmek üzere farklılaşacakları, ve aynı zamanda lokal olarak daha fazla PLA2 üretecekleri intimaya alınmasına yol açan bir kısır döngü kurulur. Ayrıca, yine IL-1 β 'da olduğu gibi plak yırtılmasına yol açan MMP'lerin üretimini indükler (233).

Serumda ölçtüğümüz Lp-PLA2; SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,003$). Literatürde ne propolisin ne de ADAM10/17'nin Lp-PLA2 ile direkt ilişkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. GW grubunda ADAM10/17 inhibisyonu ile Lp-PLA-2 etkinliğiyle artan makrofajların göçü

engellenmiş veya makrofajların farklılaşması M2 makrofajlar lehine dönmüş olabilir. Ayrıca kullanılan sentetik inhibitör çeşitli MMP'lerde inhibitör etkinlik göstererek PLA-2 etkisiyle başlayıp, PLA-2 üretimiyle sonlanan kısır döngü engellenmiş olabilir. Ayrıca tüm bu hipotezlerden bağımsız olarak GW grubunda azalan Lp-PLA2 seviyelerinin Lp-PLA reseptörlerinin ADAM10 ve/veya ADAM17'nin substratı olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Propolisin ADAM10/17 aktivitesini azaltmasının yanı sıra antioksidan etkinlikliğiyle oxLDL üretiminin azalmasına ve köpük hücre oluşumunun engellemesi aracılığıyla ateroskleroz sürecinde serum Lp-PLA-2 seviyelerini azalttığı öngörülmektedir.

IL-6'nın, akut faz reaktanlarının hepatik sentezinin uyarılmasında, endotel hücrelerinin aktivasyonu, artan pıhtılaşma, hipotalamik-hipofiz-adrenal ekseninin aktivasyonu ve lenfosit proliferasyonu ve farklılaşmasının teşvik edilmesi dahil olmak üzere çeşitli işlevleri vardır. Bu çeşitli etkiler, aterosklerozun zaman çizelgesinde farklı aşamalarında meydana gelerek plak gelişimini, ilerlemesini ve komplikasyonlarını etkiler. Bir aterosklerotik lezyonun gelişiminde, IL-6, inflamatuvar hücrelerin akışını koordine etmekten büyük ölçüde sorumludur. Endotelyal hücreler, bir IL-6 kompleksinin ve çözünür IL-6 reseptörünün etkileşimiyle kompleksin gp130 adlı reseptöre bağlanmasıyla birlikte lökositlerin agregasyonu ve intimaya göçüne yönlendiren kemokinlerin sentezini ve ICAM-1'in ekspresyonunu artırarak yanıt verir (234).

Dokuda ölçtüğümüz IL-6; SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,003$). Literatürde propolisin IL-6 ekspresyonu ve seviyeleri aşağı yönlü regüle ettiği birçok çalışma bulunmaktadır (166, 235, 236). ADAM10/17, IL-6 sinyal yolunun önemli bir parçası olan IL-6R ve gp130'un shedddazından sorumludur. Bu nedenle GW, SPE ve EPE grubunda azalan IL-6 seviyelerine bu enzimlerin aktivitesinin azalmasının neden olduğu öngörülmektedir (96).

İnflamatuvar süreç boyunca, inflamatuvar süreci modüle etmek için antiinflamatuvar sitokinler de üretilir. Proinflamatuvar sitokinlerin aterosklerozda rolünü destekleyen çok sayıda kanıt olmasına rağmen, bu ortamda antiinflamatuvar sitokinlerin potansiyel rolü hakkında çok az bilgi mevcuttur (155).

Th2 alt tipi lenfositler tarafından ve M2 Makrofajlar tarafından salgılanan interlökin IL-10 antiinflamatuvar sitokindir (237, 238). IL-10, plak gelişiminde önemli bir rol oynayabilecek birçok hücreyel süreci örneğin; nükleer faktör- κ B (NF- κ B) aktivasyonu (239,

240), metaloproteinaz üretimi (241), ve siklooksijenaz-2 ekspresyonunu inhibe ederek (242), trombüs oluşumunun önüne geçer (243, 244).

Dokuda ölçtüğümüz IL-10; SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,003$). ADAM10/17 enzimleri immün hücrelerin sentezi, gelişimi ve farklılaşmasını direkt etkileyerek, IL-10 üretimini dolaylı kontrolünü sağlarlar (96). GW, SPE ve EPE aracılı ADAM10/17'nin aktivitesinin azalmasıyla, M1 makrofor ve Th1 lenfosit farklılaşması azalmıştır, bunun sonucunda antiinflamatuvar IL-10 seviyeleri yükseldiği düşünülmektedir. Ayrıca yine ADAM10/17'nin aktivitesinde düşüşle NOTCH sinyal yolağının inaktivasyonu ile IL-10 seviyeleri arttığı öngörülmektedir.

MPO, nötrofiller ve monositler tarafından sentezlenen hem peroksidaz enzim ailesi üyesidir (245, 246). MPO, fagositlerin mikrobisidal sisteminde, insan vücudunda üretilen en güçlü oksidan moleküllerden biri olarak kabul edilen hipokloröz asit (HOCl) oluşumunu katalize eder. Patojenlere karşı immün savunmadaki önemli rolüne rağmen, MPO ve oksidatif ürünleri çeşitli lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek konakçı dokularda genellikle ateroskleroz gibi devam eden inflamatuvar durumlarla ilişkili bazı zararlı etkilere neden olur (247).

İnsan ateroskleroz plaklarında immünohistokimyasal olarak yapılan incelemede MPO'nun ve MPO'nun ürünü olan HOCl ile modifiye edilmiş LDL'ler olduğu belirtilmiştir (248, 249). Bu nedenle, MPO'nun, özellikle HOCl'nin, aterosklerotik hastalıkların patofizyolojisinde yer aldığı bilinmektedir (250, 251).

Hem *in vitro* hem de *in vivo* ortamlarda LDL'nin oksidasyonundan birkaç sürecin sorumlu olduğu bildirilmesine rağmen, MPO tarafından oksitlenen LDL, bu teoriyi doğrulayan önemli kanıtlarla fizyolojik olarak en ilgili oxLDL tipi olmaya devam etmektedir. MPO sistemi tarafından modifiye edilen LDL, ateroskleroz plaklarında bulunan çok sayıda hücreyi etkiler; buna EC'ler, makrofajlar ve düz kas hücreleri dahildir (251).

Dokuda ölçtüğümüz MPO; EPE grubunda V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0,003$). Ancak SPE ve GW gruplarında MPO seviyelerinde V grubuna göre düşüş olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,003$). Li ve arkadaşları, çalışmamızda kullanılan propolisinde bileşiminde bulunan kuersetinin ApoE^{-/-} farelerde MPO'yu inhibe ettiğini bildirmişlerdir (252).

IFN- γ , aterosklerotik lezyon bölgelerinde makrofajlarda eksprese edilen genlerin yaklaşık dörtte birinin ekspresyonunu indükleyebildiği için ateroskleroz gelişiminde anahtar bir proinflamatuvar sitokindir. İmmün ve inflamatuvar yanıtları düzenleyen janus kinaz (JAK)-Sinyal Transdüserleri ve Transkripsiyon Aktivatörleri (STAT) yolu IFN- γ tarafından indüklenebilir (253).

Dokuda ölçtüğümüz IFN- γ ; SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre düşüş göstereceği istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunamamıştır ($p>0,003$). Fatahina ve arkadaşlarının yaşlı Balb/c farelerin dalak dokusunda gavaj yoluyla verilen propolis ekstraktının IFN- γ seviyelerini azalttığını bildirmişlerdir (213).

SPE, EPE ve GW'nin aortik kökte gelişen plak yüküne olası etkileri histolojik olarak semi-kantitatif (H&E ve ORO) incelendi. V grubuna göre SPE, EPE ve GW gruplarında aterosklerotik plak yükünün istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdiği belirlendi ($p<0,05$). Fang ve arkadaşları 160 mg/kg/gün oral gavaj yoluyla uyguladıkları etanollü propolis tedavisinin aterosklerotik plak yükünü azalttığını bildirmiştir (166). Literatürde sulu propolis ekstraktının ve GW280264X'in aterosklerotik plak yüküne doğrudan etkisinin histopatolojik olarak değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu açıdan bulgularımız literatür ile uyumlu olmasının yanı sıra literatüre orijinal bilgiler de kazandıracaktır. Ayrıca ORO boyamasıyla aortik kök dokusunda tunika intima bölgesinde lipid birikiminde SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Tedavi protokolünün aortik kök'te yansıttığı bu sonuçlar serum TK ve TG değerleri ile korele sonuçlar göstermesi hipotezimizin güçlenmesini sağlamıştır.

Aortik kökteki lipid birikimi sonuçları ana metabolik organ olan karaciğer sonuçlarıyla da desteklenmiştir. Karaciğer dokusunun histolojik olarak semi-kantitatif (H&E ve ORO) incelendi. SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre dejeneratif hepatosit sayısı, sentrotübüler tutulumda, perizonal tutulumda ve ödematöz alanlarda istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenmiştir ($p<0,05$). Nakamura ve arkadaşları etanollü propolis ekstraktının ratlarda karaciğer hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmişlerdir (254). Bu çalışmaya dek propolisin muhteviyatında bulunan flavanoidlerin ve çeşitli eser bileşenlerin farklı yollarla antiinflamatuvar ve antioksidan etkinliği gösterdiği belirtilmiştir (255).

Ancak inflamasyon ve dislipidemide önemli rol oynayan ADAM10/17 etkinliği değerlendirilmemiştir. Karaciğer dokusunda yağlanmanın azalması ve fonksiyon kaybının önlenmesi bu enzimlerin aktivitesinin azalmasına bağlı olabileceği öngörülmektedir. Bu hipotezimizi desteklemek için özellikle karaciğer lipid metabolizmasında önemli yeri olan sortilin ve ADAM10 seviyeleri immünohistokimyasal olarak başta karaciğer olmak üzere aortik kök ve kalp dokusunda incelendi.

Sortilin başta karaciğer olmak üzere çeşitli dokularda sentezlenen ve ADAM10 tarafından aktivitesi kontrol edilen transmembranöz bir proteindir. Sortilin, VLDL'nin ana apolipoproteinlerinden biri olan ApoB100 ile güçlü etkileşiminin bir sonucu olarak hepatik lipoprotein metabolizmasını etkiler. Fizyolojik koşullar altında, VLDL partiküllerinin üretimi, ApoB100'ün endoplazmik retikulumdan translokasyonu ve lipidasyonundan sonra öncü VLDL üretimi ile başlar. Öncü VLDL, Golgi'de lipidasyon ile trigliseritten zengin bir form olan olgun VLDL'ye dönüştürülür. Olgun VLDL'nin hepatositlerden plazmaya salınması, sortilin ApoB100'e bağlanıp bir kompleks oluşturduğunda gerçekleşir. Plazmaya çıkan VLDL, lipoprotein lipaz tarafından lipoliz edilerek LDL'ye dönüştürülür (256-258). Sortilin, hepatositlerde ApoB100 için yüksek afiniteli bir reseptör olduğundan, aşırı ekspresyonu, hepatositlerden VLDL salınımını artırarak plazma lipid düzeylerinin artmasına ve hepatositlerde ApoB100 birikiminin azalmasına neden olur. (259, 260). Bunun yanı sıra sortilin, trans golgi ağında PCSK9'a yüksek afinite ile bağlanarak, LDL'nin hepatosit içine alınmasını inhibe eder ve plazma LDL-C düzeylerinde artışa neden olur (261, 262). PCSK9'un ana işlevi, hepatik LDL alımından sorumlu LDLR'nin lizozomal bozulmasını düzenlemektir. Aktifleştirilmiş PCSK9, LDLR'nin lizozomal bozulmasını kolaylaştırır ve LDLR aracılı LDL alımını inhibe ederek plazma LDL-C düzeylerinin artmasına neden olur (263).

Çok sayıda çalışma sortilin'in VLDL sekresyonunu artırdığını iddia ederken, bazı araştırmacılar bunun tersini iddia ediyor. Li ve arkadaşları, yüksek kolesterol diyetiyle beslenen SORT1^{-/-} farelerde hepatik lipid birikiminin azaldığını bildirdi (264). Kjolby ve diğerleri, SORT1^{-/-} farelerin hepatositlerden daha az apoB100 salgıladığını, çünkü sortilin eksikliğinin oluşumu bozduğunu ve bunun da hepatoselüler VLDL taşınmasını ve sekresyonunu engellediğini ileri sürmektedir (256, 259, 261). Gustafsen ve arkadaşları sortilin'in aşırı ekspresyonunun, hepatositlerde PCSK9 seviyelerinde bir artışa ve LDLR seviyelerinde bir azalmaya neden olduğunu öne sürdü (261). Bu roller nedeniyle, sortilin

aterosklerotik gelişmeyi teşvik ettiğine dair pek çok kanıt sunulmuştur (265, 266). Bununla birlikte, bazı sonuçlar, sortilinin aşırı ekspresyonunun plazma lipid konsantrasyonunu düşürdüğünü iddia etmektedir (267).

İmmünohistokimyasal inceleme sonucunda karaciğerde ADAM10 ve sortilin seviyelerinin; SPE, EPE ve GW gruplarında V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$). Serum TK ve TG seviyeleriyle desteklenen bu sonuçlar literatürde sıkça tartışılan konuya katkı sağlayacağı öngörülmektedir.

Bu tez çalışmasının birçok yeni hipoteze referans olacağı düşünülmektedir. Ancak çalışmanın bazı kısıtlılıkları mevcuttur. Etanollü propolis ekstraktı hazırlanırken optimum doz olarak %70'lik etanol kullanılmaktadır. Ancak çalışmamızda kullandığımız farelerde yapılan ön denemelerde %70'lik etanol dozunun ölümcül olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle çalışmada kullanılan etanollü propolis ekstraktı %30'luk etanol ile hazırlanmıştır. Hazırlanan %30'luk etanollü ekstrakt ile %70'lik etanollü ekstraktın, eşit flavanoid ve polifenolik kapasiteye sahip olabilmesi için %30'luk ekstraktın çözünen madde miktarı *in vitro* olarak artırılmıştır. Bunun yanı sıra inflamasyonda ve dislipidemide önemli rol oynayan ADAM10/17 enzimlerinin aktivitelerinin yanı sıra ekspresyonlarının ölçülmesiyle birlikte daha geniş bir bilgi ağına ulaşılabilirdi. Ayrıca propolis muhteviyetinde bulunan ve yüksek *in silico* aktivite gösteren bir yada birkaç flavanoidin tek başına etkisi araştırabilirdi. Fakat çalışma kapsamında belirlenen grup sayısının yüksek olmasından dolayı bu seçenek değerlendirilmemiştir.

Çalışma bulgularına göre; canlı sistem için toksik olmayan su ile ekstrakte edilmiş propolis ekstraktları ateroskleroz sürecinde gelişen dislipidemi ve inflamasyon parametrelerini iyileştirici etkinlik gösterdiği, sentetik ADAM10/17 inhibitörü olan GW280264X'in antiaterojenik aktivite gösterdiği, propolisin hem sulu hem de etanollü ekstraktlarının aortta ADAM10/17 aktivitesini azalttığı ve buna bağlı olarak antiaterojenik aktivite göstermiş olabileceği, ayrıca hem propolis ekstraktlarının hem de GW280264X'in aortik kökte aterosklerotik plak yükünü azaltması yeni tedavi stratejilerinin olgunlaşmasına katkı sağlayacağı, bunun yanı sıra tüm tedavi müdahalelerinde karaciğerde sortilin ve ADAM10 seviyelerinin azalmasına bağlı olarak VLDL sekresyonun azaldığı ve serum total trigliserid ve total kolesterol sonuçlarıyla desteklendiği, sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. World Health Organization, (2021). WHO [online]. Available from: https://www.who.int/health-topics/cardiovascular-diseases/#tab=tab_1 [Accessed 04 April 2022]
2. Türkiye İstatistik Kurumu, (2016). TÜİK [online]. Available from: www.tuik.gov.tr. [Accessed 01 June 2021].
3. Ritchie SA, Connell JM (2007). The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17(4): 319-326. doi:10.1016/j.numecd.2006.07.005
4. Paudel KR, Panth N, Kim DW (2016). Circulating endothelial microparticles: a key hallmark of atherosclerosis progression. *Scientifica (Cairo)* 8514056. doi:10.1155/2016/8514056
5. Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C (2004). Atherosclerosis: immunopathogenesis and immunotherapy. *Med Sci Monit* 10(11): RA255-RA260.
6. Guerrini V, Gennaro ML (2019). Foam cells: one size doesn't fit all. *Trends Immunol* 40(12): 1163-1179. doi:10.1016/j.it.2019.10.002
7. Niu C, Wang X, Zhao M, Cai T, Liu P, Li J, Willard B, Zu L, Zhou E, Li Y, Pan B, Yang F, Zheng L (2016). Macrophage foam cell-derived extracellular vesicles promote vascular smooth muscle cell migration and adhesion. *J Am Heart Assoc* 5(10): e004099. doi:10.1161/JAHA.116.004099
8. Vasquez EC, Peotta VA, Gava AL, Pereira TM, Meyrelles SS (2012). Cardiac and vascular phenotypes in the apolipoprotein E-deficient mouse. *J Biomed Sci* 19(1): 22. doi: 10.1186/1423-0127-19-22
9. Abu-Saleh N, Aviram M, Hayek T (2016). Aqueous or lipid components of atherosclerotic lesion increase macrophage oxidation and lipid accumulation. *Life Sci* 154: 1-14. doi:10.1016/j.lfs.2016.04.019
10. Gisterå A, Hansson GK (2017). The immunology of atherosclerosis. *Nat Rev Nephrol* 13(6): 368-380. doi:10.1038/nrneph.2017.51
11. Kawai T, Elliott KJ, Scalia R, Eguchi S (2021). Contribution of ADAM17 and related ADAMs in cardiovascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 78(9): 4161-4187. doi:10.1007/s00018-021-03779-w
12. Mezentshev A, Nikolaev A, Bruskin S (2014). Matrix metalloproteinases and their role in psoriasis. *Gene* 540(1): 1-10. doi:10.1016/j.gene.2014.01.068

13. Blobel CP (2005). ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(1): 32-43. doi:10.1038/nrm1548
14. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008). The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29(5): 258-289. doi:10.1016/j.mam.2008.08.001
15. Pietta PG, Gardana C, Pietta AM (2002). Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73 Suppl 1: S7-S20. doi:10.1016/s0367-326x(02)00186-7
16. Refaat H, Mady FM, Sarhan HA, Rateb HS, Alaaeldin E (2021). Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. *Int J Pharm* 592: 120028. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.120028
17. Przybyłek I, Karpiński TM (2019). Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules* 24(11): 2047. doi:10.3390/molecules24112047
18. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 697390. doi:10.1155/2013/697390
19. Mujica V, Orrego R, Pérez J, Romero P, Ovalle P, Zúñiga-Hernández J, Arredondo M, Leiva E (2017). The role of propolis in oxidative stress and lipid metabolism: a randomized controlled trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017: 4272940. doi:10.1155/2017/4272940
20. Kubiliene L, Jekabsone A, Zilius M, Trumbeckaite S, Simanaviciute D, Gerbutaviciene R, Majiene D (2018). Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: antioxidant and mitochondria modulating properties. *BMC Complement Altern Med* 18(1):165. doi:10.1186/s12906-018-2234-5
21. Barlak Y, Değer O, Çolak M, Karataylı SC, Bozdayı AM, Yücesan F (2011). Effect of Turkish propolis extracts on proteome of prostate cancer cell line. *Proteome Sci* 9: 74. doi:10.1186/1477-5956-9-74
22. Al-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M (2018). Antimicrobial activities of european propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines (Basel)* 5(1): 2. doi:10.3390/medicines5010002
23. Saavedra N, Cuevas A, Cavalcante MF, Dörr FA, Saavedra K, Zambrano T, Abdalla DS, Salazar LA (2016). Polyphenols from chilean propolis and pinocembrin reduce mmp-9 gene expression and activity in activated macrophages. *Biomed Res Int* 2016: 6505383. doi:10.1155/2016/6505383

24. Benjamin EJ, Blaha MJ, Chiuve SE, Cushman M, Das SR, Deo R, de Ferranti SD, Floyd J, Fornage M, Gillespie C, Isasi CR, Jiménez MC, Jordan LC, Judd SE, Lackland D, Lichtman JH, Lisabeth L, Liu S, Longenecker CT, Mackey RH, Matsushita K, Mozaffarian D, Mussolino ME, Nasir K, Neumar RW, Palaniappan L, Pandey DK, Thiagarajan RR, Reeves MJ, Ritchey M, Rodriguez CJ, Roth GA, Rosamond WD, Sasson C, Towfighi A, Tsao CW, Turner MB, Virani SS, Voeks JH, Willey JZ, Wilkins JT, Wu JH, Alger HM, Wong SS, Muntner P (2017). Heart disease and stroke statistics-2017 update: a report from the american heart association. *Circulation* 135(10): e146-e603. doi:10.1161/CIR.0000000000000485
25. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: prevalence, treatment, and control of high levels of low-density lipoprotein cholesterol--United States, 1999-2002 and 2005-200 (2011). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 60(4): 109-114.
26. GBD 2015 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators (2016). Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* 388(10053): 1545-1602. doi:10.1016/S0140-6736(16)31678-6
27. Herrington W, Lacey B, Sherliker P, Armitage J, Lewington S (2016). Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease. *Circ Res* 118(4): 535-546. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307611
28. Goldstein JL, Brown MS (2015). A century of cholesterol and coronaries: from plaques to genes to statins. *Cell* 161(1): 161-172. doi:10.1016/j.cell.2015.01.036
29. Libby P (2005). The forgotten majority: unfinished business in cardiovascular risk reduction. *J Am Coll Cardiol* 46(7): 1225-1228. doi:10.1016/j.jacc.2005.07.006
30. Hochholzer W, Giugliano RP (2010). Lipid lowering goals: back to nature?. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 4(3): 185-191. doi:10.1177/1753944710368206
31. Giugliano RP, Wiviott SD, Blazing MA, De Ferrari GM, Park JG, Murphy SA, White JA, Tershakovec AM, Cannon CP, Braunwald E (2017). Long-term safety and efficacy of achieving very low levels of low-density lipoprotein cholesterol : a prespecified analysis of the improve-it trial. *JAMA Cardiol* 2(5): 547-555. doi:10.1001/jamacardio.2017.0083
32. Hopstock LA, Bønaa KH, Eggen AE, Grimsgaard S, Jacobsen BK, Løchen ML, Mathiesen EB, Njølstad I, Wilsgaard T (2017). Longitudinal and secular trends in total cholesterol levels and impact of lipid-lowering drug use among Norwegian women

- and men born in 1905-1977 in the population-based Tromsø Study 1979-2016. *BMJ Open* 7(8): e015001. doi:10.1136/bmjopen-2016-015001
33. Schreiner PJ, Jacobs DR Jr, Wong ND, Kiefe CI (2016). Twenty-five year secular trends in lipids and modifiable risk factors in a population-based biracial cohort: the coronary artery risk development in young adults (cardia) study, 1985-2011. *J Am Heart Assoc* 5(7): e003384. doi:10.1161/JAHA.116.003384
 34. Ference BA, Ginsberg HN, Graham I, Ray KK, Packard CJ, Bruckert E, Hegele RA, Krauss RM, Raal FJ, Schunkert H, Watts GF, Borén J, Fazio S, Horton JD, Masana L, Nicholls SJ, Nordestgaard BG, van de Sluis B, Taskinen MR, Tokgözoğlu L, Landmesser U, Laufs U, Wiklund O, Stock JK, Chapman MJ, Catapano AL (2017). Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel. *Eur Heart J* 38(32): 2459-2472. doi:10.1093/eurheartj/ehx144
 35. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Humphries SE, Ginsberg HN, Masana L, Descamps OS, Wiklund O, Hegele RA, Raal FJ, Defesche JC, Wiegman A, Santos RD, Watts GF, Parhofer KG, Hovingh GK, Kovanen PT, Boileau C, Aversa M, Borén J, Bruckert E, Catapano AL, Kuivenhoven JA, Pajukanta P, Ray K, Stalenhoef AF, Stroes E, Taskinen MR, Tybjærg-Hansen A (2020). Familial hypercholesterolaemia is underdiagnosed and undertreated in the general population: guidance for clinicians to prevent coronary heart disease: consensus statement of the European Atherosclerosis Society. *Eur Heart J* 34(45): 3478-90a. doi:10.1093/eurheartj/ehz273
 36. Cohen JC, Boerwinkle E, Mosley TH Jr, Hobbs HH (2006). Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med* 354(12): 1264-1272. doi:10.1056/NEJMoa054013
 37. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Fang L, Harkewicz R, Hartvigsen K, Boullier A, Gonen A, Diehl CJ, Que X, Montano E, Shaw PX, Tsimikas S, Binder CJ, Witztum JL (2011). Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity. *Circ Res* 108(2): 235-248. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223875
 38. Navab M, Ananthramiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM (2004). The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized

- phospholipids and HDL. *J Lipid Res* 45(6): 993-1007. doi:10.1194/jlr.R400001-JLR200
39. Libby P, Lichtman AH, Hansson GK (2013). Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans. *Immunity* 38(6): 1092-1104. doi:10.1016/j.immuni.2013.06.009
 40. Tardif JC, McMurray JJ, Klug E, Small R, Schumi J, Choi J, Cooper J, Scott R, Lewis EF, L'Allier PL, Pfeffer MA (2008). Effects of succinobucol (AGI-1067) after an acute coronary syndrome: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 371(9626): 1761-1768. doi:10.1016/S0140-6736(08)60763-1
 41. Ketelhuth DF, Hansson GK (2016). Adaptive Response of T and B Cells in Atherosclerosis. *Circ Res*. 118(4): 668-678. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306427
 42. Borén J, Williams KJ (2016). The central role of arterial retention of cholesterol-rich apolipoprotein-B-containing lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis: a triumph of simplicity. *Curr Opin Lipidol* 27(5): 473-483. doi:10.1097/MOL.0000000000000330
 43. Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgözoğlu L, Lewis EF (2019). Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 5(1): 56. Aug 16. doi:10.1038/s41572-019-0106-z
 44. Musunuru K, Kathiresan S (2016). Surprises from genetic analyses of lipid risk factors for atherosclerosis. *Circ Res* 118(4): 579-585. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306398
 45. Libby P (2015). Triglycerides on the rise: should we swap seats on the seesaw?. *Eur Heart J* 36(13): 774-776. doi:10.1093/eurheartj/ehu500
 46. Burgess S, Ference BA, Staley JR, Freitag DF, Mason AM, Nielsen SF, Willeit P, Young R, Surendran P, Karthikeyan S, Bolton TR, Peters JE, Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Benn M, Langsted A, Schnohr P, Vedel-Krogh S, Kobylecki CJ, Ford I, Packard C, Trompet S, Jukema JW, Sattar N, Di Angelantonio E, Saleheen D, Howson JMM, Nordestgaard BG, Butterworth AS, Danesh J (2018). Association of lpa variants with risk of coronary disease and the implications for lipoprotein(a)-lowering therapies: a mendelian randomization analysis. *JAMA Cardiol* 3(7): 619-627. doi:10.1001/jamacardio.2018.1470

47. Kranzhöfer R, Browatzki M, Schmidt J, Kübler W (1999). Angiotensin II activates the proinflammatory transcription factor nuclear factor-kappaB in human monocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 257(3): 826-828. doi:10.1006/bbrc.1999.0543
48. McMaster WG, Kirabo A, Madhur MS, Harrison DG (2015). Inflammation, immunity, and hypertensive end-organ damage. *Circ Res* 116(6): 1022-1033. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.303697
49. Rocha VZ, Libby P (2009). Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol* 6(6): 399-409. doi:10.1038/nrcardio.2009.55
50. Després JP (2012). Body fat distribution and risk of cardiovascular disease: an update. *Circulation* 126(10): 1301-1313. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.067264
51. Libby P, Nahrendorf M, Swirski FK (2016). Leukocytes link local and systemic inflammation in ischemic cardiovascular disease: an expanded "cardiovascular Continuum". *J Am Coll Cardiol* 67(9) : 1091-1103. doi:10.1016/j.jacc.2015.12.048
52. Libby P, Loscalzo J, Ridker PM, Farkouh ME, Hsue PY, Fuster V, Hasan AA, Amar S (2018). Inflammation, immunity, and infection in atherothrombosis: jacc review topic of the week. *J Am Coll Cardiol* 72(17): 2071-2081. doi:10.1016/j.jacc.2018.08.1043
53. Ridker PM (2015). A Test in Context: High-Sensitivity C-Reactive Protein. *J Am Coll Cardiol* 67(6): 712-723. doi:10.1016/j.jacc.2015.11.037
54. Nus M, Mallat Z (2016). Immune-mediated mechanisms of atherosclerosis and implications for the clinic. *Expert Rev Clin Immunol* 12(11): 1217-1237. doi:10.1080/1744666X.2016.1195686
55. Ignarro LJ, Napoli C (2005). Novel features of nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, and atherosclerosis. *Curr Diab Rep* 5(1): 17-23. doi:10.1007/s11892-005-0062-8
56. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr (1991). Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 251(4995): 788-791. doi:10.1126/science.1990440
57. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P (1993). An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13(2): 197-204. doi:10.1161/01.atv.13.2.197

58. SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, Feinberg MW, Chen Z, Simon DI, Luscinskas FW, Michel TM, Gimbrone MA Jr, García-Cardena G, Jain MK (2004). KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *J Exp Med* 199(10): 1305-1315. doi:10.1084/jem.20031132
59. Gimbrone MA Jr, García-Cardena G (2016). Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res* 118(4): 620-636. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306301
60. Bennett MR, Sinha S, Owens GK (2016). Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis. *Circ Res* 118(4): 692-702. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306361
61. Robbins CS, Hilgendorf I, Weber GF, Theurl I, Iwamoto Y, Figueiredo JL, Gorbатов R, Sukhova GK, Gerhardt LM, Smyth D, Zavitz CC, Shikatani EA, Parsons M, van Rooijen N, Lin HY, Husain M, Libby P, Nahrendorf M, Weissleder R, Swirski FK (2013). Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med* 19(9): 1166-1172. doi:10.1038/nm.3258
62. Wanschel A, Seibert T, Hewing B, Ramkhalawon B, Ray TD, van Gils JM, Rayner KJ, Feig JE, O'Brien ER, Fisher EA, Moore KJ (2013). Neuroimmune guidance cue Semaphorin 3E is expressed in atherosclerotic plaques and regulates macrophage retention. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33(5): 886-893. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300941
63. Swirski FK, Nahrendorf M, Libby P (2012). The ins and outs of inflammatory cells in atheromata. *Cell Metab* 15(2): 135-136. doi:10.1016/j.cmet.2012.01.012
64. Libby P, Hansson GK (2015). Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circ Res* 116(2): 307-311. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.301313
65. Gistera A. et al (2013). Transforming growth factor- β signaling in T cells promotes stabilization of atherosclerotic plaques through an interleukin-17- dependent pathway. *Sci Transl Med* 5: 196.
66. Gräbner R, Lötzer K, Döpping S, Hildner M, Radke D, Beer M, Spanbroek R, Lippert B, Reardon CA, Getz GS, Fu YX, Hehlhans T, Mebius RE, van der Wall M, Kruspe D, Englert C, Lovas A, Hu D, Randolph GJ, Weih F, Habenicht AJ (2009). Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. *J Exp Med* 206(1): 233-248. doi:10.1084/jem.20080752

67. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, McConkey M, Gupta N, Gabriel S, Ardissino D, Baber U, Mehran R, Fuster V, Danesh J, Frossard P, Saleheen D, Melander O, Sukhova GK, Neuberg D, Libby P, Kathiresan S, Ebert BL (2017). Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 377(2): 111-121. doi:10.1056/NEJMoa1701719
68. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, Wu CL, Sano S, Muralidharan S, Rius C, Vuong J, Jacob S, Muralidhar V, Robertson AA, Cooper MA, Andrés V, Hirschi KK, Martin KA, Walsh K (2017). Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science* 355(6327): 842-847. doi:10.1126/science.aag1381
69. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, Cherpokova D, McConkey M, Chappell RJ, Silver AJ, Adams D, Castellano CA, Schneider RK, Padera RF, DeAngelo DJ, Wadleigh M, Steensma DP, Galinsky I, Stone RM, Genovese G, McCarroll SA, Iliadou B, Hultman C, Neuberg D, Mullally A, Wagner DD, Ebert BL (2018). Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med* 10(436): ean8292. doi:10.1126/scitranslmed.aan8292
70. Libby P, Ebert BL (2018). CHIP (Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential): Potent and Newly Recognized Contributor to Cardiovascular Risk. *Circulation* 138(7): 666-668. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034392
71. Ruiz JL, Hutcheson JD, Aikawa E (2015). Cardiovascular calcification: current controversies and novel concepts. *Cardiovasc Pathol* 24(4): 207-212. doi:10.1016/j.carpath.2015.03.002
72. Ruiz JL, Weinbaum S, Aikawa E, Hutcheson JD (2016). Zooming in on the genesis of atherosclerotic plaque microcalcifications. *J Physiol* 594(11): 2915-2927. doi:10.1113/JP271339
73. Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT (2001). The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation* 103(8): 1051-1056. doi:10.1161/01.cir.103.8.1051
74. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P (1994). Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res* 75(1): 181-189. doi:10.1161/01.res.75.1.181

75. Alexander MR, Moehle CW, Johnson JL, Yang Z, Lee JK, Jackson CL, Owens GK (2012). Genetic inactivation of IL-1 signaling enhances atherosclerotic plaque instability and reduces outward vessel remodeling in advanced atherosclerosis in mice. *J Clin Invest* 122(1): 70-79. doi:10.1172/JCI43713
76. Libby P (2013). Mechanisms of acute coronary syndromes and their implications for therapy. *N Engl J Med* 368(21):2004-2013. doi:10.1056/NEJMr1216063
77. Bentzon JF, Otsuka F, Virmani R, Falk E (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circ Res* 114(12): 1852-1866. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.32721
78. Libby P, Pasterkamp G (2015). Requiem for the 'vulnerable plaque'. *Eur Heart J*. 36(43): 2984-2987. doi:10.1093/eurheartj/ehv349
79. Pasterkamp G, den Ruijter HM, Libby P (2017). Temporal shifts in clinical presentation and underlying mechanisms of atherosclerotic disease. *Nat Rev Cardiol* 14(1): 21-29. doi:10.1038/nrcardio.2016.166
80. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P (1991). Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 11(5): 1223-1230. doi:10.1161/01.atv.11.5.1223
81. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P (1994). Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94(6): 2493-2503. doi:10.1172/JCI117619
82. Martinod K, Wagner DD (2014). Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood* 123(18): 2768-2776. doi:10.1182/blood-2013-10-463646
83. Franck G, Mawson TL, Folco EJ, Molinaro R, Ruvkun V, Engelbertsen D, Liu X, Tesmenitsky Y, Shvartz E, Sukhova GK, Michel JB, Nicoletti A, Lichtman A, Wagner D, Croce KJ, Libby P (2018). Roles of PAD4 and NETosis in Experimental Atherosclerosis and Arterial Injury: Implications for Superficial Erosion. *Circ Res* 123(1): 33-42. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.312494
84. Folco EJ, Mawson TL, Vromman A, Bernardes-Souza B, Franck G, Persson O, Nakamura M, Newton G, Luscinskas FW, Libby P (2018). Neutrophil Extracellular Traps Induce Endothelial Cell Activation and Tissue Factor Production Through Interleukin-1 α and Cathepsin G. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 38(8): 1901-1912. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311150

85. Bevilacqua MP, Schleef RR, Gimbrone MA Jr, Loskutoff DJ (1986). Regulation of the fibrinolytic system of cultured human vascular endothelium by interleukin 1. *J Clin Invest* 78(2): 587-591. doi:10.1172/JCI112613
86. van Lammeren GW, den Ruijter HM, Vrijenhoek JE, van der Laan SW, Velema E, de Vries JP, de Kleijn DP, Vink A, de Borst GJ, Moll FL, Bots ML, Pasterkamp G (2014). Time-dependent changes in atherosclerotic plaque composition in patients undergoing carotid surgery. *Circulation* 129(22): 2269-76. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007603
87. Quillard T, Franck G, Mawson T, Folco E, Libby P (2017). Mechanisms of erosion of atherosclerotic plaques. *Curr Opin Lipidol* 28(5): 434-441. doi: 10.1097/MOL.0000000000000440
88. Quillard T, Araújo HA, Franck G, Shvartz E, Sukhova G, Libby P (2015). TLR2 and neutrophils potentiate endothelial stress, apoptosis and detachment: implications for superficial erosion. *Eur Heart J* 36(22): 1394-404. doi: 10.1093/eurheartj/ehv044
89. Franck G, Mawson T, Sausen G, Salinas M, Masson GS, Cole A, Beltrami-Moreira M, Chatzizisis Y, Quillard T, Tesmenitsky Y, Shvartz E, Sukhova GK, Swirski FK, Nahrendorf M, Aikawa E, Croce KJ, Libby P (2017). Flow Perturbation Mediates Neutrophil Recruitment and Potentiates Endothelial Injury via TLR2 in Mice: Implications for Superficial Erosion. *Circ Res* 121(1): 31-42. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310694
90. Gooz M (2010). ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45(2): 146-169. doi:10.3109/10409231003628015
91. Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385(6618): 733-736.
92. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618): 729-733.

93. Fingleton B (2007). Matrix Metalloproteinases as Valid Clinical Target. *Curr Pharm Des* 13(3): 333–46.
94. Duffy MJ, Mullooly M, O'Donovan N, Sukor S, Crown J, Pierce A, McGowan PM (2011). The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer?. *Clin Proteomics* 8(1) :9. Published Jun 9. doi:10.1186/1559-0275-8-9
95. Lichtenthaler SF, Lemberg MK, Fluhrer R (2018). Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals-hardware, concepts, and recent developments. *EMBO J* 37(15): e99456. doi:10.15252/emboj.201899456
96. Lambrecht BN, Vanderkerken M, Hammad H (2018). The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat Rev Immunol* 18(12): 745-758. doi:10.1038/s41577-018-0068-5
97. Takeda S (2009). Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(2):146–52.
98. Schlöndorff J, Becherer JD, Blobel CP (2000). Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J* 347: 131.
99. Black RA, White JM (1998). ADAMs: focus on the protease domain. *Curr Opin Cell Biol* 10(5): 654-659. doi:10.1016/s0955-0674(98)80042-2
100. Primakoff P, Myles DG (200). The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 16(2): 83-87. doi:10.1016/s0168-9525(99)01926-5
101. Tang BL, Hong W (1999). ADAMTS: a novel family of proteases with an ADAM protease domain and thrombospondin 1 repeats. *FEBS Lett* 445(2-3): 223-225. doi:10.1016/s0014-5793(99)00119-2
102. Bax DV, Messent AJ, Tart J, van Hoang M, Kott J, Maciewicz RA, Humphries MJ (2004). Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *J Biol Chem.* 279(21): 22377–86.
103. Adu-Amankwaah J, Adzika GK, Adekunle AO, Ndzie Noah ML, Mprah R, Bushi A, Akhter N, Huang F, Xu Y, Adzraku SY, Nadeem I, Sun H (2021). ADAM17, A Key Player of Cardiac Inflammation and Fibrosis in Heart Failure Development During Chronic Catecholamine Stress. *Front Cell Dev Biol* 9: 732952. doi:10.3389/fcell.2021.732952

104. Wiley HS, Woolf MF, Opresko LK, Burke PM, Will B, Morgan JR, Lauffenburger DA (1998). Removal of the membrane-anchoring domain of epidermal growth factor leads to intracrine signaling and disruption of mammary epithelial cell organization. *J Cell Biol* 143(5): 1317–1328.
105. Borrell-Pages M, Rojo F, Albanell J, Baselga J, Arribas J (2003). TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *EMBO J* 22(5): 1114–1124.
106. Scheller J, Chalaris A, Garbers C, Rose-John S (2011). ADAM17: A molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol* 32(8): 380–7.
107. Grötzinger J, Lorenzen I, Düsterhöft S (2017). Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1864(11): 2088–95. 97.
108. Siebel C, Lendahl U (2017). Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiol Rev* 97: 1235–94. doi: 10.1152/physrev.00005.2017.
109. Bray SJ (2006). Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 678–89. doi: 10.1038/nrm2009
110. Logeat F, Bessia C, Brou C, Lebail O, Jarriault S, Seidah NG, Israil A (1998). The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8108–12. doi: 10.1073/pnas.95.14.8108.
111. Kovall RA, Gebelein B, Sprinzak D, Kopan R (2017). The canonical Notch signaling pathway: structural and biochemical insights into shape, sugar, and force. *Dev Cell* 41: 228–41. doi: 10.1016/j.devcel.2017.04.001.
112. Ayaz F, Osborne BA (2014). Non-canonical Notch signaling in cancer and immunity. *Front Oncol* 4: 345. doi: 10.3389/fonc.2014.00345.
113. Viecegli Dalla Segna F, Fortini F, Aquila G, Campo G, Vaccarezza M, Rizzo P (2019). Notch Signaling Regulates Immune Responses in Atherosclerosis. *Front Immunol* 22;10: 1130. doi: 10.3389/fimmu.2019.01130.
114. Tabas I, Lichtman AH (2017). Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis. *Immunity* 47: 621–34. doi: 10.1016/j.immuni. 2017.09.008
115. Singla RD, Wang J, Singla DK (2014). Regulation of Notch 1 signaling in THP-1 cells enhances M2 macrophage differentiation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 307: H1634–42. doi: 10.1152/ajpheart.00896.2013

116. Singla DK, Wang J, Singla R (2017). Primary human monocytes differentiate into M2 macrophages and involve Notch-1 pathway. *Can J Physiol Pharmacol* 95: 288–94. doi: 10.1139/cjpp-2016-0319.
117. Mendelson K, Swendeman S, Saftig P, Blobel CP (2010). Stimulation of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRbeta) activates ADAM17 and promotes metalloproteinase-dependent cross-talk between the PDGFRbeta and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathways. *J Biol Chem* 285(32): 25024–25032.
118. Obama T, Takayanagi T, Kobayashi T, Bourne AM, Elliott KJ, Charbonneau M, Dubois CM, Eguchi S (2015). Vascular induction of a disintegrin and metalloprotease 17 by angiotensin II through hypoxia inducible factor 1 alpha. *Am J Hypertens* 28(1): 10–14.
119. Wang K, Gheblawi M, Oudit GY (2020). Angiotensin converting enzyme 2: a double-edged sword. *Circ* 142: 426–8.
120. Canault M, Peiretti F, Kopp F, Bonardo B, Bonzi MF, Coudeyre JC, Alessi MC, Juhan-Vague I, Nalbone G (2006). The TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) is expressed in the atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice: possible contribution to elevated plasma levels of soluble TNF alpha receptors. *Atherosclerosis* 187(1): 82–91.
121. Canault M, Leroyer AS, Peiretti F, Lesèche G, Tedgui A, Bonardo B, Alessi MC, Boulanger CM, Nalbone G (2007). Microparticles of human atherosclerotic plaques enhance the shedding of the tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 substrates, tumor necrosis factor and tumor necrosis factor receptor-1. *Am J Pathol* 171(5): 1713–1723.
122. Oksala N, Levula M, Airla N, Peltö-Huikko M, Ortiz RM, Järvinen O, Salenius JP, Ozsait B, Komurcu-Bayrak E, Erginel-Unaltuna N, Huovila AP, Kytömäki L, Soini JT, Kähönen M, Karhunen PJ, Laaksonen R, Lehtimäki T (2009). ADAM-9, ADAM-15, and ADAM-17 are upregulated in macrophages in advanced human atherosclerotic plaques in aorta and carotid and femoral arteries–Tampere vascular study. *Ann Med* 41(4): 279–290.
123. W Greenaway, T Scaysbrook, F R Whatley (1990). The Composition and Plant Origins of Propolis: A Report of Work at Oxford. *Bee World* 71: 3,107-118. doi: 10.1080/0005772X.1990.11099047

124. Silva-Carvalho R, Baltazar F, Almeida-Aguiar C (2015). Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015: 206439. doi:10.1155/2015/206439
125. Brown R (2015). Hive Products: Pollen, Propolis and Royal Jelly. *Bee World* 70: 109-117.
126. AKBULUT ÇAKIROĞLU K (2021). Türkiye'nin Farklı Bölgelerinden Elde Edilen Propolisin Sulu Ekstraktının HPLC İle Karakterizasyonu ve Antioksidan Potansiyelinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon
127. Ghisalberti EL (1979). Propolis: A Review. *Bee World* 60: 59–84.
128. Sung SH, Choi GH, Lee NW, Shin BC (2017). External Use of Propolis for Oral, Skin, and Genital Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017: 8025752. doi:10.1155/2017/8025752
129. Anjum SI, Ullah A, Khan KA, Attaullah M, Khan H, Ali H, Bashir MA, Tahir M, Ansari MJ, Ghramh HA, Adgaba N, Dash CK (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi J Biol Sci* 26(7): 1695-1703. doi:10.1016/j.sjbs.2018.08.013
130. Helfenberg KD (1908). The analysis of beeswax and propolis. *Chem Zeitungm* 31: 987–998.
131. Kocot J, Kielczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I (2018). Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application. *Oxid Med Cell Longev* 2;2018: 7074209. doi: 10.1155/2018/7074209. PMID: 29854089; PMCID: PMC5954854
132. Dobrowolski JW, Vohora SB, Sharma K, Shah SA, Naqvi SA, Dandiya PC (1991). Antibacterial, antifungal, antiamoebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 35(1): 77-82. doi:10.1016/0378-8741(91)90135-z
133. Nigar Bozkus T, Deger O, Yasar A (2021). Chemical characterization of water and ethanolic extracts of Turkish propolis by HPLC-DAD and GC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 44: 1-2, 77-86. doi: 10.1080/10826076.2021.1883648

134. Ahmed R, Tanvir EM, Hossen MS, Afroz R, Ahmmed I, Rumpa NE, Paul S, Gan SH, Sulaiman SA, Khalil MI (2017). Antioxidant Properties and Cardioprotective Mechanism of Malaysian Propolis in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* 2017: 5370545. doi:10.1155/2017/5370545
135. Hegazi AG, Abd El Hady FK, Abd Allah FA (2000). Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch C J Biosci* 55(1-2): 70-75. doi:10.1515/znc-2000-1-214
136. Kim JD, Liu L, Guo W, Meydani M (2006). Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *J Nutr Biochem* 17(3): 165-176. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.06.006
137. Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Jasik K, Buszman E. Anti-Atherogenic Activity of Polyphenol-Rich Extract from Bee Pollen. *Nutrients*. 2017;9(12):1369. Published 2017 Dec 18. doi:10.3390/nu9121369
138. Xuan H, Li Z, Wang J, Wang K, Fu C, Yuan J, Hu F (2014). Propolis Reduces Phosphatidylcholine-Specific Phospholipase C Activity and Increases Annexin a7 Level in Oxidized-LDL-Stimulated Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014: 465383. doi:10.1155/2014/465383
139. National Library of Medicine (2023). PubChem [online]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Accessed 04 April 2023]
140. RCSB Protein Databank (2022). PDB [online]. Available from: <https://www.rcsb.org/> [Accessed: 05 June 2022]
141. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK,Goodsell DS, Olson AJ (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30(16): 2785-2791. doi:10.1002/jcc.21256
142. Meir KS, Leitersdorf E. Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Jun;24(6):1006-14. doi: 10.1161/01.ATV.000018228849.12617.f4
143. Getz GS, Reardon CA (2016). Do the Apoe^{-/-} and Ldlr^{-/-} Mice Yield the Same Insight on Atherogenesis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36(9): 1734-41. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.306874
144. VanSaun MN, Lee IK, Washington MK, Matrisian L, Gorden DL (2009). High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal

- metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. *Am J Pathol* 175(1): 355-64. doi: 10.2353/ajpath.2009.080703
145. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, Kumar DP, Daita K, Min HK, Mirshahi F, Bedossa P, Sun X, Hoshida Y, Koduru SV, Contaifer D Jr, Warncke UO, Wijesinghe DS, Sanyal AJ (2016). A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *J Hepatol* 65(3): 579-88. doi: 10.1016/j.jhep.2016.05.005
 146. Lee ES, Kwon MH, Kim HM, Woo HB, Ahn CM, Chung CH (2020). Curcumin analog CUR5-8 ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice with high-fat diet-induced obesity. *Metabolism* 103:154015. doi: 10.1016/j.metabol.2019.154015
 147. Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM (2000). Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5): 1262-75. doi: 10.1161/01.atv.20.5.1262
 148. Jebari-Benslaiman S, Galicia-García U, Larrea-Sebal A, Olaetxea JR, Alloza I, Vandenbroeck K, Benito-Vicente A, Martín C (2022). Pathophysiology of Atherosclerosis. *Int J Mol Sci* 20;23(6): 3346. doi: 10.3390/ijms23063346
 149. Sahraoui A, Dewachter C, de Medina G, Naeije R, Aouichat Bouguerra S, Dewachter L (2016). Myocardial Structural and Biological Anomalies Induced by High Fat Diet in Psammomys obesus Gerbils. *PLoS One* 3;11(2): e0148117. doi: 10.1371/journal.pone.0148117
 150. Ye J, Li L, Wang M, Ma Q, Tian Y, Zhang Q, Liu J, Li B, Zhang B, Liu H, Sun G (2022). Diabetes Mellitus Promotes the Development of Atherosclerosis: The Role of NLRP3. *Front Immunol* 29;13: 900254. doi: 10.3389/fimmu.2022.900254.
 151. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW (1994). A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 89(5): 2462-78. doi: 10.1161/01.cir.89.5.2462.
 152. Wissler RW, Strong JP (1998). Risk factors and progression of atherosclerosis in youth. PDAY Research Group. Pathological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Am J Pathol* 153(4): 1023-1033. doi:10.1016/s0002-9440(10)65647-7

153. McNamara JJ, Molot MA, Stremple JF, Cutting RT (1971). Coronary artery disease in combat casualties in Vietnam. *JAMA* 216(7): 1185-1187.
154. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 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. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355-74. doi: 10.1161/01.cir.92.5.1355.
155. Ross R (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 362(6423): 801-809. doi:10.1038/362801a0
156. Lusis AJ (2000). Atherosclerosis. *Nature* 407(6801): 233-241. doi:10.1038/35025203
157. Tabas I, García-Cardena G, Owens GK (2015). Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol* 209(1): 13-22. doi:10.1083/jcb.201412052chistiak
158. Chistiakov DA, Melnichenko AA, Grechko AV, Myasoedova VA, Orekhov AN (2018). Potential of anti-inflammatory agents for treatment of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 104(2): 114-124. doi:10.1016/j.yexmp.2018.01.008
159. anjit N, Diez-Roux AV, Shea S, Cushman M, Seeman T, Jackson SA, Ni H (2007). Psychosocial factors and inflammation in the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Arch Intern Med* 167(2): 174-181. doi:10.1001/archinte.167.2.174
160. Liu Y, Yu H, Zhang Y, Zhao Y (2008). TLRs are important inflammatory factors in atherosclerosis and may be a therapeutic target. *Med Hypotheses* 70(2): 314-316. doi:10.1016/j.mehy.2007.05.030
161. Libby P (2001). Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104(3): 365-372. doi:10.1161/01.cir.104.3.365
162. Li J, Wang Y, Matye DJ, et al (2017). Sortilin 1 Modulates Hepatic Cholesterol Lipotoxicity in Mice via Functional Interaction with Liver Carboxylesterase 1. *J Biol Chem*. 292(1): 146-160. doi:10.1074/jbc.M116.762005li
163. Liu, J., Zhou, C. W., Wei, Q. L., Zhuang, J. L., Lin, Z. H., Zheng, J. H. 2012. “Yi chuan = Hereditas”, 34(12), 1570–1576.
164. Killar L, White J, Black R, Peschon J (1999). Adamalysins. A family of metzincins including TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Ann N Y Acad Sci* 878: 442-452. doi:10.1111/j.1749-6632.1999.tb07701.x
165. Mustafi R, Dougherty U, Mustafi D, Ayaloglu-Butun F, Fletcher M, Adhikari S, Sadiq F, Meckel K, Haider HI, Khalil A, Pekow J, Konda V, Joseph L, Hart J, Fichera A, Li

- YC, Bissonnette M (2017). ADAM17 is a Tumor Promoter and Therapeutic Target in Western Diet-associated Colon Cancer. *Clin Cancer Res* 15;23(2): 549-561. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-3140.
166. Fang Y, Sang H, Yuan N, Sun H, Yao S, Wang J, Qin S (2013). Ethanol extract of propolis inhibits atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Lipids Health Dis* 12: 123. doi:10.1186/1476-511X-12-123
 167. Seegar TCM, Killingsworth LB, Saha N, Meyer PA, Patra D, Zimmerman B, Janes PW, Rubinstein E, Nikolov DB, Skiniotis G, Kruse AC, Blacklow SC (2017). Structural Basis for Regulated Proteolysis by the α -Secretase ADAM10. *Cell* 171(7): 1638-1648.e7. doi:10.1016/j.cell.2017.11.014.
 168. Düsterhöft S, Jung S, Hung CW, Tholey A, Sönnichsen FD, Grötzinger J, Lorenzen I (2013). Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J Am Chem Soc* 135(15):5776-81. doi: 10.1021/ja400340u.
 169. Faggiotto A, Ross R, Harker L (1984). Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis* 4(4):323-340. doi:10.1161/01.atv.4.4.323
 170. Faggiotto A, Ross R (1984). Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis* 4(4): 341-356. doi:10.1161/01.atv.4.4.341
 171. Rosenfeld ME, Tsukada T, Chait A, Bierman EL, Gown AM, Ross R (1987). Fatty streak expansion and maturation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 7(1): 24-34. doi:10.1161/01.atv.7.1.24
 172. Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R (1987). Fatty streak initiation in Watanabe Heritable Hyperlipemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 7(1): 9-23. doi:10.1161/01.atv.7.1.9
 173. Bocan TM (1998). Animal models of atherosclerosis and interpretation of drug intervention studies. *Curr Pharm Des* 4(1): 37-52.
 174. Paigen B, Mitchell D, Reue K, Morrow A, Lusis AJ, LeBoeuf RC (1987). Ath-1, a gene determining atherosclerosis susceptibility and high density lipoprotein levels in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(11):3763-3767. doi:10.1073/pnas.84.11.3763

175. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258(5081): 468-471. doi:10.1126/science.1411543
176. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, Rubin EM, Breslow JL (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71(2):343-353. doi:10.1016/0092-8674(92)90362-g
177. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J (1993). Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knockout mice and its reversal by adenovirus-mediated gene delivery. *J Clin Invest* 92(2): 883-893. doi:10.1172/JCI116663
178. Lichtman AH, Clinton SK, Iiyama K, Connelly PW, Libby P, Cybulsky MI (1999). Hyperlipidemia and atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice fed defined semipurified diets with and without cholate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(8): 1938-1944. doi:10.1161/01.atv.19.8.1938
179. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK (2000). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 106(4): 523-531. doi:10.1172/JCI10370
180. Whitman SC, Ravisankar P, Daugherty A (2002). IFN-gamma deficiency exerts gender-specific effects on atherogenesis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *J Interferon Cytokine Res* 22(6): 661-670. doi:10.1089/10799900260100141
181. Paigen B, Holmes PA, Mitchell D, Albee D (1987). Comparison of atherosclerotic lesions and HDL-lipid levels in male, female, and testosterone-treated female mice from strains C57BL/6, BALB/c, and C3H. *Atherosclerosis* 64(2-3): 215-221. doi:10.1016/0021-9150(87)90249-8
182. Tangirala RK, Rubin EM, Palinski W (1995). Quantitation of atherosclerosis in murine models: correlation between lesions in the aortic origin and in the entire aorta, and differences in the extent of lesions between sexes in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 36(11): 2320-2328.
183. Marsh MM, Walker VR, Curtiss LK, Banka CL (1999). Protection against atherosclerosis by estrogen is independent of plasma cholesterol levels in LDL receptor-deficient mice. *J Lipid Res* 40(5): 893-900.

184. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R (1994). ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 14(1): 133-140. doi:10.1161/01.atv.14.1.133
185. Furbee JW Jr, Sawyer JK, Parks JS (2002). Lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency increases atherosclerosis in the low density lipoprotein receptor and apolipoprotein E knockout mice. *J Biol Chem* 277(5): 3511-3519. doi:10.1074/jbc.M109883200
186. Ichi I, Hori H, Takashima Y, Adachi N, Kataoka R, Okihara K, Hashimoto K, Kojo S (2009). The beneficial effect of propolis on fat accumulation and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J Food Sci* 74(5): H127-31. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01147.x.
187. Koya-Miyata S, Arai N, Mizote A, Taniguchi Y, Ushio S, Iwaki K, Fukuda S (2009). Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. *Biol Pharm Bull* 32(12):2022-8. doi: 10.1248/bpb.32.2022.
188. Wang Z, Ge S, Li S, Lin H, Lin S (2020). Anti-obesity effect of trans-cinnamic acid on HepG2 cells and HFD-fed mice. *Food Chem Toxicol* 137: 111148. doi: 10.1016/j.fct.2020.111148
189. Menghini R, Fiorentino L, Casagrande V, Lauro R, Federici M (2013). The role of ADAM17 in metabolic inflammation. *Atherosclerosis* 228(1): 12-17. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.024
190. Sommer D, Corstjens I, Sanchez S, Dooley D, Lemmens S, Van Broeckhoven J, Bogie J, Vanmierlo T, Vidal PM, Rose-John S, Gou-Fabregas M, Hendrix S (2019). ADAM17-deficiency on microglia but not on macrophages promotes phagocytosis and functional recovery after spinal cord injury. *Brain Behav Immun* 80: 129-145. doi: 10.1016/j.bbi.2019.02.032.
191. Urriola-Muñoz P, Lagos-Cabré R, Moreno RD (2014). A mechanism of male germ cell apoptosis induced by bisphenol-A and nonylphenol involving ADAM17 and p38 MAPK activation. *PLoS One* 9(12): e113793. doi:10.1371/journal.pone.0113793
192. Kitamura H, Saito N, Fujimoto J, Nakashima KI, Fujikura D (2018). Brazilian propolis ethanol extract and its component kaempferol induce myeloid-derived suppressor cells from macrophages of mice in vivo and in vitro. *BMC Complement Altern Med* 18(1):138. Published 2018 May 2. doi:10.1186/s12906-018-2198-5

193. Li J, Wang Q, Chai W, Chen MH, Liu Z, Shi W (2011). Hyperglycemia in apolipoprotein E-deficient mouse strains with different atherosclerosis susceptibility. *Cardiovasc Diabetol* 10: 117. doi:10.1186/1475-2840-10-117
194. Guan R, Ma N, Liu G, Wu Q, Su S, Wang J, Geng Y (2023). Ethanol extract of propolis regulates type 2 diabetes in mice via metabolism and gut microbiota. *J Ethnopharmacol* 310: 116385. doi:10.1016/j.jep.2023.116385
195. Al Ghamdi AA, Badr G, Hozzein WN, Allam A, Al-Waili NS, Al-Wadaan MA, Garraud O (2015). Oral supplementation of diabetic mice with propolis restores the proliferation capacity and chemotaxis of B and T lymphocytes towards CCL21 and CXCL12 by modulating the lipid profile, the pro-inflammatory cytokine levels and oxidative stress. *BMC Immunol* 16: 54. doi:10.1186/s12865-015-0117-9
196. Berenguer M, Zhang J, Bruce MC, Martinez L, Gonzalez T, Gurtovenko AA, Xu T, Le Marchand-Brustel Y, Govers R (2011). Dimethyl sulfoxide enhances GLUT4 translocation through a reduction in GLUT4 endocytosis in insulin-stimulated 3T3-L1 adipocytes. *Biochimie* 93(4): 697-709. doi:10.1016/j.biochi.2010.12.013
197. Gelling RW, Yan W, Al-Noori S, Pardini A, Morton GJ, Ogimoto K, Schwartz MW, Dempsey PJ (2008). Deficiency of TNF alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) causes a lean, hypermetabolic phenotype in mice. *Endocrinology* 149(12): 6053-64. doi: 10.1210/en.2008-0775.
198. Pendse AA, Arbones-Mainar JM, Johnson LA, Altenburg MK, Maeda N (2009). Apolipoprotein E knock-out and knock-in mice: atherosclerosis, metabolic syndrome, and beyond. *J Lipid Res.* 2009;50 Suppl(Suppl):S178-S182. doi:10.1194/jlr.R800070-JLR200
199. Oršolić N, Landeka Jurčević I, Đikić D, Rogić D, Odeh D, Balta V, Perak Junaković E, Terzić S, Jutrić D (2019). Effect of Propolis on Diet-Induced Hyperlipidemia and Atherogenic Indices in Mice. *Antioxidants (Basel)* 8(6): 156. doi:10.3390/antiox8060156
200. Kitamura H, Naoe Y, Kimura S, Miyamoto T, Okamoto S, Toda C, Shimamoto Y, Iwanaga T, Miyoshi I (2013). Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in ob/ob mice: Possible involvement of immune cells in mesenteric adipose tissue. *Adipocyte* 2(4): 227-236. doi:10.4161/adip.25608
201. Chang B, Xu MJ, Zhou Z, Cai Y, Li M, Wang W, Feng D, Bertola A, Wang H, Kunos G, Gao B (2015). Short- or long-term high-fat diet feeding plus acute ethanol binge

- synergistically induce acute liver injury in mice: an important role for CXCL1. *Hepatology* 62(4): 1070-1085. doi:10.1002/hep.27921
202. Kampschulte M, Stöckl C, Langheinrich AC, Althöhn U, Bohle RM, Krombach GA, Stieger P, Churin Y, Kremer S, Dierkes C, Rath T, Roeb E, Roderfeld M (2014). Western diet in ApoE-LDLR double-deficient mouse model of atherosclerosis leads to hepatic steatosis, fibrosis, and tumorigenesis. *Lab Invest* 94(11): 1273-1282. doi:10.1038/labinvest.2014.112
 203. Weber C, Noels H (2011). Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 17(11):1410-1422. doi:10.1038/nm.2538
 204. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med.* 2014 Aug;5(8):927-46.
 205. Pradhan AD, Aday AW, Rose LM, Ridker PM (2018). Residual Inflammatory Risk on Treatment With PCSK9 Inhibition and Statin Therapy. *Circulation* 138(2): 141-149. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034645
 206. Bohula EA, Giugliano RP, Leiter LA, Verma S, Park JG, Sever PS, Lira Pineda A, Honarpour N, Wang H, Murphy SA, Keech A, Pedersen TR, Sabatine MS (2018). Inflammatory and Cholesterol Risk in the FOURIER Trial. *Circulation* 138(2): 131-140. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.034032
 207. Libby P (2012). Inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32:2045–51. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.179705
 208. Taleb S (2016). Inflammation in atherosclerosis. *Arch Cardiovasc Dis* 109: 708–15. doi: 10.1016/j.acvd.2016.04.002
 209. Tuñón J, Bäck M, Badimón L, et al (2018). Interplay between hypercholesterolaemia and inflammation in atherosclerosis: Translating experimental targets into clinical practice. *Eur J Prev Cardiol* 25(9): 948-955. doi:10.1177/2047487318773384
 210. McInnes IB, Schett G (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 7(6): 429-442. doi:10.1038/nri2094
 211. Feldmann M, Brennan FM, Maini RN (1996). Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 14:397-440. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.397
 212. Zhang H, Park Y, Wu J, et al (2009). Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. *Clin Sci (Lond)* 116(3): 219-230. doi:10.1042/CS20080196

213. Fatahinia M, Khosravi AR, Shokri H (2012). Propolis efficacy on TNF- α , IFN- γ and IL2 cytokines production in old mice with and without systemic candidiasis. *J Mycol Med*. 22(3): 237-242. doi:10.1016/j.mycmed.2012.05.004
214. Jalali M, Ranjbar T, Mosallanezhad Z, Mahmoodi M, Moosavian SP, Ferns GA, Jalali R, Sohrabi Z (2020). Effect of Propolis Intake on Serum C-Reactive Protein (CRP) and Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF- α) Levels in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Complement Ther Med* 50: 102380. doi:10.1016/j.ctim.2020.102380
215. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, Fonseca F, Nicolau J, Koenig W, Anker SD, Kastelein JJP, Cornel JH, Pais P, Pella D, Genest J, Cifkova R, Lorenzatti A, Forster T, Kobalava Z, Vida-Simiti L, Flather M, Shimokawa H, Ogawa H, Dellborg M, Rossi PRF, Troquay RPT, Libby P, Glynn RJ (2017). Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 377(12): 1119-1131. doi:10.1056/NEJMoa1707914
216. Weber A, Wasiliew P, Kracht M (2010). Interleukin-1beta (IL-1beta) processing pathway. *Sci Signal* 3(105): 2. Published 2010 Jan 19. doi:10.1126/scisignal.3105cm2
217. Libby P, Warner SJ, Friedman GB (1988). Interleukin 1: a mitogen for human vascular smooth muscle cells that induces the release of growth-inhibitory prostanoids. *J Clin Invest* 81: 487–98. doi: 10.1172/JCI113346
218. Dinarello CA (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol* 27: 519–50. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132612
219. Loppnow H, Libby P (1990). Proliferating or interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J Clin Invest* 85: 731–8. doi: 10.1172/JCI114498
220. Beltrami-Moreira M, Vromman A, Sukhova GK, Folco EJ, Libby P (2016). Redundancy of IL-1 Isoform Signaling and Its Implications for Arterial Remodeling. *PloS One* 11: e152474. doi: 10.1371/journal.pone.0152474
221. Reddy P, Slack JL, Davis R, Cerretti DP, Kozlosky CJ, Blanton RA, Shows D, Peschon JJ, Black RA (2000). Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem* 275(19): 14608-14614. doi:10.1074/jbc.275.19.14608
222. Martin P, Palmer G, Vigne S, Lamacchia C, Rodriguez E, Talabot-Ayer D, Rose-John S, Chalaris A, Gabay C (2013). Mouse neutrophils express the decoy type 2 interleukin-

- 1 receptor (IL-1R2) constitutively and in acute inflammatory conditions. *J Leukoc Biol* 94(4): 791-802. doi:10.1189/jlb.0113035
223. Lorenzen I, Lokau J, Düsterhöft S, Trad A, Garbers C, Scheller J, Rose-John S, Grötzinger J (2012). The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett* 586(8): 1093-1100. doi:10.1016/j.febslet.2012.03.012
 224. Uchikawa S, Yoda M, Tohmonda T, Kanaji A, Matsumoto M, Toyama Y, Horiuchi K (2015). ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface. *Cytokine* 71(2): 238-245. doi:10.1016/j.cyto.2014.10.032
 225. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Heiss G, Sharrett AR (2004). Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident coronary heart disease in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Circulation* 109: 837–42.
 226. Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Bang H, Coresh J, Folsom AR, Chambless LE, Myerson M, Wu KK, Sharrett AR, Boerwinkle E (2005). Lipoprotein-associated phospholipase A2, high-sensitivity C-reactive protein, and risk for incident ischemic stroke in middle-aged men and women in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Arch Intern Med* 165: 2479–84.
 227. Kolodgie FD, Burke AP, Skorija KS, Ladich E, Kutys R, Makuria AT, Virmani R (2006). Lipoprotein-associated phospholipase A2 protein expression in the natural progression of human coronary atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2523–9.
 228. Lavi S, McConnell JP, Rihal CS, Prasad A, Mathew V, Lerman LO, Lerman A (2007). Local production of lipoprotein-associated phospholipase A2 and lysophosphatidylcholine in the coronary circulation: association with early coronary atherosclerosis and endothelial dysfunction in humans. *Circulation* 115(21): 2715-21. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.671420.
 229. Mannheim D, Herrmann J, Versari D, Gössl M, Meyer FB, McConnell JP, Lerman LO, Lerman A (2008). Enhanced expression of Lp-PLA2 and lysophosphatidylcholine in symptomatic carotid atherosclerotic plaque. *Stroke* 39: 1445–55.

230. Vickers KC, Maguire CT, Wolfert R, Burns AR, Reardon M, Geis R, Holvoet P, Morrisett JD (2009). Relationship of lipoprotein-associated phospholipase A2 and oxidized low density lipoprotein in carotid atherosclerosis. *J Lipid Res* 50: 1735–43.
231. MacPhee CH, Moores KE, Boyd HF, Dhanak D, Ife RJ, Leach CA, Leake DS, Milliner KJ, Patterson RA, Suckling KE, Tew DG, Hickey DM (1999). Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *Biochem J* 338: 479–87.
232. Safaya R, Chai H, Kougiass P, Lin P, Lumsden A, Yao Q, Chen C (2005). Effect of lysophosphatidylcholine on vasomotor functions of porcine coronary arteries. *J Surg Res* 126: 182–8.
233. Zalewski A, Macphee C (2005). Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis: biology, epidemiology, and possible therapeutic target. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 923–31.
234. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A (1997). Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6(3): 315–25. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80334-9
235. Sabir A, Sumidarti A (2017). Interleukin-6 expression on inflamed rat dental pulp tissue after capped with *Trigona* sp. propolis from south Sulawesi, Indonesia. *Saudi J Biol Sci* 24(5): 1034–1037. doi:10.1016/j.sjbs.2016.12.019
236. Asgharpour F, Moghadamnia AA, Motalebnejad M, Nouri HR (2019). Propolis attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through intracellular ROS and NO levels along with downregulation of IL-1 β and IL-6 expressions in murine RAW 264.7 macrophages. *J Food Biochem* 43(8): e12926. doi:10.1111/jfbc.12926
237. Pang AS, Katz A, Minta JO (1979). C3 deposition in cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits: a possible etiologic role for complement in atherosclerosis. *J Immunol* 123: 1117–1123.
238. Hasson GK, Holm J, Kral JG (1984). Accumulation of IgG and complement factor C3 in human arterial endothelium and atherosclerotic lesions. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 92A: 429–435.

239. Virella G, Virella I, Leman RB, Pryor MB, Lopes-Virella MF (1993). Antioxidized low-density lipoprotein antibodies in patients with coronary heart disease and normal healthy volunteers. *Int J Clin Lab Res* 23: 95–101.
240. Ylä-Herttuala S, Palinski W, Butler SW, Picard S, Steinberg D, Witztum JL (1994). Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. *Arterioscler Thromb* 14: 32– 40.
241. Palinski W, Ord VA, Plump AS, Breslow JL, Steinberg D, Witztum JL (1994). ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis: Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum. *Arterioscler Thromb* 14: 605– 616.
242. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Gabbiani G, Hansson GK (1985). Expression of class II transplantation antigen on vascular smooth muscle cells in human atherosclerosis. *J Clin Invest* 76: 125–131.
243. Roselaar SE, Schonfeld G, Daugherty A (1995). Enhanced development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits by suppression of cell-mediated immunity. *J Clin Invest* 96: 1389 –1394.
244. Emeson EE, Shen ML (1993). Accelerated atherosclerosis in hyperlipidemic C57BL/6 mice treated with cyclosporin A. *Am J Pathol* 142: 1906–1915.
245. Zamocky M, Jakopitsch C, Furtmüller PG, Dunand C, Obinger C (2008). The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: Reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins* 72: 589-605.
246. Arnhold J (2020). The dual role of myeloperoxidase in immune response. *Int J Mol Sci* 21: 8057.
247. Aratani Y (2018). Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys* 640: 47-52.
248. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW (1994). Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 94: 437-444
249. Malle E, Waeg G, Schreiber R, Gröne EF, Sattler W, Gröne HJ (2000). Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerotic lesions: Colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *Eur J Biochem* 267: 4495-4503.

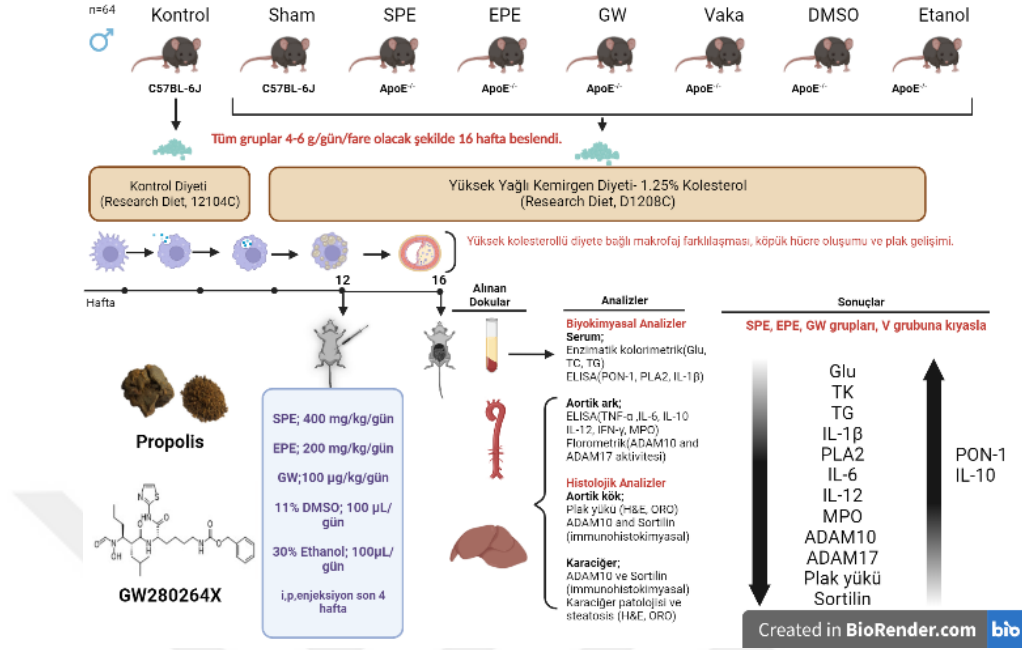
250. Teng N, Maghzal GJ, Talib J, Rashid I, Lau AK, Stocker R (2017). The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep* 22: 51-73.
251. Daher J (2020) Other forms of oxidized LDL: Emerging functions (Review). *World Acad Sci J* 2: 4.
252. Li JX, Tian R, Lu N (2023). Quercetin Attenuates Vascular Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Mice by Inhibiting Myeloperoxidase and NADPH Oxidase Function. *Chem Res Toxicol* 36(2): 260-269. doi:10.1021/acs.chemrestox.2c00334
253. Voloshyna I, Littlefield MJ, Reiss AB (2014). Atherosclerosis and interferon- γ : new insights and therapeutic targets. *Trends Cardiovasc Med* 24(1): 45-51. doi:10.1016/j.tcm.2013.06.003
254. Nakamura T, Ohta Y, Ohashi K, Ikeno K, Watanabe R, Tokunaga K, Harada N (2013). Protective Effect of Brazilian Propolis against Liver Damage with Cholestasis in Rats Treated with α -Naphthylisothiocyanate. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 302720: 14. <https://doi.org/10.1155/2013/302720>
255. Pahlavani N, Malekahmadi M, Firouzi S, Rostami D, Sedaghat A, Moghaddam AB, Ferns GA, Navashenag JG, Reazvani R, Safarian M, Ghayour-Mobarhan M (2020). Molecular and cellular mechanisms of the effects of Propolis in inflammation, oxidative stress and glycemic control in chronic diseases. *Nutr Metab (Lond)* 17:65 <https://doi.org/10.1186/s12986-020-00485-5>
256. Kjolby M, Andersen OM, Breiderhoff T, Fjorback AW, Pedersen KM, Madsen P, Jansen P, Heeren J, Willnow TE, Nykjaer A (2010). Sort1, encoded by the cardiovascular risk locus 1p13.3, is a regulator of hepatic lipoprotein export. *Cell Metab* 8;12(3): 213-23. doi: 10.1016/j.cmet.2010.08.006
257. Willnow TE, Kjolby M, Nykjaer A (2011). Sortilins: new players in lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 22(2): 79-85. doi: 10.1097/MOL.0b013e3283416f2b
258. Jiang YZ, Xing SH, Cen WM, Chen JN, Li XW (2013) [New insights in regulation factors of lipoprotein lipase]. *Yi Chuan* 35(7): 830-8. Chinese. doi: 10.3724/sp.j.1005.2013.00830
259. Kjolby M, Nielsen MS, Petersen CM (2015). Sortilin, encoded by the cardiovascular risk gene SORT1, and its suggested functions in cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* (4): 496. doi: 10.1007/s11883-015-0496-7

260. Dubé JB, Johansen CT, Hegele RA (2011). Sortilin: an unusual suspect in cholesterol metabolism: from GWAS identification to in vivo biochemical analyses, sortilin has been identified as a novel mediator of human lipoprotein metabolism. *Bioessays* 33(6): 430-7. doi: 10.1002/bies.201100003
261. Gustafsen C, Kjolby M, Nyegaard M, Mattheisen M, Lundhede J, Buttenschøn H, Mors O, Bentzon JF, Madsen P, Nykjaer A, Glerup S (2014). The hypercholesterolemia-risk gene SORT1 facilitates PCSK9 secretion. *Cell Metab* 4;19(2): 310-8. doi: 10.1016/j.cmet.2013.12.006
262. Sabatine MS, Underberg JA, Koren M, Baum SJ (2016). Focus on PCSK9 Inhibitors: From Genetics to Clinical Practice. *Postgrad Med* 128 Suppl 1: 31-9. doi: 10.1080/00325481.2016.1208895
263. Lakoski SG, Lagace TA, Cohen JC, Horton JD, Hobbs HH (2009). Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab* 94(7): 2537-43. doi: 10.1210/jc.2009-0141
264. Li J, Wang Y, Matye DJ, Chavan H, Krishnamurthy P, Li F, Li T (2017). Sortilin 1 Modulates Hepatic Cholesterol Lipotoxicity in Mice via Functional Interaction with Liver Carboxylesterase 1. *J Biol Chem* 6;292(1): 146-160. doi: 10.1074/jbc.M116.762005
265. Mortensen MB, Kjolby M, Bentzon JF (2015). Sortilin and atherosclerosis. *Oncotarget* 14;6(23): 19352-3. doi: 10.18632/oncotarget.5098
266. Goettsch C, Iwata H, Hutcheson JD, O'Donnell CJ, Chapurlat R, Cook NR, Aikawa M, Szulc P, Aikawa E (2017). Serum Sortilin Associates With Aortic Calcification and Cardiovascular Risk in Men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ;37(5):1005-1011. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.308932
267. Musunuru K, Strong A, Frank-Kamenetsky M, Lee NE, Ahfeldt T, Sachs KV, Li X, Li H, Kuperwasser N, Ruda VM, Pirruccello JP, Muchmore B, Prokunina-Olsson L, Hall JL, Schadt EE, Morales CR, Lund-Katz S, Phillips MC, Wong J, Cantley W, Racie T, Ejebe KG, Orho-Melandar M, Melander O, Koteliensky V, Fitzgerald K, Krauss RM, Cowan CA, Kathiresan S, Rader DJ (2010). From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus. *Nature* 5;466(7307): 714-9. doi: 10.1038/nature09266



EKLER

EK 2. Özet Grafik



- 3 Değer O, **Yiğit E**, Korkmaz K, Aygun P, Asghari A, Akbulut Cakiroglu K, Demir S (2023). Protective Effect of Bee Products Against Oxidative Damage in Erythrocytes. GUSBD 12(1): 167-174.
- 4 Sekerci CA, Aydın HR, Livaoglu A, **Yiğit E**, Toprak T, Ramazanoglu M, Güctas A, Ergun R, Kartal S, Kocagul H, Deger O (2023). Protective Effects of Ellagic Acid on Testicular Ischemia-Reperfusion Injury in Rats. J Urol Surg 10(2).

BİLDİRİLER

- 1 **Yiğit E**, Değer O, Demir S, et al (2017). ‘‘Investigation of protective effect of water extract of Turkish propolis against oxidative damage induced by tert-butyl hydroperoxide on the erythrocyte cells’’ Poster Sunum, 45th Apimondia Congress 2017 İstanbul, Türkiye, 29 Eylül - 04 Ekim 2017, ss.527
- 2 Deger O, **Yiğit E**, Aygun P, et al (2018). ‘‘Protective effects of bee products on oxidative damage for human red blood cells’’, Sözlü Sunum, Tam Metin, 4th International Eurasian Congress on `Natural Nutrition and Healthy Life Sport 2018, Ankara, Türkiye, 12 Temmuz 2018,15 Temmuz 2018.
- 3 Korkmaz K, Deger O, **Yiğit E**, et al (2019).‘‘Investigation of protective effect of water extract of Turkish pollen against oxidative damage induced by t-BHP’’, Sözlü Sunum, Tam Metin, 5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition Healthy Life Sport 2019, Ankara, Türkiye, 02 Ekim 2019, 06 Ekim 2019.
- 4 Cuvalcı B, Deger O, Akbulut Cakiroglu K, **Yiğit E**, KORKMAZ K (2019). ‘‘Investigation Of Propolis Solubility İn Various Vinegar Species’’, Sözlü Sunum, Tam Metin, 5th International Eurasian Congress on Natural Nutrition Healthy Life Sport 2019, Ankara,Türkiye, 02 Ekim 2019, 06 Ekim 2019.