



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OBEZİTE, DİYABET VE ATEROSKLEROZ METABOLİZMASI
ANABİLİM DALI

**PROPOLİS EKSTRAKTLARININ
ATEROJENİK DİYETLE BESLENEN APOE
KNOCKOUT FARELERİN ATEROM
PLAKLARINDA OKSİDE LDL DÜZEYLERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Katip KORKMAZ

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Orhan DEĞER

TRABZON-2024

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.

25.07.2024

Katip KORKMAZ

İmza

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bilimsel bakış açısı, akademik duruş ve insani açıdan her zaman yanımda olan tez çalışmamın gerçekleşmesinde bilgi ve tecrübeleriyle katkı sağlayan değerli danışman hocalarım sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER ve Doç. Dr. Selim DEMİR'e,

Lisansüstü eğitimim sürecinde her türlü bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım; emekli öğretim üyesi Prof. Dr. E. Edip KEHA, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül KURAL, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Prof. Dr. Ahmet MENTEŞE, Doç. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN ve Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin YAMAN'a,

Doktora tez çalışmasının çeşitli aşamalarında destekleri olan Samsun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Abd'de görevli Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU ve RTEÜ Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Abd'de görevli Doç. Dr. Tolga MERCANTEPE'ye,

Görev yaptığım KTÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nde başta Prof. Dr. Bahittin KAHVECİ olmak üzere tüm hocalarım ve çalışma arkadaşlarıma,

Doktora tezim ve diğer çalışmalarımda yardımcı olan başta Arş. Gör. Ertuğrul YİĞİT ve Doktora öğrencisi Hüseyin Çınar ZİHNİ olmak üzere Tıbbi Biyokimya Abd'deki arkadaşlarıma, Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanlarına ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü personeline,

Doktora eğitimi sürecinde burs desteği sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programına,

Bugünlere gelmem de sonsuz özveri ve destekleri olan başta eşime ve tüm aileme en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Katip KORKMAZ

Bu tez çalışması, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Numarası: TDK-2022-10451).

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar	4
2.1.1. Koroner veya İskemik Kalp Hastalıkları	4
2.1.2. Serebrovasküler Hastalıklar	4
2.1.3. Periferik Arter Hastalıkları	4
2.1.4. Hipertansiyon	4
2.1.5. Romatizmal Kalp Hastalıkları	5
2.1.6. Konjenital Kalp Hastalıkları	5
2.1.7. Derin Ven Trombozu ve Pulmoner Emboli	5
2.1.8. Diğer KVVH'ler	5
2.2. KVVH Risk Faktörleri	6
2.3. Oksidatif Stres	6
2.4. Dislipidemi	7
2.5. Endotel Hücreler ve Koroner Arterlerin Yapısı	8
2.5.1. Tunika İntima	9
2.5.2. Tunika Media	9
2.5.3. Tunika Adventisya	9

2.6. Lipoproteinlerin Yapısı ve Düşük Yoğunluklu Lipoprotein	9
2.6.1. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein	10
2.6.2. LDL'nin Oksidatif Modifikasyonu	11
2.7. Lektin Benzeri OxLDL Reseptör-1'in Yapısı	14
2.7.1. LOX-1'in Aterosklerotik Sürecin Gelişimine Etkileri	16
2.8. Endotel Disfonksiyonu	17
2.9. Aterosklerotik Sürecin Gelişim Hipotezleri	19
2.9.1. Hasara Cevap Hipotezi	19
2.9.2. İnflamasyon Hipotezi	19
2.9.3. Oksidatif Modifikasyon Hipotezi	20
2.9.4. Lipit Hipotezi	20
2.10. OxLDL'nin Aterosklerotik Sürecin Gelişimine Etkileri	21
2.11. Aterojenik Diyet ve Obezite	24
2.12. ApoE ^{-/-} Fare Modeli	25
2.13. Propolis	29
2.13.1. Propolisin Biyokimyasal ve Terapötik Etkileri	30
3. GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1. Gereç	34
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	34
3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler	35
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	35
3.2. Yöntemler	36
3.2.1. Sulu Propolis Ekstraktının Hazırlanışı	36
3.2.2. Etanollü Propolis Ekstraktının Hazırlanışı	36
3.2.3. Çalışma Grubu	36
3.2.4. Deneysel Ateroskleroz Modelinin Oluşturulması	38
3.2.5. Numunelerin Toplanması	38
3.2.6. Serum Rutin Biyokimya Parametrelerinin Ölçümü	38
3.2.7. Serum OxLDL Seviyelerinin Belirlenmesi	38
3.2.8. Serum LOX-1 Seviyelerinin Belirlenmesi	39
3.2.9. Aort Dokusu OxLDL Seviyelerinin Belirlenmesi	40

3.2.10. Aort Doku Homojenatında Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	41
3.2.11. Histolojik Analizler	41
3.2.11.1. Kriyostat Kesitler	41
3.2.11.2. Histolojik Doku Takip İşlemleri	42
3.2.11.3. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü	43
3.2.11.4. Yarı-kantitatif Analiz	44
3.2.12. İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR	47
4.1. Deney Gruplarının Ağırlık Değişim Değerleri	47
4.2. Biyokimyasal Bulgular	48
4.2.1. Serum TG ve TK Seviyeleri	48
4.2.2. Serum OxLDL Seviyeleri	48
4.2.3. Serum LOX-1 Seviyeleri	49
4.2.4. Aortik Ark Dokusu OxLDL Seviyeleri	50
4.3. Histolojik Bulgular	50
4.3.1. Aortik Kök Dokusu Histolojik Bulguları	50
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	54
6. KAYNAKLAR	61
EKLER	83
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	84
EK 2. Özet Grafik	85
EK 3. Kontrol Diyet	86
EK 4. Aterojenik Diyet	87
ÖZGEÇMİŞ	89

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Kullanılan cihazlar ve malzemeler	34
Tablo 2. Kullanılan ticari kitler	35
Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler	35
Tablo 4. Çalışma grupları	37
Tablo 5. Histolojik doku takip aşamaları	42
Tablo 6. İmmün boyama prosedürü	43
Tablo 7. Amerikan patoloji derneği aterom plak patoloji skorlaması	44
Tablo 8. Aort histopatolojik hasar skorlaması	45
Tablo 9. Serum TG ve TK seviyeleri	48
Tablo 10. Aortik kök histopatolojik hasar skorlaması bulguları	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1. ROS'un vasküler kaynakları ve etkileri	7
Şekil 2. Arteriyal tabakaların yapısı	8
Şekil 3. Aterosklerotik arter yapısı	9
Şekil 4. Lipoproteinlerin yapısı ve bileşenleri	10
Şekil 5. LDL'nin yapısı ve bileşenleri	11
Şekil 6. LDL'nin oksidatif modifikasyonu	12
Şekil 7. LDL'nin oksidatif modifikasyon enzimleri	13
Şekil 8. OxLDL'nin etki mekanizması	14
Şekil 9. LOX-1'in protein yapısı	15
Şekil 10. LOX-1'in <i>in vivo</i> uyarıcıları ve etkilenen yapılar	16
Şekil 11. LOX-1'in ateroskleroz gelişiminde pro-aterojenik etkileri	17
Şekil 12. Vasküler EC'de NO ve OxLDL'nin karşılaştırılması	18
Şekil 13. OxLDL'nin kolesterol metabolizması ve köpük hücre oluşumu	23
Şekil 14. Aterosklerotik sürecin gelişim evreleri	24
Şekil 15. Aort diseksiyon kesiti ve aortik kök bölümü	28
Şekil 16. Serum OxLDL standart grafiği	39
Şekil 17. LOX-1 standart grafiği	39
Şekil 18. Doku OxLDL standart grafiği	40
Şekil 19. BCA standart grafiği	41
Şekil 20. Deney gruplarının ağırlık değişimleri	47
Şekil 21. Serum OxLDL seviyeleri	49
Şekil 22. Serum LOX-1 seviyeleri	49
Şekil 23. Aortik ark doku OxLDL seviyeleri	50

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. ApoE ^{-/-} ve C57BL-6J farelerin aortik ark dokularının ORO ile boyanmış diseksiyon kesiti	28
Resim 2. Katı propolis	29
Resim 3. Kriyostat yöntemi ile elde edilen aortik kök dokusunun ORO ile boyanmış temsili ışık mikroskobu resimleri	51

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABCA1/G1	ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı protein-A1/G1
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ASKVH	Aterosklerotik kardiyovasküler hastalık
ApoB	Apolipoprotein-B
ApoE	Apolipoprotein-E
BCA	Bikinkoninik asit
BD	Birleştirici boyun domaini
CAPE	Kafeik asit fenetil esteri
CE	Kolesterol esteri
CETP	Kolesterol ester transfer protein
CD36	Farklılaşma kümeleri-36
CRP	C-reaktif protein
CTLD	C-terminal lektin-benzeri domain
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EC	Endotel hücresi
ELISA	Enzim bağlı immünosorbent deneyi
eNOS	Endotelyal nitrik oksit sentaz
EPE	Etanollü propolis ekstraktı
ER	Endoplazmik retikulum
GPx	Glutatyan peroksidaz
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HMG-CoA	Hidroksimetil glutaril-CoA
HUVEC	İnsan göbek damarı endotel hücreleri
ICAM-1	İnterselüler adezyon molekülü-1
IL	İnterlökin
i.p	İntraperitoneal
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz

KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
KVH	Kardiyovasküler hastalıklar
KVS	Kardiyovasküler sistem
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LDL-K	Düşük yoğunluklu lipoprotein-kolesterol
LDLR	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü
LOX	Lipoksijenaz
LOX-1/OLR-1	Lektin benzeri okside düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü-1/ okside LDL reseptörü-1
M-CSF	Monosit kolonisi uyarıcı faktör
MCP-1	Monosit kemoatraktan protein-1
MDA	Malondialdehit
MmLDL	Minimum modifiye LDL
MMP-1	Matriks metalloproteinaz-1
MPO	Miyeloperoksidaz
MUFA	Tekli doymamış yağ asitleri
NF-κB	Nükleer faktör-kappa B
NOX	NADPH oksidaz
ORO	Oil red O
OxLDL	Okside LDL
PC	Fosfatidilkolin
PBS	Fosfat tuz tamponu
PPAR-γ	Peroksizom proliferatörüyle aktive edilen reseptör gama
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
RTEÜ	Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
SD	N-terminal sitoplazmik domain
sLOX-1	Çözünür LOX-1

SMC	Düz kas hücresi
SOD	Süperoksit dismutaz
SPE	Sulu propolis ekstraktı
SPSS	Sosyal bilimler için istatistik programı
SR	Çöpçü reseptör
SREBP	Sterol düzenleyici eleman bağlayıcı protein
TG	Trigliserit
TK	Total kolesterol
TM	Transmembran domain
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α
TÜBİTAK	Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu
vb.	Ve benzeri
VLDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VSMC	Vasküler düz kas hücresi
XO	Ksantin oksidaz

Simgeler

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

mg	Miligram
n	Kiři sayısı
kg	Kilogram
dL	Desilitre
g	Gram
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
nm	Nanometre
cm³	Santimetre küp
ng	Nanogram
p	İstatistiksel anlamlılık düzeyi
kDa	Kilodalton
Khz	Kilohertz

Formüller

H₂O	Su
NO	Nitrit oksit
O⁻²	Süperoksit anyonu

ÖZET

Propolis Ekstraktlarının Aterojenik Diyetle Beslenen ApoE Knockout Farelerin Aterom Plaklarında Okside LDL Düzeylerine Etkilerinin İncelenmesi

Kardiyovasküler hastalıklar, dünyada yılda 3 milyondan fazla insanın hayatını kaybettiği önemli bir sağlık sorunudur. Sağlıksız beslenme, sedanter yaşam, sigara ve hipertansiyon gibi çeşitli kardiyovasküler risk faktörleri düşük yoğunluklu lipoproteinlerin okside LDL (OxLDL)'ye oksidatif modifikasyonunu hızlandırır. OxLDL; endotel hücre, düz kas hücresi, makrofajlar ve trombositler gibi birçok hücre ve yapının işlevini bozmaktadır. Bitki bazlı doğal bileşikler; kardiyovasküler sistemdeki inflamatuvar süreç ve oksidatif stres gelişimine etki ederek OxLDL oluşumunu azaltırlar. Bu tür doğal ürünlerden biri olan propolis, bal arılarının çeşitli bitkilerden topladığı flavonoid ve polifenolik bileşiklerce zengin içeriğe sahip anti-inflamatuvar, anti-oksidatif ve anti-aterojenik özellikler göstermektedir. Tez çalışmamızda kontrol ve sham gruplarında C57BL-6J fareler (n=16) kullanılırken; vaka, sulu propolis ekstraktı (SPE), etanollü propolis ekstraktı (EPE) ve çözücü (etanol) gruplarında apolipoprotein E knockout fareler (n=32) kullanıldı. Kontrol grubu, kontrol diyeti beslenirken diğer gruplar ise aterojenik diyet ile 16 hafta beslendi. Beslenmenin son 4 haftasında SPE (400 mg/kg/gün) ve EPE (200 mg/kg/gün) farelere intraperitoneal olarak uygulandı. Fareler sakrifiye edilerek aort dokuları ve kan örnekleri alındı. Serumda total kolesterol (TK) ve trigliserit (TG) seviyeleri enzimatik kolorimetrik yöntemle, serum OxLDL, lektin benzeri okside düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü-1/okside LDL reseptörü-1 (LOX-1/OLR-1) seviyeleri ve doku aortik ark OxLDL seviyeleri ELISA yöntemiyle ölçüldü. Ayrıca, aortik kökteki subendotelyal lipid birikimi oil red O boyama ile gösterildi. SPE ve EPE gruplarında vaka grubuna göre TK, TG, OxLDL ve LOX-1 seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü. Elde edilen sonuçlar, propolis ekstraktlarının dislipidemi ve oksidatif stresi azaltarak aterosklerotik sürecin gelişimini önleyici bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: ApoE^{-/-} fare modeli, Ateroskleroz, Oksidatif stres, Okside LDL, Propolis

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Propolis Extracts on Oxidized LDL Levels in Atheroma Plaques of ApoE Knockout Mice Fed with Atherogenic Diet

Cardiovascular diseases are a major health problem, killing more than 3 million people annually in the world. Various cardiovascular risk factors, such as unhealthy diet, sedentary lifestyle, smoking and hypertension accelerate the oxidative modification of low-density lipoproteins to oxidised LDL (OxLDL). OxLDL, disrupts the function of many cells and structures, such as endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages and platelets. Plant-based natural compounds reduce OxLDL formation by affecting the inflammatory process and oxidative stress in the cardiovascular system. Propolis, one of such natural products, shows anti-inflammatory, anti-oxidative and anti-atherogenic properties with a rich content of flavonoids and polyphenolic compounds collected by honey bees from various plants. In our thesis study, C57BL-6J mice (n=16) were used in control and sham groups, while apolipoprotein E knockout mice (n=32) were used in case, water propolis extract (WPE), ethanolic propolis extract (EPE) and solvent (ethanol) groups. The control group was fed with control diet and the other groups were fed with atherogenic diet for 16 weeks. WPE (400 mg/kg/day) and EPE (200 mg/kg/day) were applied intraperitoneally to the mice in the last 4 weeks of feeding. Mice were sacrificed and aortic tissues and blood samples were taken. Serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) levels were measured using enzymatic colorimetric method, serum OxLDL, lectin-like oxidised low density lipoprotein receptor-1/oxidised LDL receptor-1 (LOX-1/OLR-1) levels and tissue aortic arch OxLDL levels were measured using ELISA method. In addition, subendothelial lipid accumulation in the aortic root was demonstrated by oil red O staining. Statistically significant differences were observed in TC, TG, OxLDL and LOX-1 levels in WPE and EPE groups compared to the case group. The results showed that propolis extracts may have a preventive effect on the development of atherosclerotic process by reducing dyslipidaemia and oxidative stress.

Keywords: ApoE^{-/-} mice model, Atherosclerosis, Oxidative stress, Oxidised LDL, Propolis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH), kalp ve kan damarları bozukluklarını içeren, bulaşıcı olmayan ve dünyada yüksek ölüm oranına sahip hastalıklardan biridir (1). Koroner arterlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS)'nin artışı, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'lerin oksidasyonu, endotel disfonksiyonu ve oksidatif stresin gelişimi ile oluşan aterosklerotik KVH'ler morbidite ve mortalite artışına neden olmaktadır (2). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne göre dünyadaki ölümlerin %30-40'ı KVH kaynaklı risk faktörleri sonucu oluşmaktadır (3). KVH'ler, bulaşıcı olmayan kronik ve ilerleyici bir patolojiye sahiptirler. ROS'lar; lipit, protein ve karbohidratların hücresel işlevine zarar vererek lipit peroksidasyonu ve LDL oksidasyonunu artırır (4). Ayrıca, ROS'lar hücresel antioksidan kapasiteyi aştığında geri dönüşümü mümkün olmayan miyokardiyal hücre hasarı ve oksidatif strese yol açarlar (5).

Oksidatif stres; hücre membranının doğrudan hasar görmesine, endotel hasarına ve makrofajlar tarafından LDL alımını artıran LDL-kolesterol (LDL-K)'ün oksidasyonuna neden olmaktadır (6). LDL'nin yapısında bulunan kolesterol ve çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA), lipit peroksidasyonuna karşı çok hassastır. LDL'nin oksidasyonu sonucu antioksidan kapasite azalır, lipit peroksidasyonu artar ve çeşitli lipit yıkım ürünleri oluşur (7). Ayrıca, inflamatuvar sürecin gelişimi ile ROS üretimi aşırı artmakta ve LDL'nin serbest radikallerle etkileşimi sonucu okside LDL (OxLDL)'ler oluşmaktadır (8). OxLDL; subintimal alanda köpük hücrelerin birikimi, inflamatuvar sürecin aşırı artışı, düz kas hücreleri (SMC)'nin proliferasyonu ve endotel disfonksiyonu ile aterosklerotik KVH'nin gelişiminde önemli bir belirteç olarak kabul edilmektedir (9). Oksidatif stres veya inflamatuvar sürecin artışı ile dolaşımdaki LDL partiküllerinin OxLDL'ye modifikasyonunda ve lipit profili bozukluklarında artış görülmektedir (10). OxLDL'deki artış, immün hücrelerin (monositler ve T hücreleri) göçüne ve adezyonuna aracılık eden çeşitli hücre adezyon moleküllerinin [vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1), interselüler hücre adezyon molekülü-1 (ICAM-1), monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), P/E-selektin gibi] ekspresyonunu uyararak endotel hücre (EC)'leri aktive eder. Aktif EC'ler, çeşitli kemokin ve monositlerin intima tabakasına geçişini hızlandırır (2). Subendotelyum alanda biriken LDL miktarı ne kadar fazla olursa OxLDL artışı o kadar hızlı gerçekleşir. Monositler, monosit koloni uyarıcı faktör (M-CSF) ile farklılaşarak makrofajlara dönüşmektedir. Makrofajların yüzeyindeki çöpçü

reseptörleri-A/BI (SR-A/BI), farklılaşma kümesi 36 (CD36) ve lektin benzeri okside düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü-1/okside LDL reseptörü-1 (LOX-1/OLR-1) sayesinde OxLDL'nin etkileşimi kolaylaşmaktadır (11).

Lektin benzeri okside düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü-1/okside LDL reseptörü-1; OxLDL'nin en önemli reseptörü olup miyokardiyal fibröz, endotel disfonksiyonu ve aterosklerotik sürecin gelişiminde önemli etkilere sahip olduğu belirtilmektedir. OxLDL ile LOX-1'in etkileşimi EC'lerde; oksidatif stres, endotelial aktivasyon, EC apoptozu, SMC proliferasyonu ve EC'lere bağlı işlevsel bozuklukların artışına yol açmaktadır (12). Makrofajlarda down regülasyon olmadığı için OxLDL'nin birikimi ile köpük hücreler oluşmaktadır (13). Köpük hücreler birçok inflamatuvar ajanı (sitokinler, SMC ve OxLDL gibi) içine alarak büyük bir lezyon alanı oluşturur ve bu sürecin ilerleyişi aterosklerotik plak gelişimine yol açmaktadır (14, 15). Aterosklerotik plağın kararsızlığı sonucu, inflamatuvar ajanlar bağ dokusuna zarar vererek önce tromboz gelişimine ve sonrasında arter lümeninde agregasyona neden olmaktadır. Bu nedenle, aterosklerotik sürecin aydınlatılması vasküler hastalıkların önlenmesi ve yeni terapötik ajanların geliştirilmesinde önem arz etmektedir (16, 17).

Günümüzde doğal ürünleri içeren besin takviyelerine ilgi artmaktadır. Bu doğal ürünlerden birisi olan propolis; bal arılarının (*Apis mellifera*) kendilerini rüzgar, ışık ve zararlı mikroorganizmalar gibi dış etkenlerden korumak amacıyla ağaçların tomurcuk ve kabuklarından topladığı fenolik bileşiklerce zengin içeriğe sahip, toplandığı bitki türlerine göre farklı renklerde olabilen reçineli bir üründür (18). Yapısında yüzlerce bileşik içeren propolis, serbest radikal temizleme etkisinin de fazla olması nedeniyle anti-inflamatuvar, anti-oksidatif ve anti-aterojenik etkiler sergileyebilmektedir. Bitki bazlı doğal biyoaktif bileşiklerin inflamatuvar ve aterosklerotik süreç üzerindeki terapötik etkileri daha önceki çalışmalarda belirtilmiştir (19-21).

Deneyisel hayvan modeli ile ateroskleroz çalışmalarında insanlara metabolik ve patofizyolojik yönden benzeyen apolipoprotein E knockout (ApoE^{-/-}) fareler, KVH çalışmalarında iyi bir modeldir. ApoE^{-/-} farelerin fiziksel özellikleri diğer farelerle aynı olmakla birlikte, lipit profillerinde farklılıklar görülmekte olup plazmalarında ApoE proteini yoktur. Bu fareler yüksek yağlı veya batı tipi bir diyetle beslendiklerinde total kolesterol (TK), trigliserit (TG) ve LDL-K gibi plazma lipit parametrelerinde aşırı artış görüldüğü belirtilmektedir (22). Bu bilgiler doğrultusunda; aterojenik diyetle ApoE^{-/-}

farelerde deneysel ateroskleroz modelinin oluşturulması, sulu ve etanollü propolis ekstraktlarının ApoE^{-/-} farelerin aterom plaklarındaki OxLDL ve LOX-1 seviyelerine etkisinin hem biyokimyasal hem de histolojik açıdan incelenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler sistem (KVS), kalp ve kan damarlarından oluşan bir dolaşım sistemidir. Bu sistem tüm organ, doku ve hücrelere oksijen ve besin maddeleri sağlarken, CO₂ ve diğer atık ürünlerin de uzaklaştırılmasına yardımcı olmaktadır (23). Bu sistemin en önemli organı olan kalp, bir pompa gibi kasılıp gevşeyerek tüm vücutta kanın dağılmasını sağlamaktadır. Arterler, temiz kanı kalpten diğer dokulara taşıırken, venler ise kirli kanı kalbe geri getirmektedir. Kılcal damarlar ise tüm vücuttaki arterleri ve venleri birbirine bağlamaktadır (24).

KVS’de zamanla çeşitli problemlerin gelişimi sonucu KVH’ler oluşmaktadır. KVH; kalp ve kan damarları bozukluklarını içeren kardiyovasküler risk faktörleri ile başlayan, vasküler hastalıklar ile ilerleyen hedef doku ve organ hasarı, organ yetmezliği ve sonunda ölüm ile sonuçlanabilen bir süreçtir (25). KVH’nin dünyada yüksek morbidite ve mortalite oranına sahip olmasından dolayı kardiyovasküler riski azaltmak amacıyla net olarak tanımlanması ve uygun alanlara ayrılması gerekmektedir (26, 27).

Bu nedenle KVH’ler, sekiz alt kategoride sınıflandırılmıştır. Bunlar;

2.1.1. Koroner veya İskemik Kalp Hastalıkları

Kalbi besleyen koroner arterlerin daralması veya tıkanması sonucu oluşan miyokardiyal enfarktüs veya anjina gibi rahatsızlıklardır.

2.1.2. Serebrovasküler Hastalıklar

Beyni besleyen kan damarlarının daralması veya tıkanması sonucu oluşan iskemik inme veya geçici iskemik ataklardır.

2.1.3. Periferik Arter Hastalıkları

Kol ve bacakları besleyen damarların daralması veya tıkanması sonucu aralıklı topallama veya kangrene neden olan rahatsızlıklardır.

2.1.4. Hipertansiyon

Kalp ve arter hastalıklarına bağlı yüksek sistemik arteriyal kan basıncı sonucu oluşan rahatsızlıklardır.

2.1.5. Romatizmal Kalp Hastalıkları

Streptokok gibi çeşitli bakteri türlerinin neden olduğu kalp kası ve kapakçıklarında görülen romatizmal rahatsızlıklardır.

2.1.6. Konjenital Kalp Hastalıkları

Doğuştan gelen kalbin yapısına bağlı gelişen çeşitli yapısal bozukluklardır.

2.1.7. Derin Ven Trombozu ve Pulmoner Emboli

Bacak, kalça ve kollardaki venlerde oluşan kan pıhtılarının kalp ve akciğerlerdeki kan akışını kısmen veya tamamen engellemesi sonucu oluşan rahatsızlıklardır.

2.1.8. Diğer KVVH'ler

Kalp yetmezliği; kardiyomiyopati, kardiyak aritmi, inflamatuvar kalp hastalıkları ve kalp kapağı hastalığı gibi rahatsızlıklardır (24, 28).

DSÖ'ye göre, bulaşıcı olmayan KVVH kaynaklı hastalıklardan yıllık yaklaşık 17.9 milyon insan ölmekte ve bu dünyadaki ölümlerin %32'sini oluşturmaktadır. Ölümlerin %85'i kalp krizi ve inme kaynaklı olarak gerçekleşmektedir. KVVH kaynaklı ölümlerin %75'inden fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde gerçekleşmekte olup, ölüm hızı ise her geçen yıl artmaktadır. Eğer çözüm bulunmaz ise 2030 yılına kadar 25 milyona çıkabileceği tahmin edilmektedir (3, 29).

KVVH'ler, erken ölüm oranı ve sağlık maliyetlerinin artmasının başlıca nedenleri arasında yer almaktadır. KVVH'nin artışına; kardiyometabolik, davranışsal, çevresel ve sosyal risk faktörleri neden olmaktadır. Toplam KVVH vakaları dünyada 1990'da 271 milyon iken 2019'da 523 milyona kadar yükselmiştir. KVVH kaynaklı ölüm oranlarının her geçen yıl arttığı görülmektedir (30). Türkiye'de ise Türkiye İstatistik Kurumu 2019 yılı verilerine göre KVVH kaynaklı ölümler %36.8'lik oran ile ilk sırada yer almaktadır. Bu ölümlerin %39.1'i iskemik kalp hastalıkları, %22.2'si serebrovasküler hastalıklar ve %25.7'sini ise diğer kalp hastalıklarının oluşturduğu belirtilmektedir (31).

2.2. KVVH Risk Faktörleri

Yüksek miktarda alınan şekerli besin ve içecekler, doymuş ve trans yağlar, düşük lif ve işlenmiş besinleri içeren diyetler bulaşıcı olmayan hastalıklara ve birçok sağlık sorunlarına yol açmaktadır. KVVH'de sağlıklı beslenme önemli olup bunun için

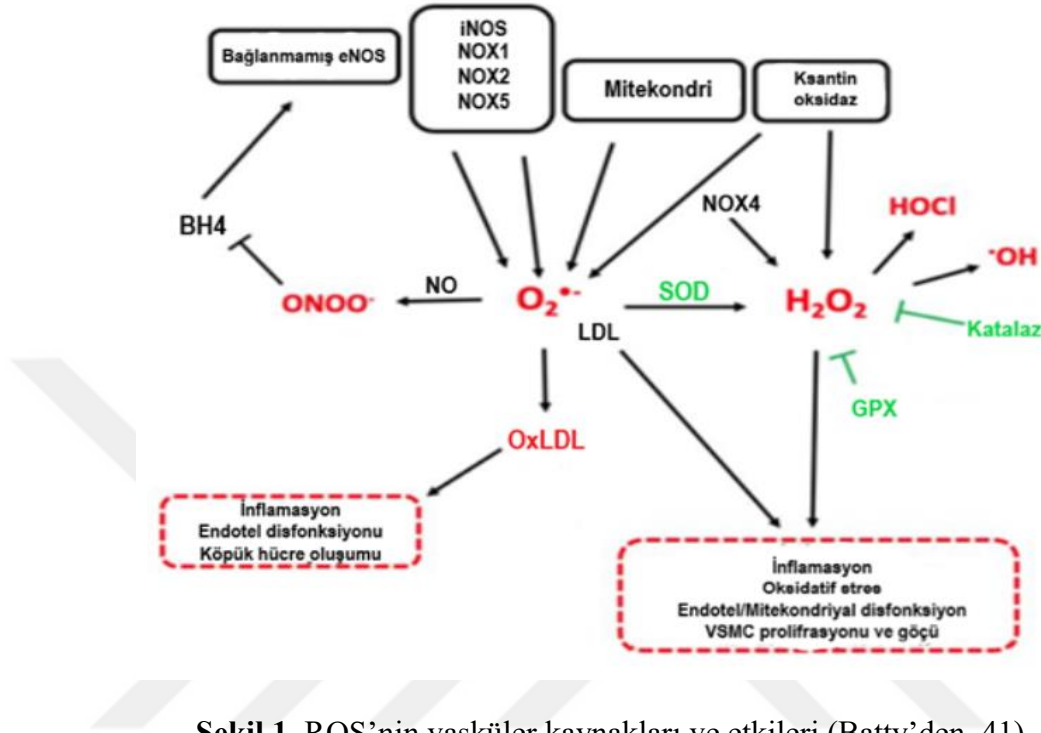
en etkili beslenme tedavileri kanıta dayalı, belirli oranlarda kaloriye uygun, besin alımını teşvik eden ve uzun süre uygulanabilirliği yüksek olan diyetlerdir. Doymuş yağların aşırı alımının LDL-K ve ApoB seviyelerinde artışa ve ayrıca inflamasyon gelişimi ile aterosklerotik KVVH'ye yol açtığı belirtilmiştir (32).

Amerikan Koruyucu Kardiyoloji Derneği, KVVH risk faktörlerini 2021 yılında tekrar düzenleyerek sınıflandırmıştır. Böylece, KVVH risk faktörlerinin klinik önemi ve önlemeye yönelik adımlar daha iyi belirlenmiştir. Bu risk faktörleri; sağlıksız beslenme, sedanter yaşam, dislipidemi, hiperglisemi, hipertansiyon, obezite, cinsiyet farklılıkları, etnik köken, sigara kullanımı, böbrek fonksiyon bozukluğu, genetik bozukluklar ve ailesel hiperkolesterolemi olarak sınıflandırılmıştır (33).

2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, vücuttaki oksidan ile antioksidan dengenin oksidanlar yönüne kayması sonucu oluşmaktadır. Oksijen metabolizması sonucu serbest radikal kaynağı olarak bilinen ROS'lar sentezlenmektedir. Oksidatif stres; *in vivo* olarak aşırı üretilen ROS'un antioksidanların tamponlama kapasitesini aşarak hücrelerde dengesizliğe neden olması ile oluşmaktadır (34, 35). ROS üretim miktarına bağlı olarak hücre içi bağışıklık sistemi ve oksidatif denge değişebilir. Hücrelerdeki ROS üretimi arttığında LDL oksidasyonu, endotel disfonksiyonu ve inflamatuvar süreçlerde değişiklikler olmaktadır (36). Oksidatif stres; serbest radikalleri ve ROS üretimini artırarak hücrelerdeki lipid ve protein yapılarını bozar ve biyolojik sistem üzerinde olumsuz etkilere yol açar (37). KVVH'de oluşan oksidatif hasarın miyokard enfarktüsü, iskemi/reperfüzyon hasarı ve kalp yetmezliği ile arasında güçlü bir bağlantı vardır. Bunu önlemek için ROS oluşumunun azaltılması gerekmektedir (38, 39). KVVH'de hem endojen hem de eksojen faktörler ROS oluşumunun artışına neden olmaktadır. Mitokondriler, hücresel solunumda oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP sentezi gerçekleştirirler. Ancak, sentez sırasında ROS gibi yan ürünler oluşabilir. Mitokondriler, endojen ROS'un ana kaynağı olup KVVH'de daha fazla artarlar. NADPH oksidaz (NOX), ksantin oksidaz (XO), lipoksijenaz (LOX) ve miyeloperoksidaz (MPO) ROS üretiminde rol oynayan etkili oksidatif stres biyobelirteç enzimleridirler (40). Hücresel homeostaz ve sinyalizasyonda bazal ROS seviyeleri önemlidir. Bu biyobelirteç enzimleri, elektronları ilgili substratlarından alarak oksijen moleküllerine aktarır ve oksijenin indirgenmesini katalize ederler. Ayrıca, artan ROS üretimi veya

azalmış antioksidan kapasiteden kaynaklanan ROS fazlalığı da oksidatif stres gelişimine neden olmaktadır (41). ROS'nin vasküler kaynakları ve etkileri Şekil-1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. ROS'nin vasküler kaynakları ve etkileri (Batty'den, 41)

Vücuttaki oksidatif stres artışı, KVH gibi çeşitli patofizyolojik durumlara neden olmaktadır. KVS'de ROS ve nitrik oksit türleri gibi serbest radikallerinde eklenmesi ile kardiyak bozukluklar başlamaktadır. Oksidatif stres; dislipidemi, hipertansiyon ve obezite ile ilişkili hastalıklarda daha çok etkilidir. Ancak, antioksidanlar oksidatif stresin kontrolünde önemli etkilere sahip olup lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve DNA hasarına yol açacak patolojik değişikliklere engel olurlar. Oksidatif stresle ilişkili hastalıklarda erken teşhis, hasta sınıflandırması ve terapötik izleme gibi teşhisler etkilidir (35).

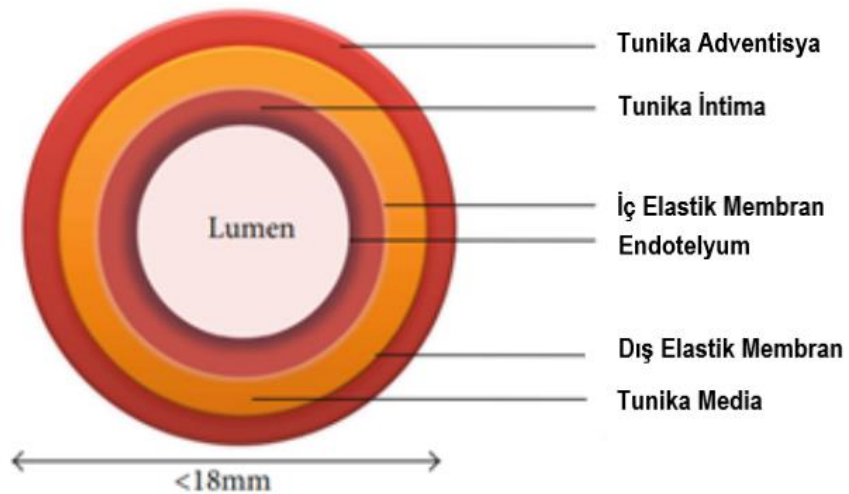
2.4. Dislipidemi

Dislipidemi, kandaki lipoprotein parametrelerinden TK (≥ 239.75 mg/dL), TG (≥ 150.58 mg/dL) ve LDL-K (≥ 185.61 mg/dL) seviyelerinin aşırı artışı veya HDL-K (< 38.67 mg/dL) seviyelerinin aşırı azalışı sonucu gerçekleşen lipoprotein metabolizması bozukluğudur (42).

LDL-K, küçük ve yoğun yapısından dolayı arterlerin intimasına kolaylıkla geçerek aterom plak gelişimini hızlandırabilir. Dislipidemi, asemptomatik olarak kabul edilmekte olup aterosklerotik KVH (ASKVH) gelişiminde ve yayılmasında önemli etkileri olan fakat değiştirilebilen bir risk faktörüdür (43). Bu yüzden dislipidemiye erken dönemde önlem alınması ile ASKVH'nin gelişme riski azaltılabilir. Dislipidemi prevalansını azaltmak için diyet türü, yeme alışkanlıkları, fiziksel aktivite ve diğer yaşam tarzlarında değişiklikler yapılmalıdır (44).

2.5. Endotel Hücreler ve Koroner Arterlerin Yapısı

Endotel hücreler, vücuttaki kanı damar duvarından ayıran tek bir hücre tabakasından oluşmaktadır. Dolaşımda bulunan nörotransmitter, hormon ve toksin gibi endojen ve eksojen kaynaklı maddelere veya çeşitli etkileşimlere maruz kalan ilk hücrelerdir. Bu yüzden, fizyolojik koşulların değişiminde öncelikle EC'ler etkilenmektedir (45, 46). Endotel hücre tabakası; nitrik oksit (NO), prostasiklin ve endotelin-1 gibi mediyatörler ve çeşitli reaksiyonlar yoluyla vasküler tonusu, pıhtılaşma kaskatını ve vasküler homeostazı sürdürmeye yardımcı olmaktadır. Dolaşımda, dokular arasındaki biyolojik aktif maddelerin sinyalizasyonu ve dönüşümünü sağlamaktadır (47, 48). Normal bir arter duvarı üç tabakadan oluşmaktadır. En içte lümeni çevreleyen tunika intima, ortada tunika media ve en dışta ise tunika adventisya tabakasından oluşmaktadır (15). Arteriyal tabakaların yapısı Şekil-2 ve 3'te gösterilmiştir.



Şekil 2. Arteriyal tabakaların yapısı (Khatana'dan, 15)

2.5.1. Tunika İntima

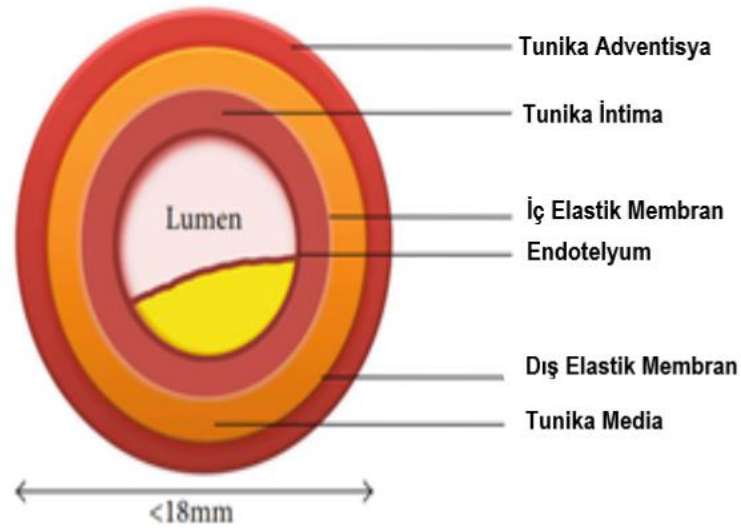
Endotel hücre tabakası; kolajen, fibronektin ve subendotelyal ekstraselüler matriks moleküllerini içermektedir. Bu tabakada bağ dokusu lifleri, proteoglikanlar ve mezenkimal kök hücrelerin birikimi olmaktadır. Bu tabakada madde geçişine izin veren ve hücrelerin beslenmesine yardımcı olan kısımlar bulunmaktadır (48, 49).

2.5.2. Tunika Media

Arter duvarının ortasındaki en geniş tabaka olup yapısında SMC, kolajen, glikozaminoglikanlar ve pulsatil akışın iletiminde gerekli kinetik enerjiyi depolayan elastin proteinleri bulunmaktadır (50).

2.5.3. Tunika Adventisya

En dış tabaka olup mast hücreleri, fibroblastlar, adipositler, sempatik sinir uçları, fibroblastlar ve proteoglikanlar ile boyuna dizilmiş kolajen lifleri içeren gevşek bir yapıya sahiptir (51, 52). İç ve dış elastik lamina sırasıyla intima, media ve adventisya'yı birbirinden ayırmaktadır (53).

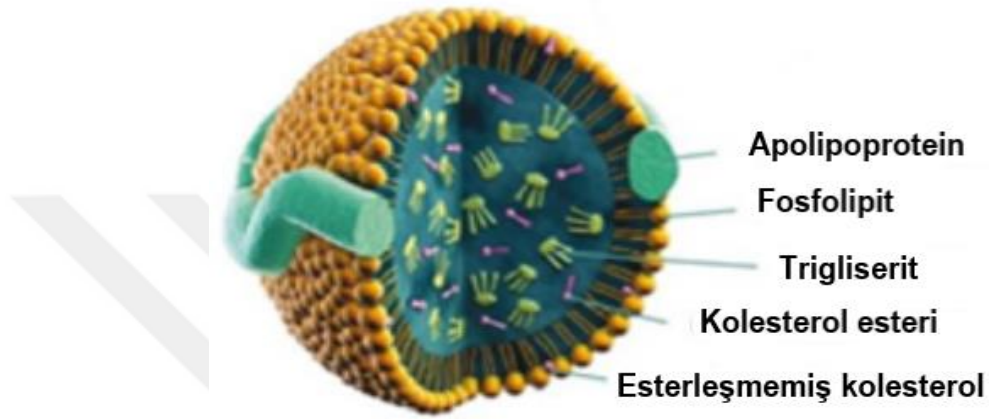


Şekil 3. Aterosklerotik arter yapısı (Khatana'dan, 15)

2.6. Lipoproteinlerin Yapısı ve Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

Lipoproteinler; küresel bir yapıda olup serbest kolesterol, fosfolipit ve apolipoproteinlerden oluşan hidrofilik bir dış yapı ile kolesterol esterleri ve trigliserit (TG)'leri içeren hidrofobik bir çekirdekten oluşan moleküllerdir (54). Lipoproteinler;

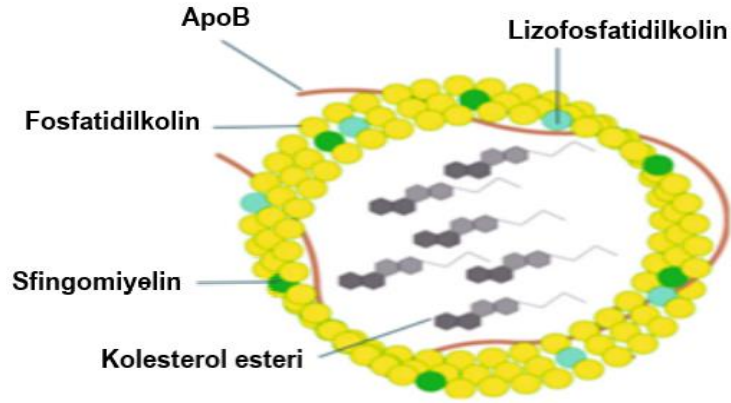
boyut, bileşim ve işlevsel yönden birbirinden farklılıklar göstermektedir. Partikül boyutunun büyüklüğüne göre sırasıyla şilomikronlar, çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL), LDL ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) olmak üzere 4 farklı tipte sınıflandırılmıştır. Şilomikronlar diyetle alınan lipidlerin taşınmasında görevli iken, VLDL, LDL ve HDL ise endojen lipidlerin taşınmasında görevlidirler (55). Lipoproteinlerin yapısı ve bileşenleri Şekil-4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Lipoproteinlerin yapısı ve bileşenleri (Hua'dan, 54)

2.6.1. Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

Lipitler, oksidatif hasarda temel hedef olup lipit peroksidasyonu enzimatik veya non-enzimatik reaksiyonlar ile gerçekleşmektedir (56). LDL; 1.019-1.063 g/mL yoğunlukta, TG içeriği düşük, kolesterol ve kolesterol esterleri (CE) içeriği yüksek küresel bir moleküldür. LDL'nin yapısında yüksek miktarda fosfatidilkolin, ApoB100 ve sfingomiyelin bulunurken, düşük miktarda lizofosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, diaçilgliserol, seramid ve fosfatidilinositol gibi çeşitli lipitler bulunmaktadır (55, 57). LDL'nin yapısı ve bileşenleri Şekil-5'te gösterilmiştir.



Şekil 5. LDL'nin yapısı ve bileşenleri (Khatana'dan, 15)

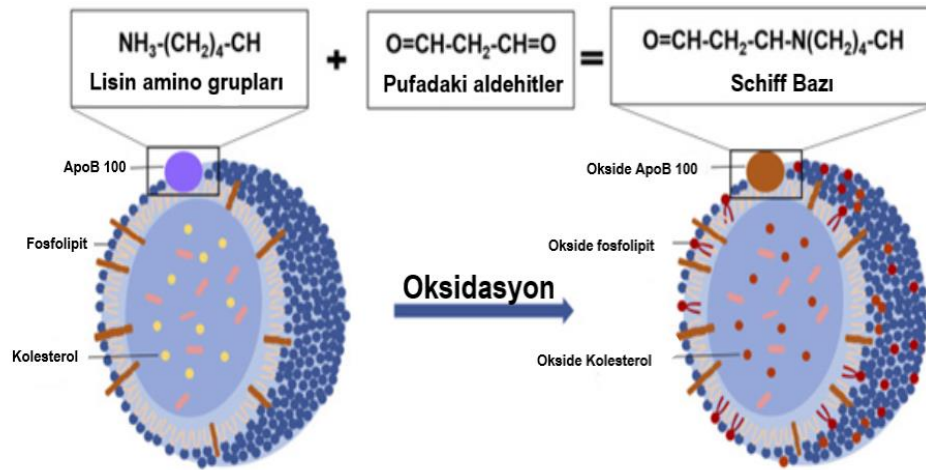
LDL; VLDL'nin yıkım ürünü olup CE'nin karaciğerden periferik dokulara taşınmasında kullanılır. LDL'nin plazma seviyesi, hacim ve yoğunluğuna göre farklılıklar göstermektedir. LDL'nin yaklaşık %70'i LDL reseptörleri (LDLR) aracılığıyla hepatositler tarafından kullanılırken, diğer kısımları ekstrahepatik dokular tarafından kullanılmaktadır. Bu nedenle hepatik LDLR aktivitesine göre LDL seviyelerinin belirlendiği düşünülmektedir. LDLR, hücrelerin yüzeyinde bulunan ve dolaşımında LDL'nin endositozuna aracılık eden membran reseptörleridir (55).

2.6.2. LDL'nin Oksidatif Modifikasyonu

LDL'nin oksidatif modifikasyonu ilk olarak 1980 yılında Brown ve Goldstein tarafından tanımlanmış ve sonrasında 1989 ve 2002 yıllarında LDL oksidasyonu sonucu oluşan OxLDL'nin aterosklerotik lezyonların gelişimindeki etkileri belirtilmiştir (58, 59). OxLDL, peroksitler veya peroksitlerin yıkım ürünlerini içeren LDL'nin post-translasyonel oksidatif modifikasyonu sonucu oluşan moleküller olarak belirtilmekte olup inflamatuvar süreç gelişimi, aşırı ROS üretimi ve LDL'nin serbest radikallerle değişimi sonucu oluşur (8, 60, 61). LDL'nin oksidasyonu sonucu antioksidan miktarı azalır, lipid peroksidasyonu artar ve lipid yıkım ürünleri (heksanal, 4-hidroksinonenal ve malondialdehit (MDA)) oluşur. OxLDL; sitotoksik, kemotaktik ve immünojenik etkilere sahip olup KVVH'nin patofizyolojisindeki önemli etkilerinden dolayı aterosklerotik sürecin merkezi olarak düşünülmektedir (7, 8).

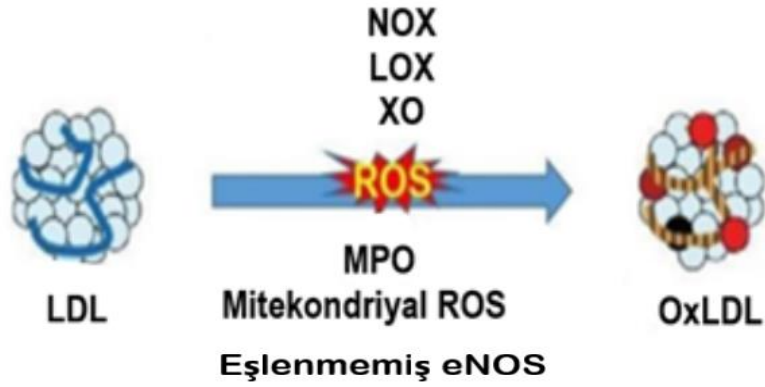
Bir hücredeki ROS dengesizliği, hücresel bileşenlerde oksidatif hasara yola açarak apoptoz veya nekrozu tetikleyebilir. Bu nedenle oksidatif stresi baskılayarak

KVH'ye karşı önlemler alınabilmektedir (62). Lipoksijenaz ve fosfolipaz-A2 enzimleri, LDL'yi makrofajlar tarafından kolayca tanınacak şekilde modifiye ederler. LDL'nin oksidasyonu, fosfatidilkolini hidrolize eden ApoB'nin lizin kalıntılarını değiştiren ve yapısını bozan belirli modifikasyonlara yol açar. LDL'nin yapısındaki PUFA'lar, tekli doymamış yağ asitleri (MUFA)'ne kıyasla oksidasyona daha yatkındır (63). LDL'nin oksidasyonu ile oksitlenmiş steroller, yağ asitleri ve bazı küçük biyoaktif moleküllerin oluştuğu belirtilmiştir. Oksidatif stresin oluştuğu şartlarda, LDL'nin dış tabakasında bulunan fosfolipit ve ApoB100'ler ROS aracılı modifikasyona ve bozunmaya oldukça duyarlıdır. ApoB100'ün lizin kalıntıları, oksidatif fosfolipitlerdeki reaktif aldehyitlerle reaksiyona girerek Schiff bazı oluştururlar. Ayrıca LDL'nin iç tabakasında bulunan CE'lerde kademeli olarak oksitlenmektedirler (64). LDL'nin oksidatif modifikasyonu Şekil-6'da gösterilmiştir.



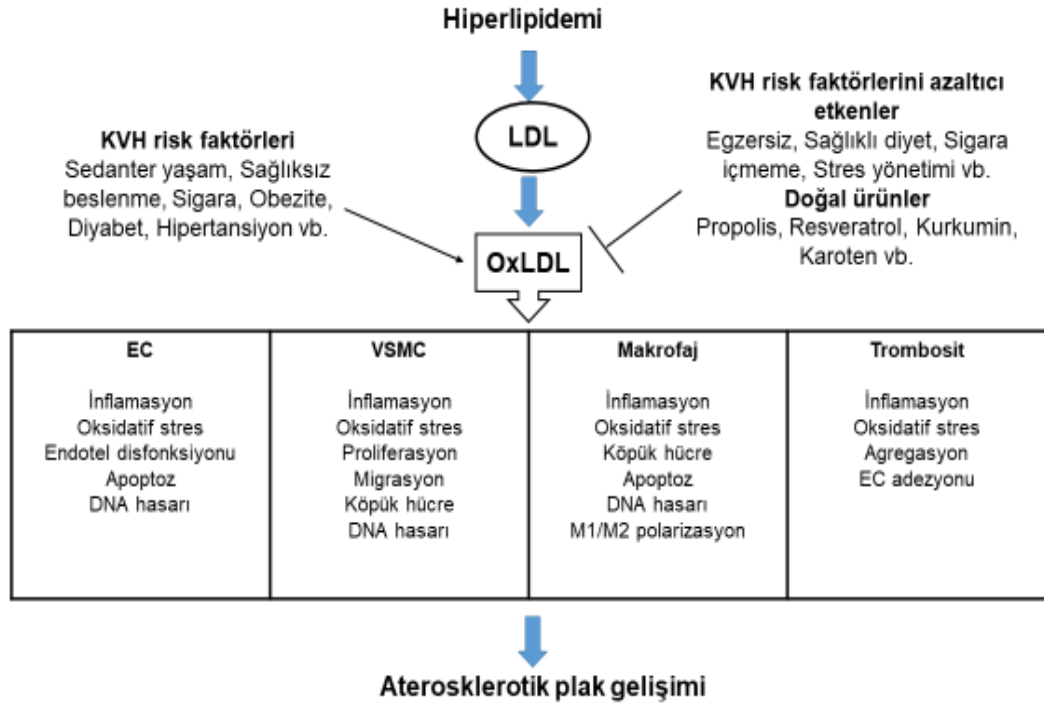
Şekil 6. LDL'nin oksidatif modifikasyonu (Duan'dan, 64)

Ayrıca, LDL'nin oksidatif modifikasyonunda çeşitli enzimler görev almaktadır. LDL, vasküler hücrelerin farklı tabakalarında oksitlenebilmektedir. NOX, LOX, XO, MPO ve bağlanmamış endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimleri kullanılmaktadır (65). LDL'nin oksidatif modifikasyon enzimleri Şekil-7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. LDL'nin oksidatif modifikasyon enzimleri (Jiang'dan, 65)

OxLDL; EC'lerde adezyon moleküllerin ekspresyonunun uyarılmasına, makrofajların proliferasyonu ve kolajen oluşumuna, SMC'lerin göçü ve trombosit aktivasyonuna neden olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, makrofajlar ve vasküler SMC'lerin köpük hücrelere dönüşümüne de katkı sağlamaktadır. OxLDL, bu tür hücrelerin membran proteini olan LOX-1 reseptörüne bağlanarak etkilerini göstermektedir (61, 66). Subendotelyumdaki LDL miktarı ne kadar fazla olursa, OxLDL artışı da o kadar hızlı gerçekleşir. SR-AI/BI, CD36 ve LOX-1 reseptörleri, subendotelyumdaki monosit kaynaklı makrofajlar tarafından OxLDL'nin alımına yardımcı olur (11). Büyüme faktörleri, SMC'nin çoğalmasına ve hücre dışı matriksin oluşumuna aracılık etmektedir. Trombosit yapışması ve birikmesi kısmen yırtılmaya eğilimli bir trombüsle sonuçlanır ve bu durumun oluşmasında OxLDL etkilidir (15, 67). Ateroskleroz gelişiminde, OxLDL kaynaklı etki mekanizmasının en uygun hipotez olduğu belirtilmektedir (65). OxLDL'nin plazma seviyesinin, KVH'nin belirlenmesinde etkili bir biyobelirteç olduğu düşünülmektedir (68). OxLDL'nin etki mekanizması Şekil-8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. OxLDL'nin etki mekanizması (Zhang'dan, 69)

Sağlıksız beslenme, sedanter yaşam, sigara kullanımı ve hipertansiyon gibi çeşitli kardiyovasküler risk faktörleri LDL'nin OxLDL'ye oksidatif modifikasyonunu hızlandırır. OxLDL; EC, SMC, makrofajlar ve trombositler dahil olmak üzere kardiyovasküler hücrelerin işlevini bozarak akut KVV'ye neden olan aterosklerotik plak gelişimine yol açmaktadır. Ancak, LDL'nin oksidatif modifikasyonunu engellemede sigarayı bırakma, egzersiz yapma, sağlıklı beslenme ve bazı doğal ürünlerin alınımının etkili olduğu belirtilmektedir (69). Ayrıca, statinler ve fibrat gibi lipid düşürücü ilaçlar, C ve E vitaminleri, koenzim Q, resveratrol, kuersetin, probukol ve likopen gibi fitokimyasalların dahil olduğu antioksidan bileşikler ile LDL'nin oksidasyonu engellenerek lipoproteinlerin kolesterol yükü, inflamasyon ve oksidatif stres azaltılabilir (65, 70, 71).

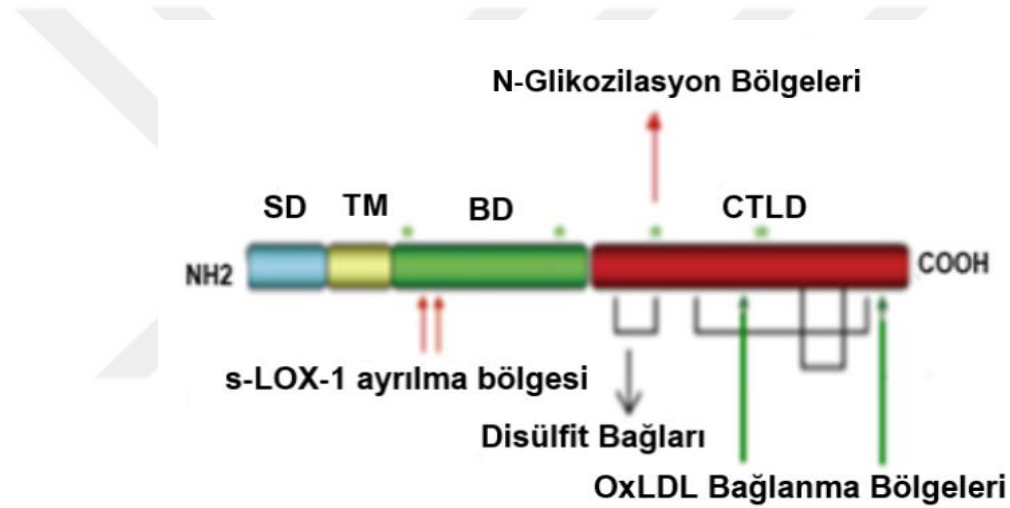
2.7. Lektin Benzeri OxLDL Reseptör-1'in Yapısı

Lektin benzeri OxLDL reseptör-1; başlıca EC, SMC, kardiyomiyositler, makrofajlar ve trombositlerde OxLDL'nin bağlanması, etkileşimi ve yıkımında görevli transmembran proteinidir (12). LOX-1, 273 amino asitten oluşan 50 kDa ağırlığında OLR-1 geni tarafından kodlanan Ca^{2+} bağımlı C-tipi lektin ailesine ait tip-II

transmembran glikoprotein sınıfında olup dört çeşit domainden oluşmaktadır.

- a) N-terminal sitoplazmik domain (SD),
- b) Transmembran domain (TM),
- c) Bağlayıcı ve birleştirici domaini (BD),
- d) OxLDL'nin bağlanmasına yardımcı olan C-terminal lektin-benzeri domain (CTLD)

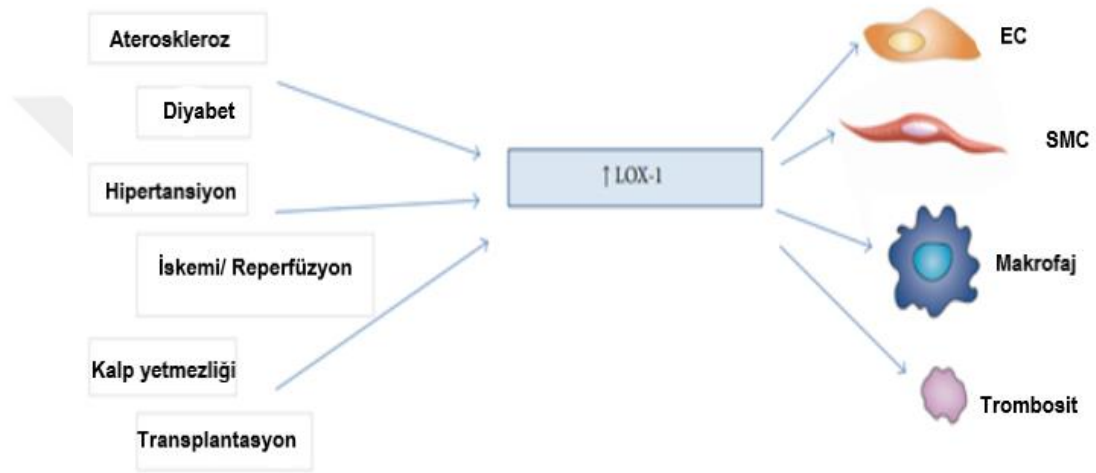
Ayrıca, 2 N-glikozilasyon bölgesi, 3 disülfid bağlanma bölgesi ve 2 çözünür LOX-1 (sLOX-1) salınımı için görevli LOX-1 ayrılma bölgesi içermektedir (72, 73). LOX-1'in protein yapısı Şekil-9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. LOX-1'in protein yapısı (Ayaz'dan, 73)

LOX-1, ORL-1 olarak da ifade edilen birincil OxLDL reseptörüdür. LOX-1/OLR-1'in en güçlü aktivatörü OxLDL'dir. OxLDL'nin LOX-1'e bağlanması ile aktive olan nükleer faktör-kappa B (NF- κ B); LOX-1'in shear stres cevap elemanı bölgelerine bağlanarak adezyon moleküller, sitokinler ve LOX-1'de ekspresyon artışına yol açmaktadır (74). OxLDL reseptörü olarak tanımlanan LOX-1, ilk olarak sıgır aort EC'lerinde sonrasında koroner arter EC'leri, makrofajlar, trombositler, SMC ve kardiyomiyositler gibi çeşitli insan hücre tiplerinde eksprese edilmiştir (75, 76). OxLDL- LOX-1 etkileşiminin ateroskleroz, miyokardiyal fibröz ve endotel disfonksiyon artışında etkili olduğu görülmüştür (77). Ayrıca LOX-1, ROS oluşumunu artırır ve aşırı ROS üretimi ile protein kinazların (tirozin kinaz ve mitojenle aktive olan

protein kinaz) fosforilasyonuna da neden olurlar (78). LOX-1, dolaşımdaki doğal LDL'ye bağlanmazken spesifik olarak OxLDL'ye bağlanır. LOX-1'in normal sağlıklı hücrelerdeki ekspresyonu bazal seviyede iken, pro-inflamatuar ve pro-aterojenik faktörler ile ekspresyonu artmaktadır. LOX-1 ekspresyonu *in vitro* koşullarda; pro-inflamatuar sitokinler, OxLDL, anjiyotensin II, endotelin-1 ve ROS ile artarken, *in vivo* koşullarda ise ateroskleroz, hipertansiyon ve diyabet gibi patolojik durumlarda artmaktadır (79). LOX-1'in *in vivo* uyarıcıları ve etkilenen yapılar Şekil-10'da gösterilmiştir.



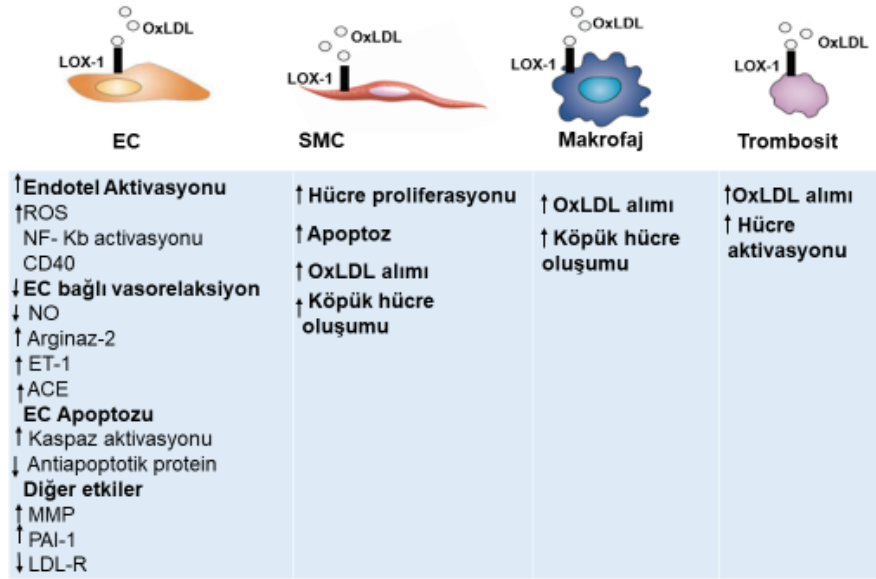
Şekil 10. LOX-1'in *in vivo* uyarıcıları ve etkilenen yapılar (Pirillo'dan, 60)

LOX-1; OxLDL'nin yanı sıra diğer modifiye lipoprotein formları, ileri glikasyon ürünleri, aktiveleştirilmiş trombositler ve apoptotik hücreler gibi birçok yapıda da etkili olduğu belirtilmiştir (60).

2.7.1. LOX-1'in Aterosklerotik Sürecin Gelişimine Etkileri

Lektin benzeri OxLDL reseptör-1; EC aktivasyonu, endotel disfonksiyonu, LDL oksidasyonu ve retansiyonu, monosit infiltrasyonu, makrofaj göçünün durması, VSMC çoğalması ve göçü, köpük hücre oluşumu ve trombosit aktivasyonu gibi aterosklerotik süreç gelişiminde etkili bir glikoproteindir. OxLDL'nin LOX-1'e bağlanması ile EC'lerde; oksidatif stres, endotelial aktivasyon, EC apoptozu ve EC'lere bağlı işlevsel bozukluklarda artış gerçekleşir. Ayrıca, dolaşımdaki monositlerin bir araya gelmesi, köpük hücre oluşumu, SMC'lerin göçü ve artışı ile aterosklerotik plak gelişimine neden olmaktadır. OxLDL-LOX-1 etkileşimi; SMC

apoptozu ve matriks metalloproteinaz-1 (MMP-1) salınımını uyararak plak bozukluklarına yol açmaktadır (12, 59, 60). Ayrıca, bu etkileşim ile EC'lerden NO salınımı azalmaktadır. OxLDL'nin, ROS ve süperoksit üretimini artırarak oksidatif bir mekanizma ile NO sentezini inhibe ettiği de belirtilmiştir (80). LOX-1 SMC'lerde; hücre proliferasyonu, apoptoz, OxLDL alımı ve köpük hücre oluşumu artışına neden olmaktadır. SMC'ler köpük hücrelere de dönüşebildiğinden LOX-1 yardımcı bir faktör olarak etki etmektedir. Ayrıca, OxLDL inkübasyonunun sitoplazmada SMC, lipid birikimi ve LOX-1 yüzey ekspresyonunu uyardığı belirtilmiştir (81). LOX-1 makrofajlarda; SR-AI/II, SR-BI ve CD36 reseptörleri ile etkileşerek lipid birikimine ve köpük hücre oluşumuna katkı sağlamaktadır. Makrofajlardaki LOX-1 ekspresyonu OxLDL, lizofosfatidilkolin, yüksek glukoz miktarı ve pro-inflamatuar sitokinler gibi çeşitli faktörler ile artabilmektedir (79). LOX-1'in ateroskleroz gelişiminde pro-aterojenik etkileri Şekil-11'de gösterilmiştir.



Şekil 11. LOX-1'in ateroskleroz gelişiminde pro-aterojenik etkileri (Pirillo'dan, 60)

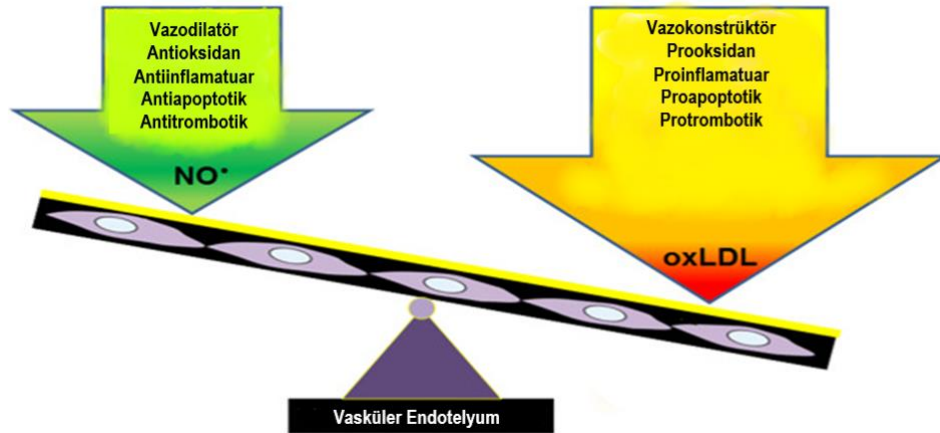
2.8. Endotel Disfonksiyonu

Endotel disfonksiyonu ile metabolik, immünolojik ve toksik faktörler EC'lerin seçici geçirgen, antiproliferatif, vazodilatör ve vazokonstrüktif özelliklerini bozarak pro-inflamatuar ve protrombotik süreçlerin gelişimine neden olmaktadır. Aslında bu durum EC'lerin vasküler homeostazı düzenleyememesi anlamına gelmektedir (35, 82,

83).

Endotel disfonksiyonun patofizyolojisi karmaşık olup birçok farklı mekanizmayı barındırmaktadır. Endotel disfonksiyonu inflamatuvar süreçte ve aşırı OxLDL varlığında daha fazla artmaktadır. Bu durumda, EC'ler koruyucu fenotiplerini değiştirir, vazodilatasyon bozulur, eNOS enziminin aktivitesi ve NO sentezi azalırken, trombosit agregasyonu ve vazokonstrüktif etkilerde ise artış meydana gelmektedir. Ayrıca, hücre yüzey adezyon moleküllerindeki artışa bağlı olarak LDL'nin subendotelial alana geçişinde ve OxLDL modifikasyonunda artış olmaktadır (84, 85).

Endotel disfonksiyonu; oksidatif stres ve inflamatuvar süreçlerle ilişkilidir. NO miktarı, EC'lerde vasküler homeostazın sürdürülmesinde çok önemlidir. NO sentezinin azalması ile pro-inflamatuvar sitokinler ve ROS'un artışı gerçekleşmektedir (35, 86). NO ve OxLDL eş zamanlı olarak vasküler endotel hücrelerde koruyucu ve patojenik etkileri teşvik eden önemli biyobelirteçlerdir (83). Vasküler EC'de NO ve OxLDL'nin karşılaştırılması Şekil-12'de gösterilmiştir.



Şekil 12. Vasküler EC'de NO ve OxLDL'nin karşılaştırılması (Gradinaru'dan, 83)

Endotel hücre aktivasyonu ile dolaşımdaki LDL'nin subendotelial alana geçişi artmaktadır. Bunu adezyon moleküllerin ekspresyonu, monosit ve lökositlerin endotele yapışması ve intimaya göçü ile makrofajlara farklılaşmaları izlemektedir. Makrofajların yüzeyindeki SR-AI/II, SR-BI, CD36 ve LOX-1 reseptörlerinde artış olmaktadır. Makrofajlar; LDL oksidasyon ürünleri, SMC ve kolesterol birikintilerini alarak köpük hücrelere dönüşürler. Sonuç olarak, ateroskleroz patogenezinin gelişimine

katkı sağlarlar (65). EC'ler, endotelyumun bariyer bütünlüğünün korunmasında görevlidir. Bariyer bütünlüğü, EC'lerin yüzeyindeki mikro yapılar olan glikokaliksler tarafından düzenlenmektedir. Proteoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşan endotelial glikokaliksler, vasküler fonksiyonun düzenlenmesinde birçok plazma proteinini bağlamaktadır. OxLDL'ler; EC'lerin glikokaliks kalınlığını azaltarak bariyer bütünlüğünün bozulmasına ve EC'lerde aşırı geçirgenliğe neden olurlar. OxLDL, endotel disfonksiyonunu teşvik ederek ve vasküler bozukluklara yol açarak pro-aterojenik etki göstermektedir (65, 84).

2.9. Aterosklerotik Sürecin Gelişim Hipotezleri

Aterosklerotik süreci açıklamaya yönelik birçok hipotez ileri sürülmüştür. Bunlar arasında en çok kabul görenler aşağıda özetlenmiştir.

2.9.1. Hasara Cevap Hipotezi

Bu hipotez ilk olarak endotel hasarı ile başlamaktadır. LDL-K, monositler ve çeşitli inflamatuvar hücreler intima da birikmeye başlarlar. Ayrıca NO üretiminin azalması sonucu, OxLDL ile trombosit agregasyonunun artışı, vazokonstriksiyon/vazodilatasyon dengesinin bozulması ve hücresel permeabilitenin artışı ile endotel disfonksiyonu görülmektedir. Hasarlı endotel hücreler, çeşitli adezyon moleküllerinin salınımına neden olurlar ve monositler makrofajlara dönüşürler. Makrofajlar; OxLDL ve çeşitli reseptörler ile köpük hücrelerine dönüşerek aterosklerotik lezyon gelişimine katkı sağlarlar. Hasara cevap hipotezi, ateroskleroz gelişimde endotel disfonksiyonunu daha çok öne çıkarmaktadır (87, 88).

2.9.2. İnflamasyon Hipotezi

İnflamasyon hipotezi aterogenezin neredeyse tüm aşamalarında rol oynamaktadır. İnflamasyona; endotel disfonksiyonu, lipoprotein metabolizmasının farklılaşması, shear stres, ROS ve serbest radikallerin artışı, hipertansiyon, diyabet, genetik modifikasyonlar, yüksek homosistein seviyesi, mikroorganizmalar ve virüsler gibi birçok faktör etki etmektedir. Özellikle de inflamasyonda bu faktörlerin çoğunun bir arada olması bu hipotezi önemli kılmaktadır (89).

İnflamasyon; pro-inflamatuvar sitokinler, adezyon molekülleri, ROS, kemokinler, OxLDL ve çeşitli sinyal yolları ile başlamaktadır (90). Hasar sonrası vasküler endotel hücreleri aktive olur ve çeşitli inflamatuvar moleküllerin (MCP-1, IL-

2, VCAM-1, ICAM-1, E/P-selektin) üretilmesini sağlarlar. Bu moleküller aracılığıyla lenfosit ve monosit gibi bağışıklık hücreleri bir araya gelirler ve vasküler düz kas hücreleri (VSMC)'ne bağlanarak vasküler alana geçerler ve inflamasyonu başlatırlar. İntima tabakasında; lipidlerin birikimi, inflamatuvar hücrelerin göçü, monositlerin makrofajlara farklılaşması, makrofajların OxLDL ve çöpçü reseptörleri (CD36, SR-AI/BI) alarak köpük hücrelere dönüşümü sonucu oluşan aterosklerotik lezyon hasarı inflamasyon hipotezini açıklamaktadır (29, 91).

2.9.3. Oksidatif Modifikasyon Hipotezi

Oksidatif modifikasyon, aterogeneizde çoğunlukla LDL üzerinden gerçekleşmekte olup, LDL'nin oksidatif modifikasyonu ateroskleroz patogenezinde önemlidir. LDL; hava kirliliği, sigara kullanımı, enfeksiyon, hipertansiyon, diyabet ve genetik yatkınlık gibi birçok faktör ile kolayca modifiye olmaktadır. LDL'nin NOX, LOX, XO, MPO ve eNOS gibi enzimlerle modifikasyonu sonucu boyutu ve fizikokimyasal özellikleri değişerek OxLDL'ye dönüşmektedir (92). LDL'nin oksidatif modifikasyonunda, makrofajlar çöpçü reseptörler aracılığıyla LDL alınımını artırır. Hücre içi kolesterol artışı gerçekleşir, fakat down regülasyon gerçekleşmez. Bu durum köpük hücre oluşumunun doğal LDL'ler yerine OxLDL'ler üzerinden meydana geldiğini göstermektedir (50). OxLDL; SR-AI/II/BI, CD36 ve LOX-1 gibi reseptörlere bağlanabilmektedir. Ayrıca, LOX-1'in vasküler EC'ler üzerindeki ekspresyonunu ve aktivasyonunu da artırır. OxLDL; VSMC'lerin, monositlerin ve fibroblastların büyümesini ve yer değiştirmesini de sağlar. Aşırı OxLDL miktarı ROS üretimi ve inflamasyon artışını teşvik etmektedir (65). OxLDL'nin makrofajlar ile etkileşimi sonucu köpük hücre ve yağlı çizgilerin gelişiminde artış olmaktadır. Bu süreci endotel disfonksiyonu, trombosit aktivasyonu ve aterosklerotik plak gelişimi izlemektedir (91-93).

2.9.4. Lipit Hipotezi

Lipit hipotezi, ilk olarak Goldstein ve Brown'un ailesel hiperkolesterolemi ile ilişkili kusurlu geni keşfetmeleri ile başlamıştır. Hastaların deri fibroblastlarında hidroksimetil glutaril-CoA (HMG-CoA)'nın düzensizliği, LDL tarafından normal geri alım düzenlemesinde duyarsızlığa yol açarak, bu hücrelerde HMG-CoA aktivitesinin baskılanmasına ve düşük LDL seviyelerine neden olduğu görülmüştür. Ayrıca, reseptör eksikliğinden dolayı aşırı kolesterol üretimi ve LDL-K konsantrasyonun 800-1000

mg/dL'ye kadar yükseldiği görülmüştür. Bu hipotezin oluşturulması ve geliştirilmesinde katkılar sunan Goldstein ve Brown 1985 yılında Nobel Fizyoloji ve Tıp ödülüne layık görülmüştür. Bu hipotez ile dolaşımda LDL-K konsantrasyonunda artış olduğunda, arterlerde lipit birikimi ve aterosklerotik sürecin gelişiminin arttığı belirtilmiştir (58, 94, 95).

2.10. OxLDL'nin Aterosklerotik Sürecin Gelişimine Etkileri

Aterosklerotik süreç gelişiminde LDL, oksidatif modifikasyon sonucu aterojenik hale gelmektedir (71, 96). ROS'lar, LDL oksidasyonunda ve arterlerde NOX, XO, fosfolipaz, MPO, eNOS ve iyon katalizleri gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla reaktif türlerin oluşumunda önemli rollere sahiptir (13, 97). LDL oksidasyonunun başlangıcı, LDL'ler tarafından taşınan α - tokoferol ve karotenoidler gibi antioksidanların kaybıyla bağlantılıdır ve bunların gerçekleştirildiği mekanizmalardan bağımsız olarak bozulma sürecini etkilerler (98). Bu durumu hidroperoksitlere oksitlenen çoğunluğu araşidonik ve linoleik asitlerin oluşturduğu PUFA'ların parçalanması takip etmektedir (99). Ayrıca, LDL'nin temel proteini olan ApoB100 de oksidatif ortamda farklı modifikasyonlara uğrayabilmektedir. Örneğin, lipit oksidasyonu sonucu oluşan aldehit türevleri, ApoB100'deki lizin kalıntıları ile reaksiyona girerek molekül içi ve moleküller arası kovalent bağlantılar oluştururlar (100). Bu modifikasyonlar sonucu LDL reseptörlerini tanıyamaz ve kontrolsüz bir şekilde LDL partiküllerinin subendotelyal alana geçişinde artış gerçekleşir. LDL oksidasyon seviyesine bağlı olarak LDL'ler minimum modifiye LDL (MmLDL) veya yoğun oksitlenmiş LDL (OxLDL) olarak sınıflandırılır. MmLDL'ler kimyasal olarak modifiye edilmemiş LDL'lerden farklıdır, fakat yine de LDLR tarafından tanınabilir ve hücre içine alınabilirler (29, 101). Bu modifiye lipitler EC ve makrofajlarda pro-inflamatuar bir cevap oluşturabilirler. Ayrıca, LDL'ler modifiye edildiklerinde kendi reseptörleri tarafından tanınmazken, çöpçü reseptörler tarafından tanınmaya devam etmektedirler (102).

ApoB100'ün oksidatif modifikasyonu ile LDLR'ye karşı afinite eksikliği olurken, çöpçü reseptöre karşı ise afinite artmaktadır. Ayrıca, OxLDL'ler proteoglikan retansiyonundan kaçabilirler, dolayısıyla çöpçü reseptörleri tarafından düzenlenmemiş alımlarını tercih ederler (29). LDL, reaktif türlerin birincil hedefleri olup lipit peroksidasyonu, PUFA'ların fosfolipit ve kolesterol esteri kısımlarının

peroksidasyonunu içermektedir. Bu işlem sonucu, Schiff-bazlı lizin kalıntısı ile bağlantılı olarak ApoB, fosfatidilserin, fosfatidiletanolamin, MDA ve 4-hidroksinonenal gibi daha reaktif aldehit ürünleri ve metabolitlerin üretimi gerçekleşmektedir (15, 103).

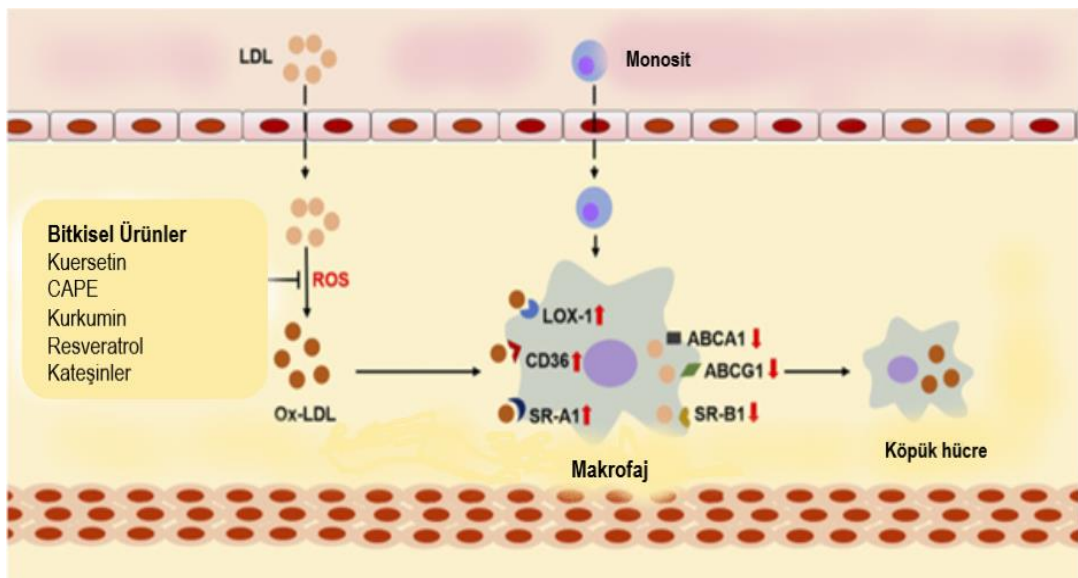
OxLDL'nin oksitlenmiş başlıca bileşenleri; CE 18:2 hidroperoksit, CE 18:2 hidroksit, fosfatidilkolin hidroperoksit, oksitlenmiş ApoB, oksitlenmiş sfingomyelin ve 7-ketokolesterolden oluşmaktadır (15, 104). OxLDL'nin plazma seviyesi, KVH'nin artışında pozitif etkiye sahip olup bu durum OxLDL'nin KVH'de önemli bir biyobelirteç olduğunu göstermektedir (68, 71). OxLDL; endotel disfonksiyonu, monosit aktivasyonu, köpük hücre oluşumu, SMC göçü ve proliferasyonu, trombosit adezyonu ve agregasyonu, plak gelişiminde artış, plak yırtılması ve tromboz gelişimine kadar tüm aterosklerotik süreçlerde etkilidir (15, 105, 106). LDL, hiperlipidemik ve inflamatuvar koşullarda intimada birikerek oksidasyonu başlatır. Endoteldeki NO azalınca MCP-1 sentezi artmaktadır. MCP-1, integrin ve adresin gibi kemotaktik maddelerin salınımını ve monositlerin göçünü artırmaktadır. Monosit yapısındaki integrinler adezyon moleküllerle güçlü olarak etkileşirken, adresinler ise selektin molekülleriyle zayıf etkileşir ve monositlerin subintimal alana geçişini hızlandırmaktadırlar (107).

EC, SMC ve makrofajlardan salınan süperoksit radikalleri ile oluşan oksidatif ortam, LDL'nin OxLDL'ye modifikasyonuna neden olur. Ayrıca, monositler serbest radikal üretimini artırarak LDL'nin oksidasyonuna neden olmaktadır. OxLDL, subendotelyumda aterosklerotik olayları başlatarak LOX-1 ve diğer çöpçü reseptörler ile endoteli aktive etmektedir. Büyüme faktörleri SMC'lerin çoğalmasına ve hücre dışı matriksin oluşumuna yardımcı olmaktadır. Trombosit yapışması ve birikmesinde OxLDL ayrıca, kısmen yırtılma eğilimli bir trombüsün gelişimine neden olduğu belirtilmiştir (15, 104).

Trombositler, OxLDL'nin katılımıyla aterosklerotik sürecin gelişiminde önemli roller oynarlar. OxLDL, trombositlerin yüzeyindeki reseptörleri ve trozin kinaz (Src ve Rho gibi) enzimlerini aktive ederek trombositlerin hızlı bir şekilde aktivasyonunu sağlayabilir (108). Trombositlere, OxLDL'nin katılmasıyla vasküler alanda aktivasyonun arttığı ve fizyolojik agonistlerin etkisinin güçlendiği belirtilmiştir. Ancak, reseptörler ve tirozin/Rho kinaz gibi sinyal enzimleri dahil gerçekleşen aterosklerotik

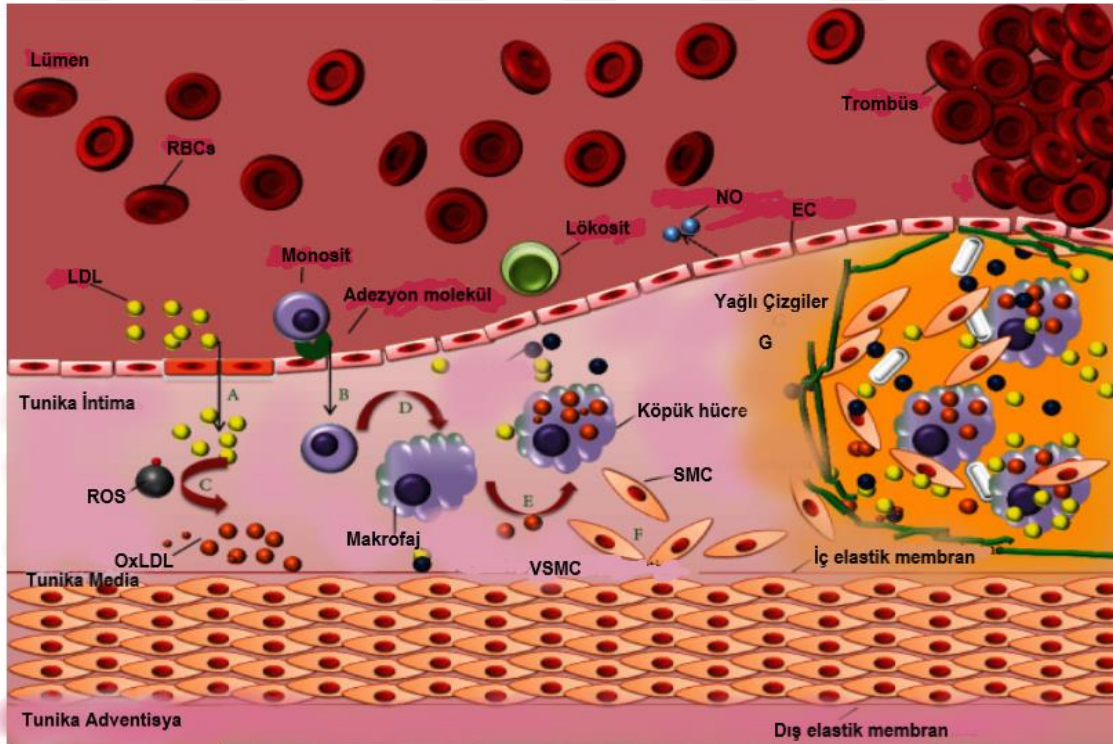
süreçlerin mekanizmaları belirsizdir. Trombosit yüzey reseptörü CD36, trombosit yüzey proteini P-selektin ve LOX-1 gibi faktörler trombositlerin aktivasyonunda artışa yol açarlar (15). Sonuç olarak, oksidatif strese maruz kalındığında LDL'nin oksidatif modifikasyonu ile aşırı OxLDL oluşumu gerçekleşir. Bu durum makrofajların OxLDL'leri içine almasına ve köpük hücrelere dönüşümüne yol açar. Ayrıca, OxLDL; VSMC göçü ve proliferasyonu ile trombositleri aktive eder ve her iki süreçte aterosklerozun gelişimine neden olmaktadır. Ancak, LDL'nin oksidatif modifikasyonu önlenirse aterosklerotik sürecin gelişimi yavaşlatılabilir veya durdurulabilir (15, 109).

Çöpçü reseptörleri, OxLDL'nin makrofajlara girişlerini kolaylaştıran güçlü ligantlar olarak kullanılmaktadır (15, 110). LDL, hasarlı endotelyumdan geçerek ROS'lar tarafından oksitlenmekte ve daha sonra makrofaj türevli monositlerle etkileşerek OxLDL'ye dönüşmektedir. OxLDL, daha fazla monosit ve inflamatuvar hücrenin oluşumunu artırmaktadır. Monositler, M-CSF ile makrofajlara dönüşürler. Makrofajların yüzeyindeki CD36, SR-AI ve LOX-1 reseptörleri artarken kolesterolün ters yönlü taşınmasına aracılık eden ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı protein (ABCA1/GI) ve SR-BI reseptörleri ise azalmaktadır. Sonuçta makrofajlarda kolesterol miktarı artmaktadır. Makrofajlar, kolesterol sentez ve yıkım metabolizmasına sahip olmadıkları için down regülasyon gerçekleşmez ve OxLDL'nin birikimi sonucu sabun köpüğüne benzeyen köpük hücreler oluşur (13, 113). OxLDL'nin kolesterol metabolizması ve köpük hücre oluşumu Şekil-13'te gösterilmiştir.



Şekil 13. OxLDL'nin kolesterol metabolizma ve köpük hücre oluşumu (Duan'dan,64)

Köpük hücreleri; sitokinler, SMC'ler, OxLDL'ler ve tüm inflamatuvar ajanları içine alarak yağlı çizgilenmeler ile tunika intimada lümeneye doğru geniş bir lezyon alanı oluşturur. Lezyon bir süre sonra ekstraselüler matriks bileşikleri, SMC'ler, büyüme faktörleri ve prokoagülanları biriktirerek bir plağa dönüşmektedir. Plak, hemen üstündeki endotel direncini kaybedene kadar endotel altında sabit kalmaktadır. Plak direncini kaybedince inflamatuvar ajanlar ortama yayılırlar ve hidrolitik enzimler bağ dokusuna zarar vererek tromboz gelişimine neden olurlar. Ayrıca, lümen içerisinde agregasyon gelişir ve koagülasyon faktörleri arterlerin tıkanmasına neden olurlar. Eğer lümen temizlenmez ise önce iskemi sonrasında nekroza doğru ilerleme gerçekleşir (14, 15, 114, 115). Aterosklerotik sürecin gelişim evreleri Şekil-14'te gösterilmiştir.



Şekil 14. Aterosklerotik sürecin gelişim evreleri (Khatana'dan, 15)

2.11. Aterojenik Diyet ve Obezite

Aterojenik diyet, toplam kalorinin en az %35-40'ını içeren hem doymuş hem de doymamış yağlardan oluşan bir diyet olarak ifade edilmektedir (116). Kullanılan yağ çeşitleri doymuş ve doymamış (PUFA ve MUFA) yağ asitlerinden oluşmaktadır. Çoğunlukla doymuş yağ asiti oranı yüksek diyetler kullanılmakta ve diyetteki yağdan

gelen enerji yüzdesi %30'un üzerine çıktığında deney hayvanlarında obezite gelişmeye başlamaktadır (117, 118).

Aterojenik diyet ile kronik inflamasyon ve birçok sağlık sorunu gelişmektedir. İnsan ve hayvanlarda pro-inflamatuar sitokinlerin (CRP, IL-6, TNF- α) ve LDL-K'nin artışı ile oksidatif stres gelişmektedir. Bu süreç daha sonra obezite, KVH, metabolik sendrom, ateroskleroz, diyabet gibi patolojik durumlara ve bağışıklık fonksiyonlarının bozulmasına yol açmaktadır (119). Aterojenik diyet, kolesterol esterlerinin aşırı artmasına yol açar ve esterleşme reaksiyonlarını bozarak endotel hücrelere zarar verir. Ayrıca, apoptotik yolları aktive eden kolesterol kristalleri oluşturarak aterosklerotik plak gelişimini hızlandırmaktadır (120). Aterojenik diyetlere aynı zamanda yüksek yağlı diyetle denir. Kalpteki arterlerde monositlerin birikmesi, LDL'nin oksidasyonu ve endotel disfonksiyonu sonucu aterosklerotik süreç gelişmektedir (121). Aterojenik diyetlerin obezite gelişimiyle doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (118).

Obezite, KVH için önemli risk faktörü olup enerji alımı ile harcanması arasındaki dengesizlik olarak tarif edilmektedir. Yüksek kalorili ve yağlı diyetler ile düşük lifli diyetler obezite ve KVH'yi artırmaktadır (122). Canlılarda diyet süresi, diyet yağının türü ve hayvan ırkına bağlı olarak farklı metabolik değişiklikler gözlenmektedir (123).

Hayvan çalışmalarında aterojenik diyetle indüklenmiş obezite modelleri daha çok tercih edilmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan diyet indüklü obezite çalışmalarında, besinlerin obezite gelişimine olan etkileri önemlidir. Bu çalışmalarda, yüksek yağ içeriği olan diyetlerin obeziteye yol açabileceği bilinmektedir. Örneğin, fareler aterojenik diyet ile beslendiklerinde obez olma eğilimleri fazla olup glukoz toleransı, insülin direnci, TG değerleri ve diğer parametrelerde türe bağlı değişiklikler görülmektedir (124). Aterojenik diyetle beslenen fareler standart yemle beslenen fareler ile karşılaştırıldığında bu farelerde obezite, hiperglisemi, hiperinsülinemi, hipertrigliseridemi ve insülin direnci daha fazla görülmektedir (116).

2.12. ApoE^{-/-} Fare Modeli

Genetiği değiştirilmiş hayvan modelleri, ateroskleroz dahil birçok hastalığın tedavisinde önemli ilerlemelere yardımcı olmaktadır (125). ASKVH'nin patogenezinin belirlenmesinde hayvan modelleri önemli bir yere sahiptir. Çünkü aterosklerozun başlama, ilerleme ve tromboz oluşumu gibi tüm aşamalarında deneyler

yapılabilmektedir. Aterosklerotik risk faktörleri hayvanlar üzerinde kolaylıkla oluşturulabilmektedir. İnsan anatomisine ve patofizyolojisine benzeyen, düşük maliyetli, kullanımı kolay, üreme sorunu olmayan ve genetik özellikleri belirlenmiş deneysel hayvan türü fare modelleridir (124-126).

Normal farelerdeki plazma kolesterolünün çoğu HDL ile taşınır ve bu yüzden düşük kolesterol seviyelerine sahiptirler. Ters kolesterol taşınımı yolu ile ateroskleroza korunurlar. Ayrıca, normal farelerde kolesterol ester transfer proteini (CETP) yoktur. CETP, kolesterol esterinin HDL'den VLDL'ye ve TG'nin VLDL'den HDL'ye transferine yardımcı olmaktadır. İnsanlarda CETP ekspresyonu sırasıyla VLDL-K ve LDL-K seviyelerinde artışa yol açmaktadır (126).

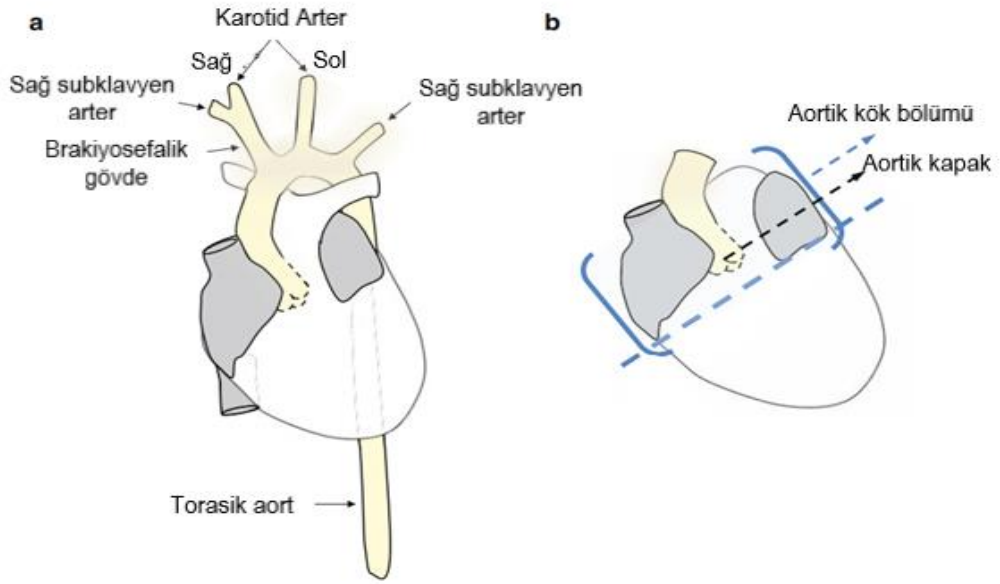
Diyetle veya endojen olarak alınan lipitlerin lipoproteinlerle organ ve dokulara taşınmasında apolipoproteinler etkin rol oynamaktadırlar. Apolipoproteinler, lipoproteinlerin plazmadaki çözünürlüklerinde, kolesterol ve lipoproteinlerin hücre içine alınmasında ve hücre içi kolesterol homeostazında etkilidirler. Apolipoproteinler içerisinde ApoE; LDL reseptörleri için ligant olarak kullanılmakta olup kolesterol ve diğer lipitlerin taşınmasına yardımcı olmaktadır. Karaciğer ve beyinde sentezlenen bir glikoprotein olup 34 kDa'lık bir moleküler ağırlığına sahiptir. Hücre yüzey lipoprotein reseptörlerinin ligantı olup şilomikronların, VLDL ve VLDL kalıntılarının (LDL reseptörü ve LDL reseptörü ile ilişkili protein) hepatik reseptörlere bağlanmasına yardımcı olmaktadır. HDL tarafından taşınan kolesterolün hücrelere geri taşınmasında rol oynar ve aterosklerotik plak gelişimini azaltabilir. SMC göçünü engelleyerek KVH riskini azaltmada önemli bir faktördür. Aynı zamanda kolesterol homeostazında, kolesterolün dokularda yeniden düzenlenmesinde, immünoregülasyonda, diyet ürünlerinin emilimi ve kolesterolün safra yoluyla atılımında da görevli olduğu belirtilmiştir (127-130).

Normal farelerin lipit profilleri değiştiği için ateroskleroz gelişimine dirençlidirler. Bu yüzden normal farelere genetik manipülasyon yapılmalıdır. Deneysel ateroskleroz araştırmalarında, insanlara metabolik ve patofizyolojik olarak benzeyen ApoE^{-/-} fareleri KVH çalışmaları için iyi bir model olmaktadır. Bu hayvanların plazmalarında ApoE proteini yoktur ve lipoproteinlerin temizlenmesinde bozulmalar olmaktadır. Bu modelde, ApoE proteinini kodlayan genin ekson ve intron 3 parçasının yerine homolog rekombinasyon yoluyla neomisin direnç geni yerleştirilerek

embriyonik kök hücreler inaktif edilmiştir (128, 131, 132).

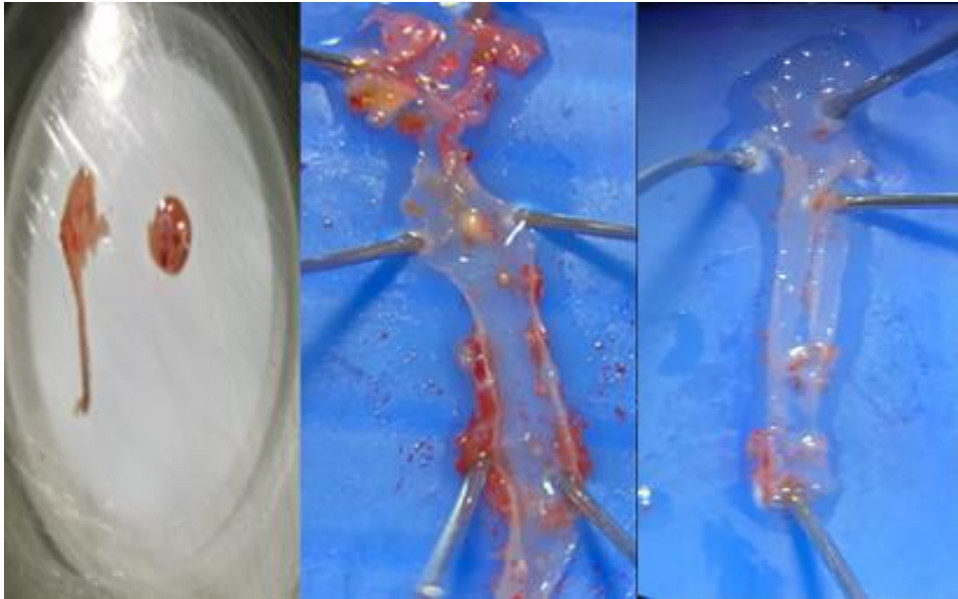
ApoE; inflamasyon, oksidasyon, SMC proliferasyonu ve göçü üzerine etkisi fazla olan bir proteindir (133). ApoE farelerin embriyonik kök hücrelerinde, homolog rekombinasyon yöntemiyle ApoE geni silinmiştir. Bu farelerin fiziksel özellikleri diğer farelerle aynıdır, fakat lipoprotein profillerinde farklılıklar vardır. ApoE glikoproteini eksikliğinde yüksek yağlı veya aterojenik bir diyetle beslenildiğinde plazma total kolesterol seviyelerinde aşırı artış olmaktadır. Ayrıca, VLDL partiküllerinin aşırı artışından dolayı lipoproteinlerin plazmadan temizlenme kabiliyetleri bozulmaktadır (22).

ApoE^{-/-} farelerdeki plazma kolesterol düzeyleri hayvanın yaşı veya cinsiyetinden etkilenmemektedir (134). ApoE^{-/-} fareler, gecikmiş lipoprotein klirensi gösterirler ve normal diyetle beslendiklerinde bile dislipoproteinemi, hiperkolesterolemi ve aterosklerotik lezyonlar gelişmektedir (135). Bu tür farelerde aterosklerotik lezyon gelişiminin tüm aşamaları görülmektedir (136). Normal bir diyetle 6 veya 8. haftada köpük hücre gelişimi başlamakta olup 15 veya 20. haftalarda aterosklerotik plak oluşumu gözlenmektedir. Ancak, fareler yüksek yağlı bir diyetle beslendiklerinde bu süreler daha da kısalmaktadır. ApoE^{-/-} farelerde vasküler dallanma noktalarında shear stresten dolayı aterosklerotik lezyonların gelişme olasılığı yüksek olmaktadır. Lezyonların oluşum yerleri daha çok aortik kök ve aortik arkların brakiosefalik, sol karotis ve subklavyen arterlerindeki dallanma noktalarında gerçekleşmektedir (134). Aortik diseksiyon kesiti ve aortik kök bölümü Şekil-15'te gösterilmiştir.



Şekil 15. (a) Aortik diseksiyon kesiti (b) Aortik kök bölümü (Andrés-Manzano'dan, 137)

ApoE^{-/-} fare modellerinde, ateroskleroz patogenezinin incelenmesi yaygın olarak kullanılmaktadır (137). ApoE^{-/-} ve C57BL-6J farelerin aortik ark dokularının Oil red O (ORO) ile boyanmış diseksiyon kesitleri sırasıyla Resim-1'de gösterilmiştir.



Resim 1. ApoE^{-/-} ve C57BL-6J farelerin aortik ark dokularının ORO ile boyanmış diseksiyon kesiti

2.13. Propolis

Propolis, bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından bitkilerin çiçek, yaprak ve tomurcuklarından toplanan flavonoid ve fenolik bileşiklerce zengin içeriğe sahip, toplandığı bitki türüne göre rengi değişebilen ve yoğun aromatik kokuya sahip reçineli bir üründür (18, 138). Katı propolis Resim-2’de gösterilmiştir.



Resim 2. Katı propolis (Kosolovskyy’den, 139)

Propolisin terim olarak anlamı pro- (ön, öncü veya geçiş) ve -polis (toplum veya şehir) kelimelerinden türetilmiştir. Arılar propolisi kovandaki çatlakların kapatılmasında, kovanın iç yüzeyinin sıcaklık ve neminin dengelenmesinde, böcek ve haşerelerin istilasının önlenmesinde, çeşitli bakteri ve mantarların istilasının engellenmesinde koruyucu madde olarak kullanırlar (140- 145).

Tıbbi ve tedavi edici özelliklerinden dolayı tarihi geçmişi eski Mısırlılar, Yunanlılar ve Romalıları dayandırmakta olup mumyalama işleminde, cilt yaralarına, apselere ve tümörlere karşı korumada kullanıldığı belirtilmiştir. Orta çağda bitkisel ilaç olarak kullanılmakta olup günümüzde ise yapısındaki kimyasal bileşiklerin tanımlanması ile araştırmalar artmıştır (146, 147).

Propolisin fizikokimyasal yapısı, lipofilik olup soğuğa maruz kaldığında sert ve kırılğan yapıda, sıcakta ise yumuşak ve yapışkan bir yapıda olmaktadır. Arılar propolis ham maddelerini bitkilerin farklı kısımlarından toplamaktadırlar. Propolis türleri; bitki kaynaklarına, kimyasal bileşiklerine, kullanım süresine, mevsimlere, arı türlerine ve

coğrafi konumlara bağılı olarak yeşil, turuncu, gri ve kırmızıdan kahverengiye değişen çeşitli renklere sahiptir (144). Propolisin yapısında; flavonoidler, terpenler, fenoller, steroidler, hidrokarbonlar ile çeşitli amino asit ve mineraller olmak üzere 500'den fazla kimyasal bileşik bulunmaktadır. Propolisin yaklaşık %50'sini reçine ve balzam, geri kalan kısmını mumlar, uçucu ve aromatik yağlar, polen ve safsızlık içeren kompleks yapılar oluşturmaktadır (20, 21, 146).

2.13.1. Propolisin Biyokimyasal ve Terapötik Etkileri

Propolisin modern ve geleneksel tıpta yaygın olarak kullanımından dolayı biyokimyasal bileşimine ve biyoaktivitesine ilgi artmaktadır. Propolis, doğal ve takviye edici bir besin olarak dikkat çekmektedir. Propolis ve ekstraktlarının biyolojik aktivitesi yüksek olduğundan dolayı metabolik bozukluklar, oksidatif strese bağılı kronik hastalıklar ve kansere karşı korunmada kullanımı artmaktadır (144, 146, 148, 149).

Propolis ve bileşenlerinin antimikrobiyal (antibakteriyel, antiviral, antifungal), anti-inflamatuar, antioksidatif, anti-aterojenik, antikarsinojenik, immünomodülatör ve antiproliferatif gibi çeşitli etkilere sahip oldukları belirlenmiş ve terapötik uygulamalarda önemli bir yere sahip olduğu belirtilmiştir (150-152). Propolisin türü ve kökeninden bağımsız olarak uygun ekstraksiyon yöntemi ile propolis içindeki bileşikler ortaya çıkararak biyolojik aktivitesi artırılabilir. Ancak, kullanılacak yöntem hedeflenen bileşiklere ve uygulama alanına bağılı olarak değişiklik gösterdiği belirtilmiştir (153).

Serbest radikaller, ROS ve çeşitli inflamatuvar ajanlar biyolojik sistemlerde oksidatif stresin ana nedenleri arasındadır. Propolisin bu tür ajanlara karşı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaları yapılmakta olup moleküler mekanizması tam olarak belirlenememiştir. Propolis, oksidatif stres belirteçlerinden lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'yı azaltırken serbest radikal temizleyici süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerini artırarak aterosklerotik sürecin gelişimini önleyici etki gösterdiği belirtilmiştir. Propolisin yapısındaki önemli aktif bileşenlerden biri olan kafeik asit fenetil esteri (CAPE), güçlü anti-inflamatuar, antioksidan, antikanser ve nöroprotektif özelliklerinden dolayı sağlık alanında önemli bir bileşik olarak kabul edilmektedir. CAPE; nazofaringeal karsinom hücrelerin proliferasyonunu ve metastazını inhibe ettiği, radyosensitivitesini artırdığı, kemoterapi ve radyoterapi ile sinerjik etki gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, CAPE'nin kolajenle

uyarılan trombosit agregasyonunu önemli ölçüde azalttığı ve oksidatif strese karşı KVS'de koruyucu etkiler gösterdiği belirtilmiştir (154-157). Propolisin kimyasal bileşikler; bağışıklık hücrelerinin temel fonksiyonunun düzenlenmesinde, T hücrelerindeki bağışıklık tepkisinin ve NF- κ B aktivasyonunun aracılık ettiği sitokinlerin azaltılmasında güçlü anti-inflamatuar özelliklere sahip oldukları belirtilmiştir. CAPE, T hücrelerinde hem DNA sentezini hem de inflammatuar gelişimi düzenlemektedir. Ayrıca hücre büyümesi, doku onarımı ve immün cevapta rol oynayan transforme edici büyüme faktör- β 1 (TGF- β 1) oluşumunu desteklediği, NF- κ B aktivasyonunun seçici inhibitörü olarak görev yaptığı ve TNF- α da dahil olmak üzere birçok sitokinin inhisyonunda etkili olduğu belirtilmiştir. Apigenin ve galangin ise TNF- α 'nın yapısındaki mRNA düzeylerini azalttıkları ve anti-inflamatuar özelliklere sahip oldukları belirtilmiştir. (158, 159).

Propolisten ekstrakte edilen flavonoidler siklooksijenaz ve prostaglandin biyosentezinin inhibisyonunda, inflammatuar medyatörlerin ekspresyonunun azaltılmasında, serbest radikal süpürücü ve immünosüpresif aktivitelerinin artırılmasında etkili oldukları belirtilmiştir (144, 160). Propolisin antioksidan, anti-inflamatuar ve immünomodülatör aktiviteleri ile *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda nöroprotektif özellikler gösterdiği aynı zamanda nörolojik hastalıklarda oksidatif stresin ve nöro-inflamasyonun önlenmesi veya tedavisinde etkili olabileceği belirtilmiştir. Beyin kaynaklı nörotrofik faktör ve aktif olarak düzenlenmiş hücre iskeleti ile ilişkili protein seviyesini artırarak nöronal hücreleri nörodejeneratif hasardan koruduğu belirtilmiştir (161, 162).

Propolis ekstraktlarının diyabet hastalarında glukoz metabolizması, insülin direnci, lipid profili, böbrek ve karaciğer fonksiyonları ile inflammatuar biyobelirteçler üzerindeki etkileri incelendiğinde kan glukozu, insülin direnci ve inflammatuar sitokinleri azaltmada, HDL-K konsantrasyonlarını yükseltmede, karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluklarını önlemede etkili oldukları belirtilmiştir (163, 164). Diyabetik sıçanların karaciğerlerinde propolisin koruyucu etkileri olduğu görülmüş ve diyabetik durumlarda karaciğer fonksiyonlarının düzenlenmesinde, oksidatif strese, inflamasyonda ve hepatositlerin apoptozunun baskılanmasında etkili olduğu belirtilmiştir (165).

Propolisin kardiyovasküler etkilerinin sıklıkla antioksidan, anti-inflamatuar,

immünomodulator, antihipertansif, anti-anjiyogenik ve anti-aterosklerotik etkileriyle ilişkili olduğu belirtilmektedir. Propolisin aktif bileşenleri, özellikle kuersetin, pinosembrin, krisin ve luteolin gibi fenolik bileşikler kalpte koruyucu etkilere sahiptirler. Fenolik bileşikler, propolisin antioksidan özellikleriyle ilişkili olan siklo-oksijenaz, ROS ve NO üretimlerini azaltmaktadır. Propolisin sitotoksik radikal temizleyici etkisiyle oksidatif strese karşı kardiyoprotektif aktivitesi ve antioksidan etkisi görülmüştür. Ayrıca, flavonoidlerin patolojik kalp hipertrofisi ve kalp rahatsızlıklarının ilerleyişini durdurucu etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (166- 168).

Propolis; TG, VLDL-K ve LDL-K seviyelerinde düşüşe HDL-K’de ise artışa neden olduğu ve aterojenik diyetle beslenen sıçanlarda lipit birikimini azaltarak adipositlerdeki peroksizom proliferatörüyle aktiveleştirilen reseptör gama (PPAR- γ)’nın baskılanmasına neden olduğu belirtilmiştir. Böylece PPAR- γ , sterol düzenleyici element bağlayıcı protein-1C ve HMG-CoA gibi lipit metabolizması proteinlerinin düzenlenmesini sağlamaktadır (169). Propolis; HDL-K ve glutatyon seviyelerinde artışa, tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri seviyelerinde azalışa bağlı olarak antioksidan etki göstermektedir. Bu nedenle propolisin bir antioksidan ajan olarak kullanılabileceği ve KVH riskini azaltmaya yardımcı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, farklı hayvan modellerinde *in vitro* ve *in vivo* KVH riskini azaltıcı, böbrek fonksiyonlarını düzenleyici ve inflamasyonu durdurucu etkilerinin olduğu belirtilmiştir (170, 171). Propolisin sıçanlarda deneysel olarak indüklenen iskemiye karşı kardiyoprotektif etkisi, lipit peroksidasyonu inhibisyonu ile endojen antioksidan enzim aktivitesine katkı sağladığı görülmüştür (172).

Propolisin gastrointestinal bozukluğun tedavisinde etkisi incelenmiş ve irritabl bağırsak sendromu hastalarını iyileştirdiği görülmüştür. Bu durumun nedeni olarak propoliste bulunan kuersetin glikozitlerinin visseral motor tepkisini azaltarak ağrı eşiği basıncını artırmasının etkili olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca propolisin kolon hasarını azalttığı, kolonik inflamasyonu baskıladığı, mukozal ve mün salgı düzeylerini artırdığı belirtilmiştir (173). Propolis mikroorganizmalara doğrudan etki ederek membran bütünlüğünü bozucu ve bağışıklık sistemini uyarıcı antimikrobiyal aktivite göstermektedir. Ayrıca, antimikrobiyal ilaçların aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (170). Propolisin yapısındaki pinosembrin flavonoidinin ApoE^{-/-} farelerde serum lipit seviyelerini azalttığı ve endotel disfonksiyonunu iyileştirdiği belirtilmiştir (174).

Propolis bileşiklerinin anti-alerjik ve anti-inflamatuar özelliklerinden dolayı bazofil ve mast hücrelerine karşı inhibitör etkilerine bağlı olarak astım'a karşı etkili olabileceği düşünülmüştür. Bu iki hücrenin alerjik inflamasyon reaksiyonlarında birincil efektör hücreler olduğu görülmüştür. Bir alerjen madde immünoglobulin E (IgE)'ye bağlandığında IgE reseptörleri çapraz bağlanır, böylece bazofilleri ve mast hücrelerini aktive ederek histamin gibi inflamatuvar medyatörlerin ve TNF-a gibi sitokinlerin salınımına neden olduğu belirtilmiştir (175, 176). Herpes simpleks virüsü, rinovirüs ve koronavirüs hastalığı 2019 (COVID-19) pandemisinde propolisin antiviral aktiviteler gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca, antiviral ilaçlarda nutrasötik ve farmasötik bileşen olarak kullanımı mevcuttur (177, 178). Propolis, antimikrobiyal özellikleri ile ağız hijyeninde, anti-anjiyogenik ve antiproliferatif özellikleri ile diş çürüklerinin engellenmesinde, ağız içi aftların ve yaraların tedavisinde ve diş eti iltihaplarının önlenmesinde de etkili doğal bir ürün olduğu belirtilmiştir (179).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Tez çalışması süresince laboratuvarında kullanılan cihaz ve malzemeler üretici firmaları ile Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihazlar ve malzemeler

Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Cerrahi Set	Tekno Cer
Çalkalayıcı İnkübatör	Nüve SL 350
Derin Dondurucu (-80°C)	Thermo Electrom Corporation
El Homojenizatörü	OMNI-Tissue Master 125
Hassas Terazı	Mettler Toledo AB204-S
Kan Tüpleri	BD Vacutainer
Mikropleyt	Greiner Bio-one
Manyetik Karıştırıcı	Thermal
Mikropleyt Okuyucu	Versa Max, Molecular Devices
Mikropleyt Yıkayıcısı	BioTek Elx50
Otoanalizör	Beckman Coulter Analyzer AU 5800
Otomatik Pipetler	Eppendorf
pH Metre	Hanna Instrument
Saf Su Arıtma Cihazı	Kros
Santrifüj	Eppendorf, Centrifuge 5810
Soğutmalı Santrifüj	Beckman-Coulter
Ultra Saf Su Cihazı	Purelab Elga
Vorteks	IKA Vortex, Genius 3

3.1.2. Kullanılan Ticari Kitler

Çalışmada kullanılan ticari kitler Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan ticari kitler

Ticari Kit	Üretici Firma	Ürün Kodu
Mouse OxLDL ELISA Kiti	FineTest	EM0400 (Wuhan, Çin)
Mouse LOX-1/OLR-1 ELISA Kiti	ThermoFisher	EM50RB (Waltham, Amerika)

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3’te gösterilmiştir.

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)

3.2. Yöntemler

Bu çalışmanın yürütülebilmesi için öncelikle KTÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na 2022/23 protokol numarası ile başvuru yapılarak etik kurul onayı alındı (Bkz. Ek 1. Etik Kurul Onayı). Çalışmanın deney hayvanları uygulamaları, KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Biyokimyasal analizler, KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda ve histolojik değerlendirmeler ise RTEÜ Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Bu tez çalışması KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TDK-2022-10451).

3.2.1. Sulu Propolis Ekstraktının Hazırlanışı

Propolis örnekleri, Türkiye'deki çeşitli bölgelerden toplanarak bir araya getirildi ve birbiriyle karıştırılarak katı toz haline dönüştürüldü. Hassas terazide propolis örneğinden 3 g tartılarak 100 mL'lik cam şişeye aktarıldı. Cam şişe içerisine 50 ml distile su eklenerek önce vorteks ile karıştırıldı, sonra da çalkalayıcı inkübatörde 60°C ve 150 rpm'de çözünmesi için 24 saat bekletildi. Daha sonra propolis ekstraktları süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek sırasıyla 0.45 ve 0.22 µm'lik filtrelerden geçirildi ve +4 °C'de karanlıkta saklandı.

3.2.2. Etanollü Propolis Ekstraktının Hazırlanışı

Propolis örnekleri Türkiye'deki çeşitli bölgelerden toplanarak bir araya getirildi ve birbiriyle karıştırılarak katı toz haline dönüştürüldü. Hassas terazide propolis örneğinden 3 g tartılarak 250 mL'lik cam şişeye aktarıldı. Cam şişe içerisine 100 ml %30'luk etanol eklenerek önce vorteks ile karıştırıldı, sonra da çalkalayıcı inkübatörde 60°C ve 150 rpm'de çözünmesi için 24 saat bekletildi. Daha sonra propolis ekstraktları süzgeç kağıdı yardımıyla süzülerek sırasıyla 0.45 ve 0.22 µm'lik filtrelerden geçirildi ve +4 °C'de karanlıkta saklandı.

3.2.3. Çalışma Grubu

KTÜ Cerrahi Uygulama Araştırma Merkezi'nden (Trabzon, Türkiye) satın alınan 6-8 haftalık ve 17-20 g ağırlığındaki C57BL-6J ve ApoE^{-/-} fareler, 22-23°C sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde *ad libitum* beslendi. Çalışmada kullanılacak hayvan sayısı G*Power (Kiel, Almanya) programı ile hesaplandı. Girilen etki büyüklüğü: 0.60, a- hatası: 0.05, Güç: 0.85, Gruptaki hayvan sayısı: 8 ve Toplam

örneklem büyüklüğü: 48 olarak bulundu. 16 adet C57BL-6J ve 32 adet ApoE^{-/-} erkek fareden oluşan 6 deney grubu oluşturuldu. Farelerin ağırlıkları çalışma süresince her dört haftada bir tartılarak kaydedildi (Tablo 4). Tez çalışmasında, Kontrol grubuna sadece Kontrol diyet verilirken diğer tüm gruplara Aterojenik diyet verildi (diyet içerikleri için Bkz. Ek 3 ve Ek 4) ve fareler 16 hafta kadar süre beslendikten sonra dekapitasyon yöntemiyle kurban edildi.

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	16 Hafta	
Sulu Propolis Ekstraktı (SPE)	ApoE ^{-/-}	Aterojenik Diyet	16 Hafta	Son 4 hafta her gün intraperitoneal (i.p) enjeksiyon ile 400 mg/kg SPE
Etanolü Propolis Ekstraktı (EPE)	ApoE ^{-/-}	Aterojenik Diyet	16 Hafta	Son 4 hafta her gün i.p enjeksiyon ile 200 mg/kg EPE
Etanol	ApoE ^{-/-}	Aterojenik Diyet	16 Hafta	Son 4 hafta her gün i.p enjeksiyon ile %30'lik Etanol

3.2.4. Deneysel Ateroskleroz Modelinin Oluşturulması

Model oluşturmada yüksek üreme oranı, düşük maliyet, genetik manipülasyonların ve deneysel işlemlerin hızlı ve verimli bir şekilde gerçekleştirilmesine uygun hayvan türü olarak fareler kullanılmaktadır. Ayrıca, aterosklerotik vasküler değişikliklerin araştırılması zaman almakta olup sonuçların hızlı bir şekilde değerlendirilmesi önemlidir. Normal fare modellerinde aterosklerotik sürecin gelişimi *in vivo* olarak insan metabolizmasına uygun bir sistem oluşturmada birçok sorun ortaya çıkarmaktadır. Bundan dolayı, dolaşım sisteminde LDL-K seviyelerinde hızlı artış olan transgenik fare modellerinin uygun olduğu görülmüştür. Biz de çalışmamızda, aterosklerotik sürecin tüm aşamalarının gözlemlendiği ve özel diyetlerle hızlandırılabilirdiği ApoE^{-/-} fare modelinin kullanılmasına karar verdik (180).

3.2.5. Numunelerin Toplanması

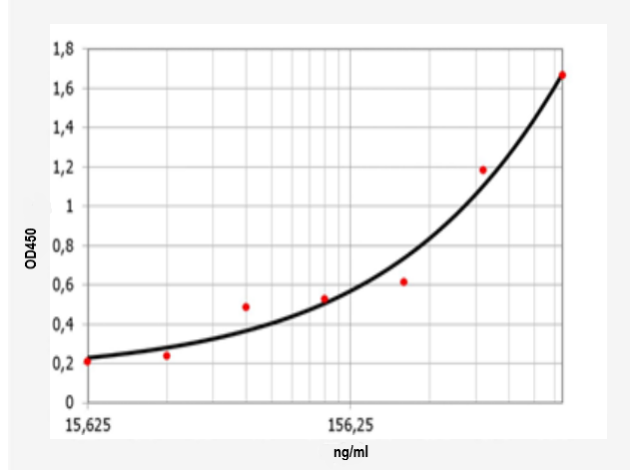
Fareler, 16 haftalık diyet sonunda dekapitasyon ile sakrifiye edildiler. Gövde kanları antikoagülsüz sarı kapaklı biyokimya tüplere alınarak 1800xg'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra alınan serum örnekleri -80°C'de saklandı. Kan akışı bittikten sonra farenin toraks bölgesi tamamen açılarak aort dokusu çıkarıldı. Aortun aortik kök ve aortik ark (sol subklaviyen arter, sol vertebral arter, sol karotid arter, sağ karotid arter, sağ vertebral arter, sağ subklaviyen arter) kısımları ayrıştırıldı. Dokuların yarısı biyokimyasal analizler için önce kuru buzda sonrasında -80°C'de saklanırken, diğer yarısı histolojik analizler için formaldehit solüsyonunda fiks edildi.

3.2.6. Serum Rutin Biyokimya Parametrelerinin Ölçümü

Serum TG ve TK düzeyleri KTÜ Farabi Hastanesi Klinik Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan otoanalizörlerde enzimatik kolorimetrik yöntemle ölçüldü. Serum TG ve TK sonuçları mg/Dl birimi cinsinden hesaplandı.

3.2.7. Serum OxLDL Seviyelerinin Belirlenmesi

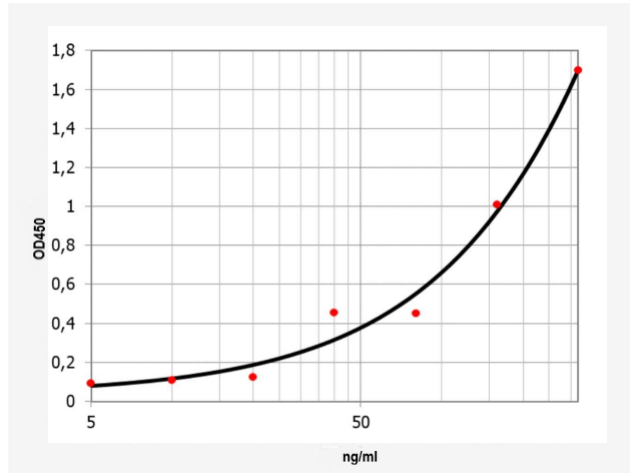
Farelerde serum OxLDL seviyeleri ticari ELISA kitinde belirtilen prosedür uygulanarak üretici protokolüne göre ölçüldü. 450 nm'de kolorimetrik okuma yapılarak veriler myassays.com'a aktarıldı. Şekil 16'daki standart grafik aracılığıyla sonuçlar ng/mL olarak hesaplandı.



Şekil 16. Serum OxLDL standart grafiği

3.2.8. Serum LOX-1 Seviyelerinin Belirlenmesi

Farelerde serum LOX-1 seviyeleri ticari ELISA kitinde belirtilen prosedür uygulanarak üretici protokolüne göre ölçüldü. 450 nm’de kolorimetrik okuma yapılarak veriler myassays.com’a aktarıldı. Şekil 17’deki standart grafik aracılığıyla sonuçlar ng/mL olarak hesaplandı.



Şekil 17. LOX-1 standart grafiği

3.2.9. Aort Dokusu OxLDL Seviyelerinin Belirlenmesi

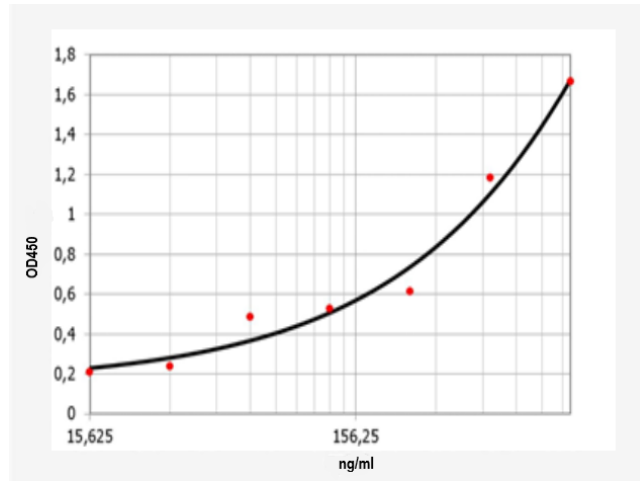
Farelerin aortik ark dokularındaki inflamasyon seviyelerini değerlendirmek için OxLDL seviyeleri ticari olarak satın alınan OxLDL ELISA kiti kullanılarak ölçüldü. Doku homojenizatının hazırlanması ve OxLDL ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Homojenatların Hazırlanması

Elde edilen doku, 1 mL'lik PBS (%0.01 Triton X-100 içeren) tamponu içerisinde buz üzerinde bir homojenizatör yardımıyla 90 s süreyle 5000 rpm'de homojenize edildi. Homojenizasyon sonrası 15 s sonikasyon işlemi (130 Watt, 20 Khz) uygulandı. Homojenatlar 10000xg'de 10 dak santrifüj edilerek süpernatant kısımları alındı.

Deneyin Yapılışı

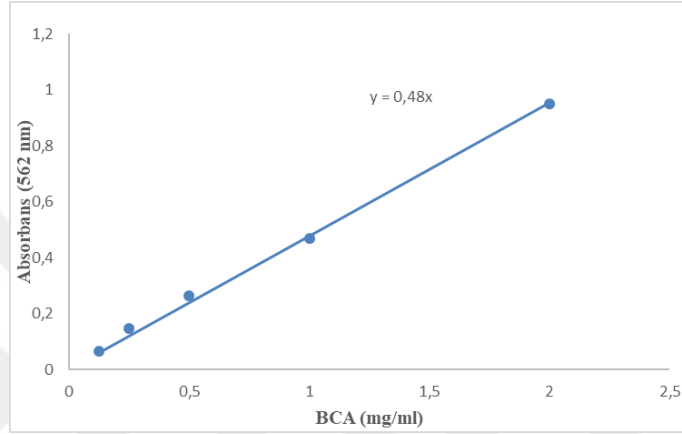
1. OxLDL ölçümü için hazırlanan numune süpernatantları, standartlar ve kitte mevcut olan reaktifler kit protokolüne uygun olarak mikropalakalara koyuldu. Mikropalaka okuyucusunda örneklerin absorbansları 450 nm'de okundu.
2. Numune konsantrasyonları Şekil 18'deki standart grafiğe göre ng/mL cinsinden hesaplandı. Ancak dokulardaki OxLDL seviyeleri, doku homejenatı protein seviyeleri başına ng/mg protein olarak verildi.



Şekil 18. Doku OxLDL standart grafiği

3.2.10. Aort Doku Homojenatında Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Farelerin aort doku homojenatlarındaki protein seviyeleri, ticari olarak satın alınan bikinkoninik asit (BCA) ölçüm kiti kullanılarak ölçüldü. Doku homojenatının hazırlanması ve BCA ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Standart olarak 2 mg/dL, 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL ve 0,125 mg/mL’lik BCA kullanıldı. Şekil 19’deki standart grafik aracılığıyla sonuçlar mg/mL olarak hesaplandı.



Şekil 19. BCA standart grafiği

3.2.11. Histolojik Analizler

3.2.11.1. Kriyostat Kesitler

ApoE^{-/-} farelerden alınan aortik kök doku örnekleri 1.5 cm³ hacimde trimlenerek 80°C’de 10 dakika bekletildi. Ardından doku örnekleri -18°C’de dondurma medyumunu (Sigma-Aldrich, Almanya) yardımıyla kriyostat (Leica 3050S, Leica Biosystems, Almanya) ile 6-8 µm kalınlığında kesitlere ayrıldı. Alınan kesitler ORO (Merck Millipore, 102419, Almanya) boyası ile üretici firma prosedürüne uygun şekilde boyandı. Daha sonra hematoksilen (Merck GmbH, Almanya) boyası ile zıt boyama yapıldı. Elde edilen kesitlerin görüntüleri dijital kamera (Olympus DP71, Olympus Corp, Japan) ataçmanlı ışık mikroskobu (Olympus BX51, Olympus Corp, Japan) yardımıyla alındı.

3.2.11.2. Histolojik Doku Takip İşlemleri

ApoE^{-/-} farelerden alınan aortik kök doku örnekleri 1.5 cm³ hacimde trimlenerek parçalara ayrıldı. Alınan kesitler %10'luk nötral formalin solüsyonu içinde 24 saat bekletilerek fiksasyon işlemi uygulandı. Ardından doku örnekleri, doku takip kasetleri içine konularak doku takip cihazında (Citadel 2000, ThermoScientific, Almanya) %10, %50, %60, %70, %80, %96, %100 (x2)'lük alkol solüsyonlarından geçirilerek dehidratasyon işlemi yapıldı. Sonrasında ksilen serilerinde bekletilerek şeffaflaştırma işlemi ve ardından yumuşak ve sert parafin içerisinde bekletilerek parafin inklüzyon işlemi uygulandı (Tablo 5). Doku takibi cihazından çıkarılan aortik kök doku örnekleri parafin bloklama cihazı (Leica EG 1150 H) ile sert parafin (Merck KGaA, Dramstadt, Almanya) yardımıyla bloklanarak kesit alma işlemine geçildi. Rotary mikrotom ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak (Leica RM2255) adhesivli lamlara (Isolab GmbH, Almanya) koyuldu.

Tablo 5. Histolojik doku takip aşamaları

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10'luk Formalin (Sigma Aldrich, Almanya)	24 s
Dehidratasyon	%50'lik Etanol 1 (Merck KGaA, Almanya)	60 dk
Dehidratasyon	%50'lik Etanol 2 (Merck KGaA, Almanya)	30 dk
Dehidratasyon	%60'lik Etanol (Merck KGaA, Almanya)	90 dk
Dehidratasyon	%70'lik Etanol (Merck KGaA, Almanya)	90 dk
Dehidratasyon	%80'lik Etanol (Merck KGaA, Almanya)	60 dk
Dehidratasyon	%100'lik Etanol 1 (Merck KGaA, Almanya)	60 dk
Dehidratasyon	%100'lik Etanol 2 (Merck KGaA, Almanya)	60 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen 1 (Merck KGaA, Almanya)	30 dk
Şeffaflaştırma	Ksilen 2 (Merck KGaA, Almanya)	90 dk
Parafinizasyon	Yumuşak Parafin (42-44°C) (Merck KGaA, Almanya)	60 dk
Parafinizasyon	Sert Parafin (52-54°C) (Merck KGaA, Almanya)	210 dk
Bloklama		

3.2.11.3. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü

ApoE^{-/-} farelerden alınan aortik kök doku örneklerinden rotary mikrotom ile 3 µm kalınlığında seri kesitler alınarak (Leica RM2255) pozitif şarjlı lamlara (Superior Marinfeld Histobond⁺) yerleştirildi. Elde edilen kesitler deparafinizasyon işleminden sonra IHC/ISH cihazı yardımıyla (Bond Max, Leica Biosystems, Avustralya) primer ve sekonder antikorlar ile inkübe edildi. Aortik kök doku kesitleri, çalışma grupları birbirinden habersiz iki histolog tarafından değerlendirildi (Tablo 6).

Tablo 6. İmmün boyama prosedürü

İşlem	Madde/ Cihaz	Süre
Deparafinizasyon	60 °C'lık 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 s
Blokaj	Protein blok	10 dk
Yıkama	PBS	15 s
Antikor	Primer antikor	1 saat
Yıkama	PBSx4	15 s
Boyama	Biotilylated Goat anti-polyvalent	10 dk
Yıkama	PBSx4	15 s
Boyama	StreptavidinPeroxidase	10 dk
Yıkama	PBSx4	15 s
Boyama	DAB	5 dk
Yıkama	PBSx	15 s
Boyama	Harris hematoksilen	3 dk
Yıkama	Musluk suyu	15 s
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

3.2.11.4. Yarı-kantitatif Analiz

ApoE^{-/-} farelerden alınan aortik kök doku örneklerinin histopatolojik değerlendirilmesi Virmani ve arkadaşları ile Benslaiman ve arkadaşlarının Amerikan Kalp Derneği protokolüne uygun olarak Tablo 7 ve Tablo 8’deki gibi skorlandı (29, 181). Yarı-kantitatif analizler çalışma gruplarından habersiz bir histopatolog tarafından her bir fareye ait kesitlerde rastgele olarak belirlenmiş 20 farklı alan da x20 ve x40’lık objektif büyütmeleler kullanılarak skorlandı.

Tablo 7. Amerikan Patoloji Derneği’nin aterom plak patoloji skorlaması

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

Tablo 8. Aort histopatolojik hasar skorlaması (AHHS)

Skor	Bulgu
Subendoteliyal Adiposit Tutulumu	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Damar Duvarında Adiposit Tutulumu	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Fibröz Kep Oluşumu	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%
Erode Plak Oluşumu	
0	≤5%
1	≤25%
2	≤50%
3	≤75%

3.2.12. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 23.0 (IBM Corp. IL, Chicago, ABD) programı ile yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunlukları Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uymayan ikiden fazla değişkenin değerlendirilmesinde Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve elde edilen değerler medyan-çeyrekler arası açıklık (IQR) olarak ifade edildi. İkili değişken gruplar arasındaki karşılaştırmalarda ise Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Bonferroni programına göre anlamlılık düzeyi $\alpha=0.05/12=0.004$ olarak belirlendi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.004$ olarak kabul edildi.

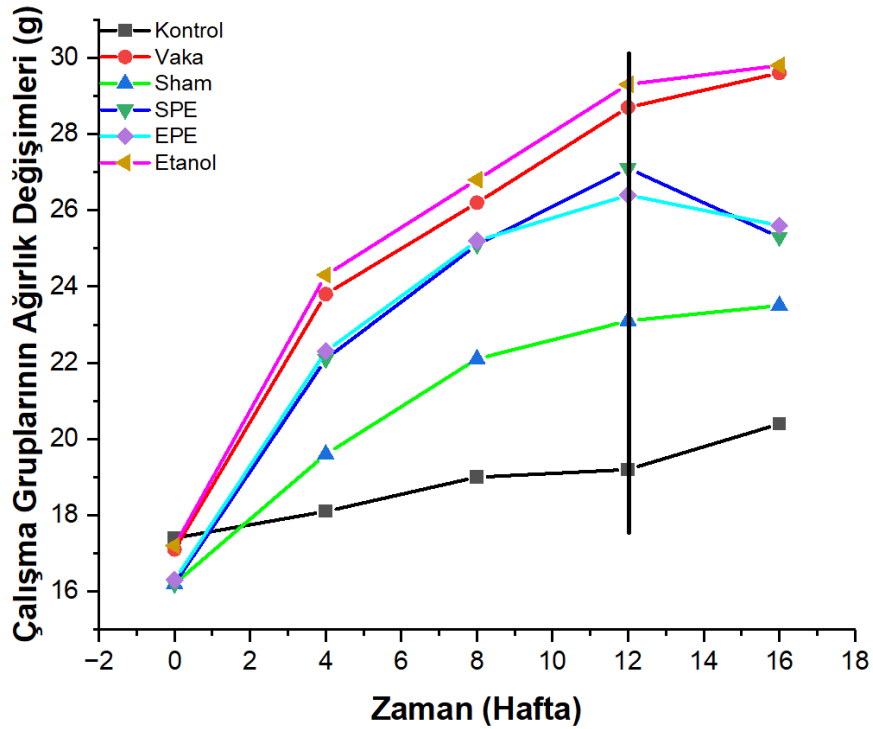
Verilerin histolojik olarak değerlendirilmesinde yarı-kantitatif değerler için SPSS 23.0 programı kullanıldı. Elde edilen verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk test, Q-Q plot, Skewnes-Kurtosis değerleri ve Levene's testleri yapılarak değerlendirildi. Non-parametrik veriler Kruskal-Wallis ve Tamhane T2 testi ile belirlenerek medyan-IQR şeklinde değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

Standart grafiklerin belirlenmesinde www.myassays.com adresinde Dört Parametrelili Lojistik (4PL) Regresyon ve Microsoft Office Excel 2023 programları kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı ve grafikler çizildi.

4. BULGULAR

4.1. Deney Gruplarının Ağırlık Değişim Değerleri

Deney gruplarındaki fareler beslenmeye başladıktan itibaren her 4 haftada bir ölçülen ağırlık değişimleri Şekil 20’de gösterilmiştir. Grupların başlangıç aşamasında aralarında ağırlıkları yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.004$). Fakat ilerleyen haftalarda gruplar arasında ağırlık değişimleri görülmeye başlandı. 4., 8., 12. ve 16. haftanın ardından V, SPE, EPE ve Etanol gruplarının ağırlıklarında K grubuna göre istatistiksel olarak yüksek derecede anlamlı fark görüldü ($p<0.004$). Bu grupların kendi aralarında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.004$). S grubunun ağırlığında K grubuna göre 8., 12. ve 16. haftanın sonunda yüksek derecede anlamlı fark görüldü ($p<0.004$). SPE ve EPE gruplarının ağırlıklarında 4 haftalık enjeksiyon sonrası 16. haftada V ve Etanol gruplarına göre düşük derecede anlamlı fark ($p<0.004$) görülürken, K ve S gruplarına göre ise yüksek derecede anlamlı fark görüldü ($p<0.004$).



Şekil 20. Deney gruplarının ağırlık değişimleri

4.2. Biyokimyasal Bulgular

4.2.1. Serum TG ve TK Seviyeleri

Deneyde kullanılan farelerin 16 haftalık deney süresi sonunda SPE ve EPE gruplarının hem TK hem de TG seviyeleri; V grubuna göre istatistiksel olarak düşük derecede anlamlı fark ($p<0.004$) bulundu. SPE ve EPE gruplarının TG seviyelerinde ise; K grubuna göre düşük derecede anlamlı fark ($p<0.004$) bulunurken, TK seviyelerinde K grubuna göre yüksek derecede anlamlı fark ($p<0.004$) bulundu. Farelerin serumlarında ölçülen TG ve TK değerleri Tablo 9’da verilmiştir.

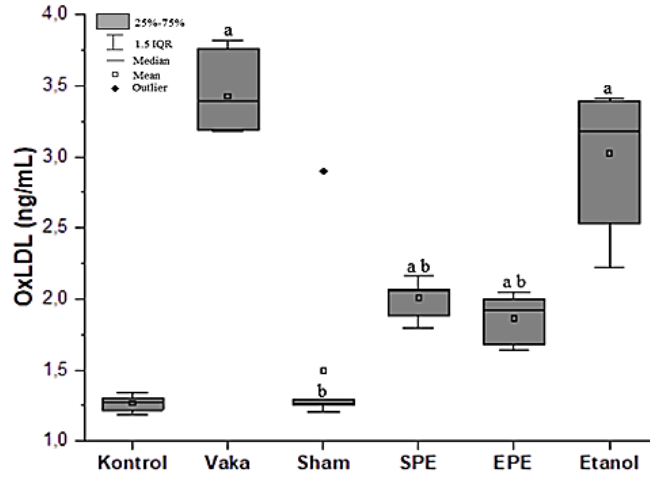
Tablo 9. Serum TG ve TK seviyeleri

Parametreler Medyan- (IQR)	Kontrol	Sham	Vaka	SPE	EPE	Etanol
TG (mg/dL)	82 (72-82)	99 ^b (70-79)	144 ^a (110-117)	64 ^{a, b} (52-58)	67 ^{a, b} (54.5-62)	137 ^a (92.3-1013)
TK (mg/dL)	115 (128-154)	164 (129- 138)	1569 ^a (1355-1412)	1106 ^{a, b} (1212-1267)	1148 ^{a, b} (1103-1259)	1610 ^a (1327-1505)

Sonuçlar, medyan-IQR olarak ifade edildi. **a:** K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.004$), **b:** V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.004$).

4.2.2. Serum OxLDL Seviyeleri

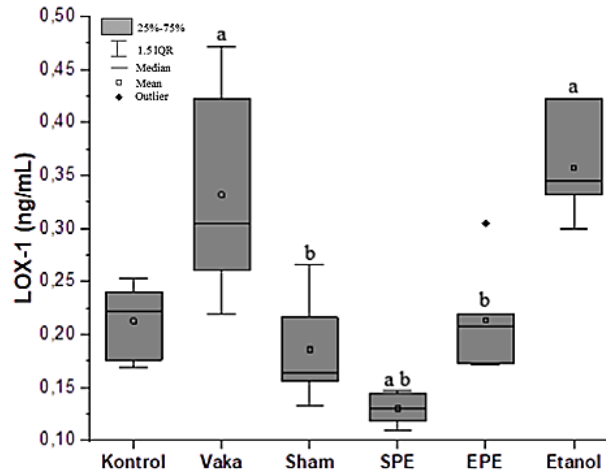
Deneyde kullanılan farelerin serumlarında oksidatif stres derecesini değerlendirmek amacıyla ölçülen serum OxLDL seviyeleri Şekil 21’de verildi. SPE ve EPE grupları; V grubuna göre OxLDL seviyeleri istatistiksel olarak düşük derecede anlamlı fark ($p<0.004$) bulunurken, K grubuna göre ise yüksek derecede anlamlı fark ($p<0.004$) bulundu.



Şekil 21. Serum OxLDL seviyeleri **a:** K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.004$), **b:** V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.004$).

4.2.3. Serum LOX-1 Seviyeleri

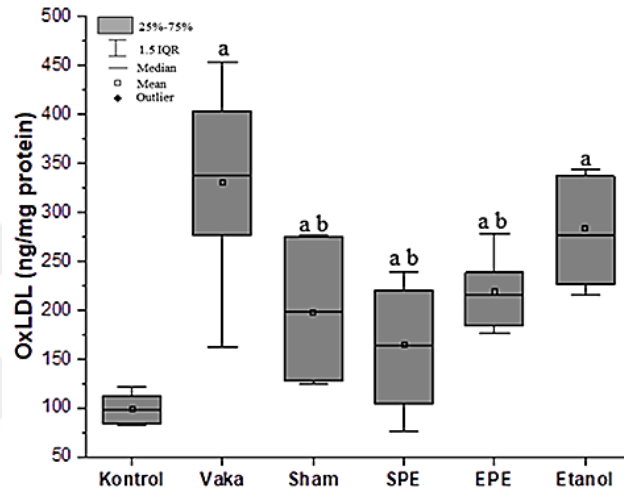
Deneyde kullanılan farelerin serumlarında oksidatif stres derecesini değerlendirmek amacıyla ölçülen serum LOX-1 seviyeleri Şekil 22’de verildi. SPE ve EPE gruplarında; V grubuna göre LOX-1 seviyeleri istatistiksel olarak düşük derecede anlamlı fark ($p<0.004$) bulundu. SPE grubunda; K grubuna göre düşük derecede anlamlı fark ($p<0.004$) bulunurken, EPE grubunda ise anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.004$).



Şekil 22. Serum LOX-1 seviyeleri **a:** K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.004$), **b:** V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.004$).

4.2.4. Aortik Ark Dokusu OxLDL Seviyeleri

Deneyde kullanılan farelerin aortik ark dokularında oksidatif stres derecesini değerlendirmek amacıyla ölçülen OxLDL seviyeleri Şekil 23'te verildi. SPE ve EPE gruplarında; V grubuna göre OxLDL seviyeleri istatistiksel olarak düşük derecede anlamlı fark ($p<0.004$) bulunurken, K grubuna göre ise yüksek derecede anlamlı fark ($p<0.004$) bulundu.

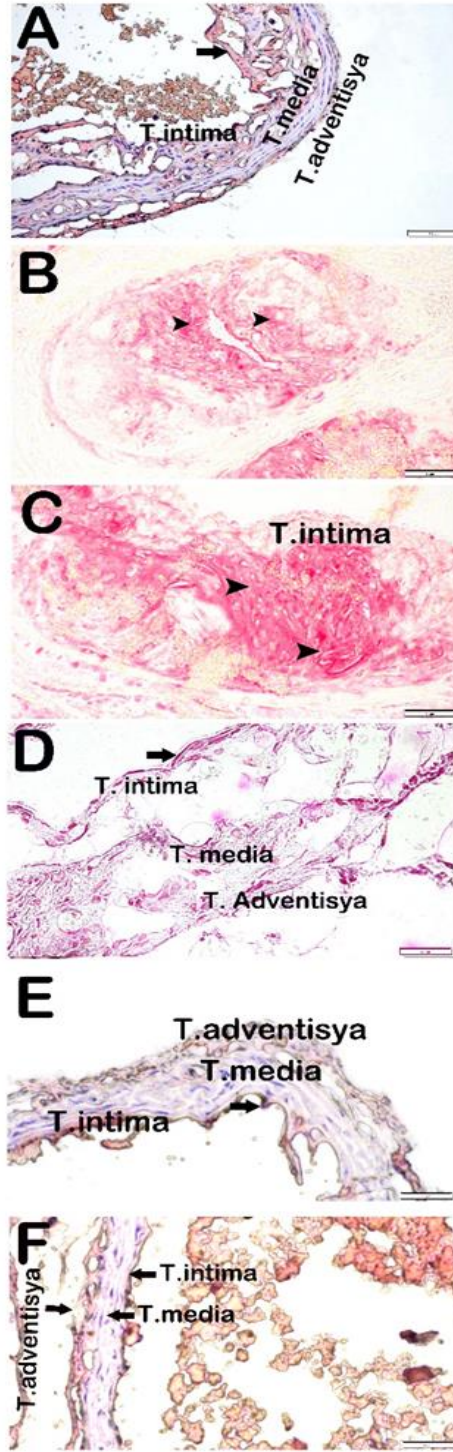


Şekil 23. Aortik ark doku OxLDL seviyeleri **a:** K grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.004$), **b:** V grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0.004$)

4.3. Histolojik Bulgular

4.3.1 Aortik Kök Dokusu Histolojik Bulguları

Deneyde kullanılan farelerin aortik kök dokularının ORO ile boyanmış ışık mikroskobu temsili görüntüsü Resim 3'te, skorlamalar ise Tablo 10'da verildi.



Resim 3. Kriyostat yöntemi ile elde edilen aortik kök dokusunun ORO ile boyanmış temsili ışık mikroskobu resimleri

A(x20) Kontrol Grubu: Aortik kök doku kesitlerinde, tunika intima tabakasında endotel ve subendotel bağ dokusunun normal yapıda olduğu görülmektedir (ok). Ayrıca, tunika media ve adventisya tabakası normal yapıdadır.

B(x20) Sham Grubu: Aortik kök doku kesitlerinde, tunika intima tabakasında subendoteliyal alanda adiposit birikimleri görülmektedir (ok başı). Ayrıca, tunika media’da bazı kısımlarda adiposit birikimleri vardır (ok başı).

C(x20) Vaka Grubu: Aortik kök doku kesitlerinde, tunika intima ve media tabakasında yoğun adiposit birikimleri görülmektedir (ok başı).

D(x20) Sulu Propolis Grubu: Aortik kök doku kesitlerinde, subendoteliyal alanda adiposit birikimlerinin azaldığı görülmektedir (ok).

E(x20) Etanollü Propolis Grubu: Aortik kök doku kesitlerinde, çoğunlukla subendoteliyal alanda adipositlerin iyice azaldığı görülmektedir (ok).

F(x20) Etanol Grubu: Aortik kök doku kesitlerinde, tunika intima ve media tabakasında yoğun adiposit birikimleri görülmektedir (ok).

Tablo 10. Aortik kök histopatolojik hasar skorlaması bulguları (AHHS, Medyan- IQR)

Grup	Adiposit Subendoteliyal Tutulum	Adiposit Damar Duvarı Tutulum	Fibroz Kep Oluşumu	Erode Plak Oluşumu	AHHS
Kontrol	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Vaka	2 (2-2) ^a	1.5 (1-1) ^a	0 (0-0.5)	0 (0-0)	3 (2-3) ^a
Sham	2 (2-3) ^b	1 (0-1) ^b	1 (0-1) ^b	0 (0-0) ^b	3 (2-3) ^b
SPE	1 (0.5-1) ^{a,b}	0.5 (0-1) ^{a,b}	0 (0-0) ^{a,b}	0 (0-0) ^{a,b}	1 (0.5-1) ^{a,b}
EPE	1 (0-1) ^{a,b}	0 (0-1) ^{a,b}	0 (0-0) ^{a,b}	0 (0-0) ^{a,b}	0.5 (0-1) ^{a,b}
Etanol	0 (0-0) ^{a,b}	1 (0-0) ^{a,b}	0 (0-0) ^{a,b}	0 (0-0) ^{a,b}	0 (0-1) ^{a,b}

Kruskal Wallis/Tamhane testleri ile değerlendirildiğinde; ^aP<0.05: Kontrol grubuna kıyasla ve ^bP<0.05: Vaka grubuna kıyasla anlamlı farkı göstermektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

KVH, insanların hayatında psikolojik, fiziksel, sosyal ve ekonomik yönden önemli etkileri olan ve dünyada yüksek ölüm oranına sahip hastalıklar arasındadır (182). KVH'ler arasında ateroskleroz, dislipidemi ve obezite yüksek morbidite ve mortalite oranına sahiptir (183). KVH'nin gelişiminde, vasküler bölgede oluşan ve geri dönüşümü mümkün olan aterosklerozun etkisi çok yüksektir. Aterosklerotik süreçteki KVH risk faktörlerini azaltarak ateroskleroz gelişimini yavaşlatmak veya iyileştirmek mümkündür (184). Oksidatif stres, aterosklerotik sürecin gelişimi ve ilerlemesinde etkili bir risk faktörüdür. Oksidatif stresin en önemli nedenlerinden biri olan ROS'lar; inflamasyon, endotel disfonksiyonu ve lipit metabolizması değişiklikleri gibi pro-aterojenik süreçlerin gelişimini başlatmaktadır. Vasküler sağlığın korunmasında arterlerdeki oksidatif stres düzeylerini belirlemek ve karakterize etmek önemlidir. Bu nedenle ROS miktarı, inflamatuvar ajanlar ve endotel disfonksiyonu gibi pro-aterojenik faktörler kontrol altında tutulmalıdır (185).

LDL'nin yapısında bulunan fosfolipit ve kolesterol esterleri, ROS ile oksitlenmeye daha fazla eğilimli olup kolayca OxLDL'ye dönüşebilirler. OxLDL; vasküler endotel hücrelerin inflamasyonunda, köpük hücrelerin oluşumunda, VSMC'lerin göçü ve çoğalmasında, trombositlerin adezyonu ve agregasyonu gibi birçok mekanizma ile aterosklerotik sürecin gelişimine katkı sağlamaktadır (15). Dokularda vasküler alanda biriken ROS'lar, LDL partiküllerini oksitler ve OxLDL ile inflamatuvar cevabı uyarırlar. OxLDL, LOX-1 aracılığıyla endotel hücrelerin yüzeyindeki adezyon moleküllerin aktivasyonuna neden olmaktadır. Böylece, monositler subendotel alana göç ederek makrofajlara dönüşürler ve OxLDL alımını artırır (186, 187). OxLDL; EC'de LOX-1'in ekspresyonunu artırarak aterosklerotik sürecin gelişimine katkı sağlamaktadır. Ayrıca, apoptozu ve inflamasyonu uyarak endotel disfonksiyonuna yol açar. ApoE^{-/-} farelerde LOX-1'in ekspresyonu sonucu aşırı ROS üretimi, makrofaj infiltrasyonu ve aterosklerotik plak gelişimi görüldüğü bildirilmiştir (188).

Aterosklerotik sürecin gelişimi ile makrofajların yüzeyindeki LOX-1 ekspresyonunun arttığı, ABCA1 ve ABCG1 ekspresyonunun ise azaldığı belirtilmiştir. Böylece makrofajlarda aşırı kolesterol birikimi ve köpük hücre oluşumu gerçekleşmiştir. Makrofajlar tarafından sürekli OxLDL alınması inflamasyonu şiddetlendirir ve MMP'ler lipit çekirdeklerinin dış tabakasındaki fibröz yapıyı bozarak aterosklerotik

plakların daha dengesiz ve kırılgan hale dönüşmesine neden olurlar (189).

Aterosklerotik sürecin gelişimini önlemede doğal arı ürünlerinin terapötik etkilere sahip oldukları görülmüştür. Arı ürünleri içerisinde önemli etkilere sahip propolisin yapısında bulunan çeşitli polifenol ve flavonoidler yüksek anti-inflamatuar ve antioksidan aktiviteye sahiptirler. Ayrıca, propolisin yapısındaki lipofilik maddeler organik çözücülerde (etanol, metanol vb.) yüksek oranda çözünürken, su içerisinde ise düşük oranda çözünmektedir (190, 191). Organik çözücülerin canlı sistemlerde sağlık açısından olumsuz etkilerinden dolayı propolisin sulu içeriğinin daha uygun olduğu bilinmektedir. Literatüre baktığımızda propolisin anti-aterojenik etkilerinin incelendiği organik çözücülerle yapılan çalışmalar daha fazla olmakla birlikte sulu çözücülere ait çalışmalar sınırlı sayıdadır (192-195). SPE'nin ateroskleroz gelişiminde OxLDL ve LOX-1 düzeylerine etkilerinin belirtildiği çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle tez çalışmamızda SPE ve EPE'nin aterosklerotik diyet ile beslenen ApoE^{-/-} farelerde OxLDL ve LOX-1 düzeyleri üzerine etkileri *in vivo* olarak incelendi.

İnsanlarda aterosklerotik sürecin patofizyolojisi birçok risk faktöründen etkilenmektedir. İmmünometabolik süreçlerin ve moleküler mekanizmaların incelenerek insan patofizyolojisi için uygun hayvan modellerinin geliştirilmesi önemlidir. Aterosklerotik süreç araştırmalarında farklı hayvan modelleri üzerinde çalışmalar yapılmakta ve her birinin kendisine ait avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır (196). Hayvan seçiminde fareler; yetiştirilmesi kolay, ucuz ve üretimi hızlı olmakla birlikte biyokimyasal ve farmakolojik çalışmalar yapmaya daha uygundur (125). Fare modelleri, insan metabolizmasının özelliklerini kısmen karşılamakla birlikte ateroskleroz çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, genetik ve fizyolojik yönden önemli farklılıklar görülmektedir (197). Hiperlipidemiye yatkın genetik olarak düzenlenmiş ApoE^{-/-} ve LDLR^{-/-} fareler günümüzde daha çok tercih edilmektedir (197-199). ApoE^{-/-} farelerde ApoE'nin genetik olarak silinmesinden dolayı normal C57BL/6J farelere kıyasla toplam plazma kolesterol düzeyleri aşırı yüksektir. ApoE^{-/-} fareler normal diyet ile beslendiğinde bile aterosklerotik lezyon gelişimi olurken, aterosklerotik diyetle daha kapsamlı ve hızlı bir aterosklerotik süreç gelişimi görülmektedir (126, 134). ApoE^{-/-} farelerde; lezyon dağılımı, aortik kök, karotid arter ve aort dallanmaları insanlardaki aterosklerotik sürece benzerdir. Ancak, tüm farelerde plazma kolesterolünün çoğu VLDL ve şilomikronlar tarafından taşınır ve hızlandırılmış

ateroskleroz gelişimine rağmen, lezyonların yırtılması az gerçekleşir ve tromboza neden olmazlar (200). LDLR^{-/-} farelerde ise LDLR'nin silinmesi ile kolesterol seviyelerinde aşırı artış olmaktadır. Aterojenik diyet ile aterosklerotik sürecin gelişimi hızlanmaktadır. Ancak LDLR'lerde çok fazla mutasyon görülmekte ve bu durum LDL-K ve ateroskleroz gelişiminde görülen bir genetik bozukluk olan ailesel hiperkolesterolemiye neden olmaktadır. Bu nedenle tez çalışmamızda ApoE^{-/-} fareler tercih edilmiştir (201, 202).

Farelerin cinsiyetleri aterosklerotik sürecin gelişiminde önemlidir. Dişi farelerde gerçekleşen menstrual döngüden dolayı yüksek oranda sentezlenen estradiol hormonu ateroskleroza karşı koruyucu etki gösterdiği için erkek fareler tercih edilmiştir (203, 204). Tez çalışmamızda 6-8 haftalık erkek ApoE^{-/-} farelerden deneysel ateroskleroz modeli oluşturulmuştur. ApoE^{-/-} fareler, aterojenik diyet ile 16 hafta boyunca günlük 4-6 g/hayvan olacak şekilde beslenerek aterosklerotik lezyon gelişiminin hızlı ve kısa sürede gerçekleşmesi sağlanmıştır (134, 205).

Çalışma gruplarının karşılaştırılmasında, K grubunda; C57BL-6J farelere kontrol diyet verilerek C57BL-6J ile ApoE^{-/-} farelerin karşılaştırması yapılmıştır. S grubunda; C57BL-6J farelere aterojenik diyet verilerek diyetin etkisine bakıldı ve ApoE^{-/-} farelerdeki kadar fazla plak oluşumu görülmedi. Etanol grubunda; EPE ile Etanol grubunun karşılaştırması yapılmıştır. Etanol, tek başına oksidatif stres derecesini azaltmadı ve tüm gruplarda yüksek seviyede çıkmıştır. Organik çözücü olan etanol propolis içeriğindeki flavonoidleri açığa çıkararak propolisin aktivasyonunu artırmaktadır. Ancak biz tez çalışmamızda etanol yerine daha çok suyu ön plana çıkarmaya çalıştık. Çünkü suyun canlı sistem için bilinen bir toksik etkisi olmayıp belli bir kullanım süresine de gerek olmamaktadır. SPE ve EPE gruplarında; propolisin tedavi edici veya koruyucu etkilerine bakılırken, V grubunda ise; aterojenik diyetin etkisine bakılmıştır (191, 192).

Propolis ekstraktlarının farelerin ağırlıklarına etkisini incelediğimizde; başlangıçta tüm gruplardaki ağırlık oranları benzer olup fareler ayda bir tartıldı ($p>0.004$). Tüm fare gruplarında 12. haftaya kadar kilo artışı gerçekleşti ($p<0.004$). Ancak, 12. haftada SPE ve EPE gruplarında i.p enjeksiyona başlandı ve bu gruplarda 16. hafta sonunda bariz bir şekilde kilo kaybı görüldü. SPE ve EPE grupları ile V grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0.004$). SPE ve EPE gruplarının ağırlıkları enjeksiyon öncesi ve sonrasına göre kıyaslandığında ise

sırasıyla %3.03 ve %6.64 oranında kilo kaybı yaşadılar. Literatürdeki çalışmalara baktığımızda; propolis ekstraktlarının farelerde vücut ağırlığını, iç organ yağ dokusu ağırlığını, serum TG, TK ve yağ asitlerini azalttığı ve lipit metabolizması ile ilişkili gen ekspresyonlarını down-regüle ederek yüksek yağlı diyet kaynaklı hiperlipidemiye önlediği veya hafiflettiği görülmektedir. Ayrıca, propolisin karaciğer ve iskelet kasında doymuş yağ asitlerinin birikimini azalttığı ve dışkı ile atılımını artırdığı, vücut yağ içeriğindeki azalmanın dışkı ağırlığının artmasına ve yağ emiliminin azalmasına neden olduğu belirtilmiştir. Bu açıdan yaklaşıldığında sonuçlarımız literatürdeki mevcut veriler ile uyumluluk göstermiştir (206-209).

Aterojenik diyetle beslenen farelerde köpük hücreler ile oluşan yağlı çizgiler diyetin 10-12. haftasından itibaren görüldüğü için SPE ve EPE gruplarında i.p enjeksiyona bu zamanlarda başlanılmıştır. Ayrıca, belli aralıklarla farelerin aort dokuları ORO ile boyanarak yağlı çizgi ve plak gelişimleri mikroskop altında incelenmiştir. ApoE^{-/-} farelerde aterosklerotik lezyon bölgesinde plak stabilizasyonu veya azalışını gözlemlemek için diyetle ilaveten 12. haftadan itibaren son 4 hafta her gün sulu ve etanollü propolis ekstraktları SPE ve EPE gruplarına i.p enjeksiyon ile verilmiştir. Doz belirleme çalışmaları yapılarak hem hayvan sayısı hem de tüketilecek sarf malzeme miktarları dikkate alınarak SPE ve EPE grupları sırasıyla 400 mg/kg ve 200 mg/kg olarak belirlendi (22, 192, 210). Literatürde propolis ekstraktlarının farklı doz ve sürelerde farelere verildiği birçok çalışma olup; 160 mg/kg/gün/gavaj (192), 100 mg/kg/haftada 2 kez/i.p (211) ve 200 mg/kg/gün/i.p (210) olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Farelerde i.p uygulama ile ekstraktlar karın periton boşluğuna iletilirken, oral gavajda ise maddeler bir tüp yoluyla doğrudan mideye iletilmektedir. Oral gavajın farelerde stresi artırması, organik çözücülerin gastrointestinal sistemde ödem ve kanamalara yol açması, farelerin yutaklarının tahriş olması ve uygulanmasının zor olmasından dolayı i.p yöntem seçildi. İ.p yöntemde farenin abdomen bölgesine enjekte edilen ekstraktlar; hızlı ve homojen bir şekilde dağılmakta, geniş bir yüzey alanına sahip, daha az invaziv ve doku hasarı riski de az olduğu için deneysel ve klinik çalışmalarda daha çok tercih edilmektedir (212, 213).

TG, TK ve OxLDL seviyelerinin artışı; dislipidemi, endotel disfonksiyonu, köpük hücre oluşumu, inflamasyon ve plak oluşumunu tetikleyerek aterosklerotik sürecin gelişiminde etkilidir (59, 214). Farelerin serumlarındaki TG, TK ve OxLDL

seviyeleri, V grubunda diğer tüm gruplara göre yüksek bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü. Farelerin serum TG ve TK seviyeleri; SPE ve EPE gruplarında V grubuna göre düşük bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.004$). K grubunda ise TG seviyeleri SPE ve EPE gruplarında düşük bulunurken TK seviyeleri ise yüksek bulundu ve anlamlı fark görüldü ($p<0.004$). Literatüre baktığımızda EPE'nin verildiği tüm gruplarda TK ve TG seviyelerinde önemli düşüşlerin olduğu benzer çalışmalar görülmektedir (188, 192, 211). Böylece tez çalışmamız ile literatür arasında uyumluluk görülmekte ve sonuçlarımız literatüre uygun bulunmuştur.

Farelerin serum OxLDL seviyeleri; SPE ve EPE gruplarında V grubuna göre düşük bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.004$). Literatürde hücre kültürü çalışmalarında; RAW264.7 hücreleri ve insan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC)'nde EPE'nin OxLDL kaynaklı hücre içi lipit birikimini azalttığı belirtilmiştir (170, 215, 216). Fakat literatürde propolisin ApoE^{-/-} farelerde serum OxLDL seviyeleri üzerine etkisinin incelendiği çalışmaya rastlanılmamıştır. Aterosklerotik plak gelişimi ve vasküler inflamasyonun belirlenmesinde OxLDL yeni ve önemli bir biyobelirteçtir. Propolis inflamasyonu ve oksidatif süreci azaltıcı etki göstermiştir.

Farelerin serum LOX-1 seviyeleri; SPE ve EPE gruplarında V grubuna göre düşük bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.004$). SPE grubunda K grubuna göre düşük bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.004$). Fakat EPE grubunda anlamlı bir fark görülmedi ($p>0.004$). SPE grubunun K grubunun altına inmesinin nedeni olarak SPE'nin konsantrasyonunun fazla olması ve yapısındaki polifenollerin aktivitesinin daha fazla olabileceği düşünülmektedir. Literatürde NF- κ B inhibitörü olan niklosamidin ApoE^{-/-} farelerin karotis plaklarında ve VSMC'lerinde LOX-1 ekspresyonunu azalttığı belirtilmiştir (217). Ayrıca, EPE'nin HUVEC'lerde LOX-1 aracılı oksidatif stresi inhibe ederek OxLDL kaynaklı hasardan koruduğu belirtilmiştir (215, 218). LOX-1; aterosklerotik plak gelişimi ve stabilitesi hakkında bilgiler veren vasküler inflamasyonun yeni bir biyobelirteçidir (219). Propolis ve propolis içeriğindeki bileşiklerin serum LOX-1 seviyeleri üzerine etkisinin incelendiği çalışmaya rastlanılmamıştır.

Farelerin aortik ark OxLDL seviyeleri; SPE ve EPE gruplarında V grubuna göre düşük bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.004$). SPE ve EPE gruplarında K grubuna göre yüksek bulundu ve istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü

($p<0.004$). Etanol hem serumda hem de dokuda V grubundan sonra yüksek seviyede çıkmıştır. Etanolün moleküler yapısı küçük olduğu ve hücre membranından herhangi bir taşıyıcı olmadan doğrudan geçtiği için toksisitenin yüksek çıktığı düşünülmektedir. Literatürde propolis bileşenlerinden kuersetinin ApoE^{-/-} farelerde OxLDL miktarını azalttığı belirtilmiştir (220). Ayrıca, ApoE^{-/-} farelerde TSG (2,3,5,4-tetrahidroksi-stilben-2-O-β-D-glukozit) ilacının aort dokusunda OxLDL konsantrasyonunu azalttığı belirtilmiştir (221). Propolis bileşenlerinden CAPE'nin sıçan aort VSMC'leri üzerinde antiproliferatif etkisi olduğu belirtilmiştir (222). Propolis ve propolis içeriğindeki bileşiklerin aort dokusu OxLDL seviyeleri üzerine etkisinin incelendiği çalışmaya rastlanılmamıştır.

Propolisin; inflamasyon, oksidatif stres ve aterosklerotik sürecin gelişimi üzerine literatürde çalışmalar bulunmakta fakat net bir mekanizma belirlenememiştir. Makrofajlar ve B/T hücreleri, inflamatuvar sitokinleri (TNF-a, IL-1, 2 ve 6) aktiveleştirirler. Aktive olan inflamatuvar sitokinler; NF-κB translokasyonunu, oksidatif stresi, reaktif oksijen ve nitrojen türlerini uyarırlar. NF-κB; transkripsiyon faktörü olup çeşitli sitokinlerin, inflamatuvar medyatörlerin ve bağışıklık hücrelerinin uyarılması ve aktivasyonunda etkilidir. Ayrıca, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS)'da uyararak NO sentezine de yardımcı olmaktadır. Propolis; NF-κB'nin aktive ettiği lipoksijenaz ve siklooksijenaz enzimlerinin gen ekspresyonunu baskılar, MMP inhibisyonunda özellikle ADAM10/17'de, iNOS gen ekspresyonu ile B/T hücrelerinin bağışıklığının azaltılmasında etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca lipit peroksidasyonu son ürünü MDA'yı azaltırken, SOD, GPx ve total antioksidan kapasite seviyelerini artırdığı çeşitli mekanizmalar belirtilmiştir (154, 212, 223).

Farelerin aortik kök plak yükü ve lipit birikim seviyeleri; SPE ve EPE'nin aortik kökte gelişen plak yüküne olası etkileri histolojik olarak yarı-kantitatif ORO ile boyanarak incelendi. V grubunda SPE ve EPE gruplarına göre; aterosklerotik plak yükü ve lipit birikimi yüksek seviyede olup istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü ($p<0.004$). Propolis anti-aterosklerotik etki göstermiştir. Literatürde, EPE'nin aterosklerotik plak yükü ve lipit birikimlerini azalttığı çalışma mevcuttur (192). Fakat SPE'nin aterosklerotik plak yükü ve lipit birikimine direkt etki ettiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca, aortik kök histopatolojik hasar skorlaması verilerine göre; SPE ve EPE gruplarında V grubuna göre lipit birikiminin azaldığı ve istatistiksel olarak

anlamlı fark görülmüştür ($p<0.004$). Bu histolojik sonuçların diğer biyokimyasal sonuçlarımız ile uyumluluk göstermesi tez çalışmamızı desteklemektedir.

Bu tez çalışması, sulu ve etanollü propolis ekstraktlarının aterosklerotik diyetle beslenen ApoE^{-/-} farelerin aterosklerotik plaklarında OxLDL ve LOX-1 düzeylerine etkilerinin incelendiği ilk çalışmadır. Aterosklerotik sürecin gelişiminde dislipidemi, oksidatif stres ve inflamatuvar parametrelerin seviyeleri önemli olup son dönemlerde OxLDL ve LOX-1 gibi yeni belirteçlerin etkileride araştırılmaktadır. Canlı sistem için toksik olmayan su ile ekstrakte edilmiş SPE ile EPE'nin aterosklerotik sürecin gelişiminde inflamatuvar parametrelerin seviyelerini düşürerek dislipidemi ve oksidatif stres'e karşı koruyucu etki gösterebileceği görülmüştür. Ayrıca propolis ekstraktlarının; serum/doku OxLDL ve serum TG, TK ve LOX-1 gibi belirteçlerin seviyelerini düşürerek oksidatif sürecin gelişimini önleyebileceği, aortik kökte aterosklerotik plak yükü ve lipid birikimini azaltabileceği, aterosklerotik sürece karşı yeni tedavi stratejilerinin olgunlaşmasına katkı sağlayabileceği, alternatif/tamamlayıcı bir ürün olarak ateroskleroz, obezite, diyabet ve çeşitli KVH'nin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde etkili olabileceği ve literatüre katkı sağlayabileceği sonuçlarına varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. World Health Organisation (2014). Global status report on noncommunicable diseases. Available from: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/148114/?sequence=6> [Accessed 11 August 2023].
2. Silva DB, Miranda AP, D'Angelo LRB, Rosa BB, Soares EA, Ramalho JGDC, Boriollo MFG, Garcia JAD (2015). Propolis and swimming in the prevention of atherogenesis and left ventricular hypertrophy in hypercholesterolemic mice. *Braz J Biol* 75: 414-422.
3. World Health Organisation (2022). Global status report on noncommunicable diseases. WHO European Regional Obesity Report 2022. Available from: <https://iris.who.int/handle/10665/353747> [Accessed 19 April 2023].
4. Poitout V, Hagman D, Stein R, Artner I, Robertson RP, Harmon JS (2006). Regulation of the insulin gene by glucose and fatty acids. *J Nutr* 136: 873-876.
5. Niu C, Wang X, Zhao M, Cai T, Liu P, Li J, Willard B, Zu L, Zhou E, Li Y (2016). Macrophage foam cell-derived extracellular vesicles promote vascular smooth muscle cell migration and adhesion. *J Am Heart Assoc* 5(10): e004099.
6. Steinberg D (1995). Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 369: 39-48.
7. Holvoet P, Collen D (1998). Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 137: 2-7.
8. Van den Berg VJ, Vroegindewey MM, Kardys I, Boersma E, Haskard D, Hartley A, Khamis R (2019). Anti-oxidized LDL antibodies and coronary artery disease: A systematic review. *Antioxidants* 8: 1-17.
9. Goyal T, Mitra S, Khaidakov M, Wang X, Singla S, Ding Z, Liu S, Mehta JL (2012). Current concepts of the role of oxidized LDL receptors in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 14: 150-159.
10. Muhammad Abdul Kadar NN, Ahmad F, Teoh SL, Yahaya MF (2021). Caffeic acid on metabolic syndrome: A review. *Molecules* 26(18): 5490.
11. Kattoor AJ, Kanuri SH, Mehta JL (2019). Role of OxLDL and LOX-1 in atherogenesis. *Curr Med Chem* 26(9): 1693-1700.

12. Barreto J, Karathanasis SK, Remaley A, Sposito AC (2021). Role of LOX-1 as a cardiovascular risk predictor: Mechanistic insight and potential clinical use. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 41(1): 153–166.
13. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL (2017). Oxidative stress in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 19(11): 42.
14. Castillo-Núñez Y, Morales-Villegas E, Aguilar-Salinas CA (2022). Triglyceride-rich lipoproteins: Their role in atherosclerosis. *Rev Invest Clin* 74(2): 061–070.
15. Khatana C, Saini NK, Chakrabarti S, Saini V, Sharma A, Saini RV, Saini AK (2020). Mechanistic insights into the oxidized low-density lipoprotein-induced atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev* 2020: 5245308.
16. Ouweeneel AB, Van Eck M (2016). Lipoproteins as modulators of atherothrombosis: From endothelial function to primary and secondary coagulation. *Vasc Pharmacol* 82: 1–10.
17. Wang T, Butany J (2017). Pathogenesis of atherosclerosis. *Diagn Histopathol* 23(11): 473–478.
18. Pietta PG, Gardana C, Pietta AM (2002). Analytical methods for quality control of propolis. *Fitoterapia* 73: 7-20.
19. 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.
20. Przybyłek I, Karpiński TM (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules* 24(11): 2047.
21. 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 Altern Med* 2017.
22. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft EM, Breslow JL (1992). Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell* 71(2): 343–353.
23. Farley A, McLafferty E, Hendry C (2012). The cardiovascular system. *Nurs Stand*

- (Royal College of Nursing 1987) 27(9): 35–39.
24. Prabhakaran D, Anand S, Reddy KS (2022). Public health approach to cardiovascular disease prevention & management (1st ed.). CRC press: health and social care, medicine, dentistry, nursing & allied health, Boca raton: 270.
 25. Dahlöf B (2010). Cardiovascular disease risk factors: epidemiology and risk assessment. *Am J Cardiol* 105(1): 3-9.
 26. Roth GA, Abate D, Abate KH, Abay SM, Abbafati C, Abbasi N, Abbastabar H, Abd-Allah F, Abdela J, Abdelalim A, Borschmann R (2018). Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *The Lancet* 392(10159): 1736-1788.
 27. Soppert J, Lehrke M, Marx N, Jankowski J, Noels H (2020). Lipoproteins and lipids in cardiovascular disease: from mechanistic insights to therapeutic targeting. *Adv Drug Deliv Rev* 159: 4–33.
 28. Lopez EO, Ballard BD, Jan A (2023). Cardiovascular disease. In StatPearls Publishing, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535419/>
 29. 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* 23(6): 3346.
 30. Roth GA, Mensah GA, Johnson CO, Addolorato G, Ammirati E, Baddour LM, Barengo NC, Beaton AZ, Benjamin EJ, Benziger CP, Bonny A, Brauer M, Brodmann M, Cahill T J, Carapetis J, Catapano AL, Chugh SS, Cooper LT, Coresh J, Criqui M (2020). Global burden of cardiovascular diseases and risk factors, 1990-2019: Update from the GBD 2019 Study. *J Am Coll Cardiol* 76(25): 2982–3021.
 31. Türkiye İstatistik Kurumu (2019). Ölüm ve Ölüm Nedeni İstatistikleri 2019. Available from: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-ve-Olum-Nedeni-Istatistikleri-2019-33710>
 32. Dimina L, Mariotti F (2019). The postprandial appearance of features of cardiometabolic risk: acute induction and prevention by nutrients and other dietary substances. *Nutrition* 11(9): 1963.

33. Bays HE, Kulkarni A, German C, Satish P, Iluyomade A, Dudum R, Thakkar A, Rifai M Al, Mehta A, Thobani A (2022). Ten things to know about ten cardiovascular disease risk factors – 2022. *AM J Prevent Cardiol* 10: 100342.
34. Kayama Y, Raaz U, Jagger A, Adam M, Schellinger IN, Sakamoto M, Suzuki H, Toyama K, Spin JM, Tsao PS (2015). Diabetic cardiovascular disease induced by oxidative stress. *Int J Mol Sci* 16: 25234–25263.
35. Panda P, Verma HK, Lakkakula S, Merchant N, Kadir F, Rahman S, Jeffree MS, Lakkakula BV, Rao PV (2022). Biomarkers of oxidative stress tethered to cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2022.
36. Chen K, Keaney JF (2012). Evolving concepts of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Curr Atheroscler Rep* 14: 476–483.
37. Van der Pol A, Van Gilst WH, Voors AA, Van der Meer P (2019). Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. *Eur J Heart Fail* 21(4): 425–435.
38. Lippi G, Plebani M (2017). Statins for primary prevention of cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci* 38(2): 111–112.
39. Dubois-deruy E, Peugnet V, Turkieh A, Pinet F (2020). Oxidative stress in cardiovascular diseases. *Antioxidants* 9(9): 864.
40. Circu ML, Aw TY (2010). Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med* 48(6): 749–762.
41. Batty M, Bennett MR, Yu E (2022). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Cells* 11(23): 3843.
42. Thongtang N, Sukmawan R, Llanes EJB, Lee ZV (2022). Dyslipidemia management for primary prevention of cardiovascular events: Best in-clinic practices. *Prev Med Rep* 27: 101819.
43. Rader DJ (2016). New therapeutic approaches to the treatment of dyslipidemia. *Cell Metab* 23: 405–412.
44. TEMD (2019). Obezite Tanı ve Tedavi Kılavuzu: Obezite, Lipid Metabolizması, Hipertansiyon Çalışma Grubu, 8. Baskı Ankara.
45. Campinho P, Vilfan A, Vermot J (2020). Blood flow forces in shaping the vascular

- system: A focus on endothelial cell behavior. *Front Physiol* 11: 1–12.
46. Gimbrone JMA, García-Cardena G (2013). Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*, 22(1): 9-15.
 47. Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, Van Zandvoort MAMJ, Oude Egbrink MGA (2007). The endothelial glycocalyx: Composition, functions, and visualization. *Pflug Arch Eur J* 454: 345–359.
 48. Hadi HAR, Carr CS, Al Suwaidi J (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vasc Health Risk Manag* 1: 183–198.
 49. Libby P (2001). Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104(3): 365–372.
 50. Maiolino G, Rossitto G, Caielli P, Bisogni V, Rossi GP, Calò LA (2013). The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis: the myths and the facts. *Mediat Inflamm* 2013.
 51. Boyle EC, Sedding DG, Haverich A (2017). Targeting vasa vasorum dysfunction to prevent atherosclerosis. *Vasc Pharmacol* 96–98: 5–10.
 52. Furchgott RF, Vanhoutte PM (1989). Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The FASEB J* 3(9): 2007–2018.
 53. Glass CK, Witztum JL (2001). Atherosclerosis. The road ahead. *Cell* 104: 503–516.
 54. Hua J (2015). Patterns of low density lipoprotein are determinants in the induction of nitroxidative stress in cardiovascular system. PhD Thesis, Ohio University, USA.
 55. Fung KYY (2021). Apolipoprotein A1 and high-density lipoprotein as a cargo and regulator of endothelial transcytosis. PhD Thesis, University of Toronto, Canada.
 56. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014.
 57. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl HJG (1992). The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13: 341–390.
 58. Brown MS, Goldstein JL (1983). Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 52:

223–261.

59. Poznyak AV, Nikiforov NG, Mark AM, Kashirskikh DA, Myasoedova VA, Gerasimova E V, Orekhov AN (2021). Overview of OxLDL and its impact on cardiovascular health: focus on atherosclerosis. *Front pharmacol* 11: 1–11.
60. Pirillo A, Norata GD, Catapano AL (2013). LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis. *Mediat Inflamm* 2013.
61. Sentinelli F, Filippi E, Fallarino M, Romeo S, Fanelli M, Buzzetti R, Berni A, Baroni MG (2006). The 3'-UTR C > T polymorphism of the oxidized LDL-receptor 1 (OLR1) gene does not associate with coronary artery disease in Italian CAD patients or with the severity of coronary disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 16(5): 345–352.
62. Liu X, Wang L, Cai J, Liu K, Liu M, Wang H, Zhang H (2019). N-acetylcysteine alleviates H₂O₂-induced damage via regulating the redox status of intracellular antioxidants in H9C2 cells. *Int J Mol Med* 43: 199–208.
63. Berbée JFP, Mol IM, Milne GL, Pollock E, Hoeke G, Lütjohann D, Monaco C, Rensen PCN, Van der Ploeg LHT, Shchepinov MS (2017). Deuterium-reinforced polyunsaturated fatty acids protect against atherosclerosis by lowering lipid peroxidation and hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 264: 100–107.
64. Duan H, Song P, Li R, Su H, He L (2023). Attenuating lipid metabolism in atherosclerosis: The potential role of Anti-oxidative effects on low-density lipoprotein of herbal medicines. *Front Pharmacol* 14: 1–14.
65. Jiang H, Zhou Y, Nabavi SM, Sahebkar A, Little PJ, Xu S, Weng J, Ge J (2022). Mechanisms of oxidized LDL-mediated endothelial dysfunction and its consequences for the development of atherosclerosis. *Front Cardio Med* 9: 1–11.
66. Minami M, Kume N, Kataoka H, Morimoto M, Hayashida K, Sawamura T, Masaki T, Kita T (2000). Transforming growth factor- β 1 increases the expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 357–361.
67. Liu N, Zhang B, Sun Y, Song W, Guo S (2021). Macrophage origin, phenotypic diversity, and modulatory signaling pathways in the atherosclerotic plaque microenvironment. *Vessel Plus* 5.

68. Ivanova EA, Myasoedova VA, Melnichenko AA, Grechko AV, Orekhov AN (2017). Small dense low-density lipoprotein as biomarker for atherosclerotic diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2017.
69. Zhang S, Li L, Chen W, Xu S, Feng X, Zhang L (2021). Natural products: The role and mechanism in low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Phytother Res* 35: 2945–2967.
70. Jialal I, Fuller CJ (1995). Effect of vitamin E, vitamin C and beta-carotene on LDL oxidation and atherosclerosis. *Can J Cardiol*, 11 Suppl G, 97G–103G.
71. Qiao YN, Zou YL, Guo SD (2022). Low-density lipoprotein particles in atherosclerosis. *Front Physiol* 13: 1–15.
72. Chen XP, Du GH (2007). Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1: protein, ligands, expression and pathophysiological significance. *Chin Med J* 120: 421–426.
73. Ayaz L (2011). Okside ldl reseptör-1 (OLR-1) geni g501c tek nükleotid polimorfizminin koroner arter hastalığında risk olarak değerlendirilmesi. Doktora tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin
74. Malikova F, Aydogan HY, Oztürk, O, Bugra Z, Gömleksiz ÖK (2023). OLR1 Geni 3'UTR 188 C>T Polimorfizmi: Koroner arter hastalarında serum okside LDL düzeylerine ve metabolik parametrelere etkileri. *IGUSABDER* 19: 82–97.
75. Mehta JL, Li DY (1998). Identification and autoregulation of receptor for Ox-LDL in cultured human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 248: 511–514.
76. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Masaki T (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 386 (6620): 73-77.
77. Draude G, Hrboticky N, Lorenz RL (1999). The expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down-regulation by lovastatin. *Biochem Pharmacol* 57: 383–386.
78. Zhang L, Jia YH, Zhao XS, Zhou FH, Pan YY, Wan Q, Cui XB, Sun XG, Chen YY, Zhang Y (2016). Trichosanatine alleviates oxidized low-density lipoprotein induced

endothelial cells injury via inhibiting the LOX-1/p38 MAPK pathway. *Am J Transl Res* 8: 5455–5464.

79. Xu S, Ogura S, Chen J, Little PJ, Moss JLP (2012). LOX-1 in atherosclerosis: biological functions and pharmacological modifiers. *Cell Mol Life Sci* 70: 2859-2872.
80. Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Campagnola M, Pastorino AM, Lo Cascio V, Sawamura T (2001). The binding of oxidized low density lipoprotein (Ox-ldl) to ox-ldl receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem* 276: 13750–13755.
81. Yu J, Li Y, Li M, Qu Z, Ruan Q (2010). Oxidized low density lipoprotein-induced transdifferentiation of bone marrow-derived smooth muscle-like cells into foam-like cells in vitro. *Int J Exp Pathol* 91: 24–33.
82. Değirmenci U, Yıldırım MYS (2020). Ateroskleroz patofizyolojisiinde kruppel benzeri faktör 14'ün rolü. *MEÜ Sağlık Bilimleri Dergisi* 13: 241–248.
83. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Prada GI (2015). Oxidized LDL and NO synthesis- Biomarkers of endothelial dysfunction and ageing. *Mech Ageing Dev* 151: 101–113.
84. Vink H, Constantinescu AA, Spaan JAE (2000). Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer: Implications for platelet-endothelial cell adhesion. *Circulation* 101: 1500–1502.
85. Koca HB (2007). Koroner arter hastalarında lipid ve protein oksidasyonu ile selenyum içeren antioksidanların düzeyi. Yüksek lisans tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Afyon
86. Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris Nikolaos Papageorgiou C, Stefanadis C (2012). The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* 10: 4–18.
87. Değirmenci U (2019). Koroner arter hastalıklarında kruppel benzeri faktör 2 gen varyasyonlarının araştırılması. Doktora tezi, Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı, Mersin
88. Arslantürk O (2020). Koroner bypass cerrahisinde kullanılan internal mammarian arter, radial arter ve safen ven greftlerinde endotelial Ox-LDL reseptör miktarlarının

karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara

89. Malekmohammad K, Bezsonov EE, Rafieian-Kopaei M (2021). Role of lipid accumulation and inflammation in atherosclerosis: Focus on molecular and cellular mechanisms. *Front Cardiovasc Med* 8: 1–16.
90. Kong P, Cui ZY, Huang XF, Zhang DD, Guo RJ, Han M (2022). Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention. *Signal Transduct Target Ther* 7.
91. Lusta KA, Poznyak AV, Sukhorukov VN, Eremin II, Nadelyaeva II, Orekhov AN (2023). Hypotheses on atherogenesis triggering: Does the infectious nature of atherosclerosis development have a substruction. *Cells* 12: 1–17.
92. Orekhov AN, Nikiforov NG, Sukhorukov VN, Kubekina MV, Sobenin IA, Wu WK, Fox KK, Pintus S, Stegmaier P, Stelmashenko D, Oishi Y (2020). Role of phagocytosis in the pro-inflammatory response in LDL-induced foam cell formation; a transcriptome analysis. *Int J Mol Sci* 21(3): 817.
93. Mitra S, Deshmukh A, Sachdeva R, Lu J, Mehta JL (2011). Oxidized low-density lipoprotein and atherosclerosis implications in antioxidant therapy. *Am J Med Sci* 342: 135–142.
94. Brown MS, Goldstein JL (1974). Familial hypercholesterolemia: Defective binding of lipoproteins to cultured fibroblasts associated with impaired regulation of hydroxy 3 methylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 71: 788–792.
95. Brown MS, Dana SE, Goldstein JL (1974). Regulation of 3 Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase activity in cultured human fibroblasts comparison of cells from a normal subject and from a patient with homozygous familial hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 249: 789-796.
96. Ahmadi A, Panahi Y, Johnston TP, Sahebkar A (2021). Antidiabetic drugs and oxidized low-density lipoprotein: a review of anti-atherosclerotic mechanisms. *J Pharm Res* 172: 105819.
97. Malekmohammad K, Sewell RDE, Rafieian-Kopaei M (2019). Antioxidants and

- atherosclerosis: Mech aspects Biomol 9: 1–19.
98. Siekmeier R, Steffen C, März W (2007). Review: Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: Results of in vitro and in vivo investigations. *J Cardiovasc Pharm T* 12: 265–282.
 99. Vogiatzi GD, Tousoulis D, Stefanadis C (2009). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hell J Cardiol* 50(5): 402–409.
 100. Heinecke JW (1997). Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 8: 268–274.
 101. Parthasarathy S, Raghavamenon A, Garelnabi MO, Santanam N (2010). Oxidized low-density lipoprotein. *F Radic Antiox Prot* 403–417.
 102. Park JS, Bae SH (2021). Interplay between saturated free fatty acids and mmLDL induces inflammation in LPS-stimulated macrophages. *Korean Circ J* 51(1): 81–82.
 103. Niki E (1997). Dynamics of oxidation of LDL and its inhibition by antioxidants. *BioFactors* 6: 201–208.
 104. Yoshida H, Kisugi R (2010). Mechanisms of LDL oxidation. *Clinica Chimica Acta* 411: 1875–1882.
 105. Liu N, Si Y, Zhang Y, Guo S, Qin S (2021). Human cholesteryl ester transport protein transgene promotes macrophage reverse cholesterol transport in C57BL/6 mice and phospholipid transfer protein gene knockout mice. *J Phys Biochem* 77: 683–694.
 106. Lin P, Ji HH, Li YJ, Guo SD (2021). Macrophage plasticity and atherosclerosis therapy. *Front mol biosci* 8: 1–21.
 107. Luo L, Liang H, Liu L (2022). Myristicin regulates proliferation and apoptosis in oxidized low-density lipoprotein-stimulated human vascular smooth muscle cells and human umbilical vein endothelial cells by regulating the PI3K/Akt/NF- κ B signalling pathway. *Pharm Biol* 60: 56–64.
 108. Wraith KS, Magwenzi S, Aburima A, Wen Y, Leake D, Naseem KM (2013). Oxidized low-density lipoproteins induce rapid platelet activation and shape change through tyrosine kinase and Rho kinase–signaling pathways. *Blood* 122: 580–589.
 109. Podrez EA, Byzova TV, Febbraio M, Salomon RG, Ma Y, Valiyaveetil M, Poliakov

- E, Sun M, Finton PJ, Curtis BR (2007). Platelet CD36 links hyperlipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med* 13: 1086–1095.
110. Hofmann A, Brunssen C, Morawietz H (2018). Contribution of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 and LOX-1 modulating compounds to vascular diseases. *Vasc Pharma* 107: 1–11.
 111. Haberland ME, Mottino G, Le M, Frank JS (2001). Sequestration of aggregated LDL by macrophages studied with freeze-etch electron microscopy. *J Lipid Res* 42: 605–619.
 112. Sakakura K, Nakano M, Otsuka F, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R (2013). Pathophysiology of atherosclerosis plaque progression. *Heart Lung Circ* 22: 399–411.
 113. Linton MF, Yancey PG, Davies SS, Jerome WG, Linton EF, Song WL, Vickers KC (2019). The role of lipids and lipoproteins in atherosclerosis. *Endotext* 2000-2024.
 114. Wali JA, Jarzebska N, Raubenheimer D, Simpson SJ, Rodionov RN, Sullivan JFO (2006). Cardio-metabolic effects of high-fat diets and their underlying mechanisms mechanisms-a narrative review. *Nutrients* 12(5): 1505.
 115. Kakimoto PA, Kowaltowski AJ (2016). Effects of high fat diets on rodent liver bioenergetics and oxidative imbalance. *Red Biol* 8: 216–225.
 116. Hariri N, Thibault L (2010). High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23: 270–299.
 117. Park HG, Lee YR, Jun JK, Lee WL (2014). Exercise training is more effective than resveratrol supplementation on alleviation of inflammation in peritoneal macrophages of high fat diet mice. *J Exerc Nutrition Biochem* 18: 79–87.
 118. Calleja L, París MA, Paul A, Vilella E, Joven J, Jiménez A, Beltrán G, Uceda M, Maeda N, Osada J (1999). Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2368–2375.
 119. Swindell WR, Johnston A, Gudjonsson JE (2010). Transcriptional profiles of leukocyte populations provide a tool for interpreting gene expression patterns associated with high fat diet in mice. *Plos One* 5(7): 11861.
 120. Heindel JJ, Howard S, Agay-Shay K, Arrebola JP, Audouze K, Babin PJ, Barouki R,

- Bansal A, Blanc E, Cave MC, Chatterjee S, Chevalier N, Choudhury M, Collier D, Connolly L, Coumoul X, Garruti G, Gilbertson M, Hoepner LA, Holloway AC, Howell G, Kassotis BB (2022). Obesity II: Establishing causal links between chemical exposures and obesity. *Biochem Pharmacol* 202: 115–144.
121. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC (2007). High-fat diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 15: 798–808.
 122. Wang CY, Liao JK (2012). A mouse model of diet-induced obesity and insulin resistance. *Methods Mol Biol* 821: 421–433.
 123. Poznyak AV, Silaeva YY, Orekhov AN, Deykin AV (2020). Animal models of human atherosclerosis: Current progress. *Braz J Med Biol Res* 53: 1–8.
 124. Getz GS, Reardon CA (2017). Animal models of atherosclerosis. *Animal models for the study of human disease: Sec Edit* 32: 205–217.
 125. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, De Meyer GRY (2017). Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol* 816: 3–13.
 126. Bora ES, Ozlü C (2020). Klinik Bilimlerde Deney Hayvanı Modelleri. 1. baskı Akademi yayınları, Yenışehir, Ankara, Sayfa: 155-171.
 127. Oppi S, Lüscher TF, Stein S (2019). Mouse models for atherosclerosis research—Which is my line? *Front cardiovasc med* 6: 1–8.
 128. Dominiczak MH, Caslake MJ (2011). Apolipoproteins: metabolic role and clinical biochemistry applications. *Ann Clin Biochem* 48: 498–515.
 129. Sehayek E, Shefer S, Nguyen LB, Ono JG, Merkel M, Breslow JL (2000). Apolipoprotein E regulates dietary cholesterol absorption and biliary cholesterol excretion: studies in C57BL/6 apolipoprotein E knockout mice. *Proc Natl Acad Sci* 97: 3433–3437.
 130. Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, Breslow JL, Frank JS (1999). Ultrastructure of early lipid accumulation in apoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 847–853.
 131. Lo Sasso G, Schlage WK, Boué S, Veljkovic E, Peitsch MC, Hoeng J (2016). The Apoe^{-/-} mouse model: A suitable model to study cardiovascular and respiratory

- diseases in the context of cigarette smoke exposure and harm reduction. *J Transl Med* 14: 1–16.
132. Kawai T, Elliott KJ, Scalia R, Eguchi S (2021). Contribution of ADAM17 and related ADAMs in cardiovascular diseases. *Cell Mol Life Sci* 78: 4161–4187.
 133. Lovren F, Pan Y, Quan A, Teoh H, Wang G, Shukla PC, Levitt KS, Oudit GY, Al-Omran M, Stewart DJ (2008). Angiotensin converting enzyme-2 confers endothelial protection and attenuates atherosclerosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: 1377–1384.
 134. 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 Vasc Biol* 14(1): 133-140
 135. Goloroush P, Yellon DM, Davidson SM (2020). Mouse models of atherosclerosis and their suitability for the study of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 115: 1–24.
 136. Jawień J, Nastalek P, Korbut R (2004). Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol* 55: 503–517.
 137. Andrés-manzano MJ, Andrés V, Dorado B (2015). Methods in mouse atherosclerosis. *Methods Mol Biol* 1339: 85–99.
 138. Ahangari Z, Naseri M, Vatandoost F (2018). Propolis: chemical composition and its applications in endodontics. *Iran Endod J* 13: 285–292.
 139. Propolis-bee-glue-pieces-of-propolis-isolated-on-a-white-background-natural-remedies (n.d.). . Available from: <https://stock.adobe.com/tr/images/>. [Accessed 16 Agust 2023].
 140. Silva H, Francisco R, Saraiva A, Francisco S, Carrascosa C, Raposo A (2021). The cardiovascular therapeutic potential of propolis—a comprehensive review. *Biology* 10: 1–20.
 141. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxid Med Cell Longev* 2017.
 142. Castaldo S, Capasso F (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine.

Fitoterapia 73: 1–6.

143. Huang S, Zhang CP, Wang K, Li GQ, Hu FL (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules* 19: 19610–19632.
144. Pahlavani N, Malekhamadi M, Firouzi S, Rostami D, Sedaghat A, Moghaddam AB, Ferns GA, Navashenaq JG, Reazvani R, Safarian M (2020). Molecular and cellular mechanisms of the effects of propolis in inflammation, oxidative stress and glycemic control in chronic diseases. *Nutr Metab* 17: 1–12.
145. Marcucci MC (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26(2): 83-99.
146. Bhargava P, Mahanta D, Kaul A, Ishida Y, Terao K, Wadhwa R, Kaul SC (2021). Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis. *Nutrients* 13: 1–23.
147. Kuropatnicki AK, Szliszka E, Krol W (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *J Evid Based Complementary Altern* 2013.
148. Akbar A, Gul Z, Aziz S, Sadiq MB, Achakzai JK, Saeed S, Chein SH, Sher H (2022). Bio-functional potential and biochemical properties of propolis collected from different regions of balochistan province of pakistan. *Oxid Med Cell Longev* 2022, 7585406.
149. Rivero-Cruz JF, Granados-Pineda J, Pedraza-Chaverri J, Pérez-Rojas JM, Kumar-Passari A, Diaz-Ruiz G, Rivero-Cruz BE (2020). Phytochemical constituents, antioxidant, cytotoxic, and antimicrobial activities of the ethanolic extract of mexican brown propolis. *Antioxidants* 9: 1–11.
150. Martinotti S, Ranzato E (2015). Propolis: a new frontier for wound healing?. *Burns and trauma* 3: 1-7.
151. Sforcin JM (2016). Biological properties and therapeutic applications of propolis. *Phytother res* 30(6): 894-905.
152. Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan SH (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 1259510.
153. Sforcin JM, Bankova V (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J. Ethnopharmacol* 133(2): 253–260.

154. Nattagh-Eshtivani E, Pahlavani N, Ranjbar G, Gholizadeh NJ, Salehi-Sahlabadi A, Mahmudiono T, Nader SM, Jokar M, Nematy M, Barghchi H, Havakhah S, Maddahi M, Rashidmayvan M, Khosravi M (2022). Does propolis have any effect on rheumatoid arthritis? *Int J Food Sci Nutr* 10(4), 1003–1020.
155. Šuran J, Ceganec I, Mašek T, Radic B, Tlak Gajger I, Vlainić J (2021). Propolis extract and its bioactive compounds from. *Molecules* 26(10): 2930.
156. Hsiao G, Lee JJ, Lin KH, Shen CH, Fong TH, Chou DS, Sheu JR (2007). Characterization of a novel and potent collagen antagonist, caffeic acid phenethyl ester, in human platelets: in vitro and in vivo studies. *Cardiovasc Res* 75: 782–792.
157. Liang Y, Feng G, Wu L, Zhong S, Gao X, Tong Y, Cui W, Qin Y, Xu W, Xiao X, Zhang Z, Huang G, Zhou X (2019). Caffeic acid phenethyl ester suppressed growth and metastasis of nasopharyngeal carcinoma cells by inactivating the NF- κ B pathway. *D Drug Des Devel Ther* 13: 1335–1345.
158. Wolska K, Górska A, Antosik K, Ługowska K (2019). Immunomodulatory effects of propolis and its components on basic immune cell functions. *Indian J Pharm Sci* 81: 575–588.
159. Ramos AFN, Miranda JD (2007). Propolis: A review of its anti-inflammatory and healing actions. *J Venom Anim Toxins Trop Dis* 13: 697-710.
160. Zhang W, Cai Y, Chen X, Ji T, Sun L (2020). Optimized extraction based on the terpenoids of heterotrigona itama propolis and their antioxidative and anti-inflammatory activities. *J Food Biochem* 44: 1–12.
161. Farooqui T, Farooqui AA (2012). Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Front biosci* 4(2): 779–793.
162. Ni J, Wu Z, Meng J, Zhu A, Zhong X, Wu S, Nakanishi H (2017). The neuroprotective effects of brazilian green propolis on neurodegenerative damage in human neuronal SH-SY5Y cells. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 7984327.
163. Zakerkish M, Jenabi M, Zaeemzadeh N, Hemmati AA, Neisi N (2019). The effect of iranian propolis on glucose metabolism, lipid profile, insulin resistance, renal function and inflammatory biomarkers in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized double-blind clinical trial. *Sci Rep* 9(1): 7289.

164. Stojanović ST, Najman SJ, Popov BB, Najman SS (2020). Propolis: chemical composition, biological and pharmacological activity—a review. *Acta Med Medianae* 59(2).
165. Nna VU, Bakar ABA, Mohamed M (2018). Malaysian propolis, metformin and their combination, exert hepatoprotective effect in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 211: 40–50.
166. Olas B (2022). Bee products as interesting natural agents for the prevention and treatment of common cardiovascular diseases. *Nutrients* 14(11): 2267.
167. Ahn MR, Kunimasa K, Kumazawa S, Nakayama T, Kaji K, Uto Y, Hori H, Nagasawa H, Ohta T (2009). Correlation between antiangiogenic activity and antioxidant activity of various components from propolis. *Mol Nutr Food Res* 53: 643–651.
168. Vazhappilly CG, Ansari SA, Al-Jaleeli R, Al-Azawi AM, Ramadan WS, Menon V, Hodeify R, Siddiqui SS, Merheb M, Matar R (2019). Role of flavonoids in thrombotic, cardiovascular and inflammatory diseases. *Inflammopharmacology* 27: 863–869.
169. 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): 127-131.
170. Tian H, Sun HW, Zhang JJ, Zhang XW, Zhao L, Guo SD, Li YY, Jiao P, Wang H, Qin SC (2015). Ethanol extract of propolis protects macrophages from oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis by inhibiting CD36 expression and endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway. *BMC complement med ther* 15: 1–12.
171. Oršolić N, Sirovina D, Končić MZ, Lacković G, Gregorović G (2012). Effect of Croatian propolis on diabetic nephropathy and liver toxicity in mice. *BMC Complement Altern Med* 12: 1-16.
172. Ahmed R, Tanvir EM, Hossen MS, Afroz R, Ahmmed I, Rumpa NEN, Paul S, Gan SH, Sulaiman SA, Khalil MI (2017). Antioxidant properties and cardioprotective mechanism of Malaysian propolis in rats. *J Evid Based Complement Altern Med* 2017.

173. Miryan M, Soleimani D, Alavinejad P, Abbaspour M, Ostadrahimi A (2022). Effects of propolis supplementation on irritable bowel syndrome with constipation (IBS-C) and mixed (IBS-M) stool pattern: a randomized, double-blind clinical trial. *Food Sci Nutr* 10: 1899-1907.
174. Sang H, Yuan N, Yao S, Li F, Wang J, Fang Y, Qin S (2012). Inhibitory effect of the combination therapy of simvastatin and pinocembrin on atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Lipids Health Dis* 11: 1–9.
175. He SH, Zhang HY, Zeng XN, Chen D, Yang PC (2013). Mast cells and basophils are essential for allergies: mechanisms of allergic inflammation and a proposed procedure for diagnosis. *Acta Pharmacol Sin* 34: 1270–1283.
176. Zulkiflee N, Taha H, Usman A (2022). Propolis: its role and efficacy in human health and diseases. *Molecules* 27(18): 6120.
177. Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L, Sauvager FCM (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J Nat Prod* 57: 644–647.
178. Kwon MJ, Shin HM, Perumalsamy H, Wang X, Ahn YJ (2020). Antiviral effects and possible mechanisms of action of constituents from Brazilian propolis and related compounds. *J Apic Res* 59: 413–425.
179. Zulhendri F, Felitti R, Fearnley J, Ravalia M (2021). The use of propolis in dentistry, oral health, and medicine: A review. *J Oral Biosci* 63: 23–34.
180. Simon F, Larena-Avellaneda A, Wipper S (2022). Experimental atherosclerosis research on large and small animal models in vascular surgery. *J Vasc Res* 59: 221–228.
181. 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.
182. 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, Muss MP (2017). Heart disease and stroke statistics-

2017 update: a report from the JAHA 135(10): 146-603.

183. Kaminsky LA, German C, Imboden M, Ozemek C, Peterman JE, Brubaker PH (2022). The importance of healthy lifestyle behaviors in the prevention of cardiovascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 70: 8–15.
184. Mach F, Baigent C, Catapano AL, Koskinas KC, Casula M, Badimon L, Chapman MJ, De Backer GG, Delgado V, Ference BA, Graham IM, Halliday A, Landmesser U, Mihaylova B, Pedersen TR, Riccardi G, Richter DJ, Sabatine MS, Taskinen MR, Tokgozoglu L WO (2020). Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *Eur Heart J* 41: 111–188.
185. Batty M, Bennett MR (2022). The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Cells* 11: 3843.
186. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura YKT (1997). An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nat Med* 3: 73–77.
187. Wang D, Yang Y, Lei Y, Tzvetkov NT, Liu X, Kan Yeung AW, Xu S, Atanasov AG (2019). Targeting foam cell formation in atherosclerosis: Therapeutic potential of natural products. *Pharmacol Rev* 71: 596–670.
188. Akhmedov A, Rozenberg I, Paneni F, Camici GG, Shi Y, Doerries C, Sledzinska A, Mocharla P, Breitenstein A, Lohmann C (2014). Endothelial overexpression of LOX-1 increases plaque formation and promotes atherosclerosis in vivo. *Eur Heart J* 35: 2839-2848.
189. Xu S, Ilyas I, Little PJ, Li H, Kamato D, Zheng X, Luo S, Li Z, Liu P, Han J (2021). Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: from mechanism to pharmacotherapies. *Pharmacol Rev* 73: 924–967.
190. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR (1990). The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee world* 71(3): 107-118.
191. Bozkuş TN, Değer O, Yaşar A (2021). Chemical characterization of water and ethanolic extracts of Turkish propolis by HPLC-DAD and GC-MS. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 44: 77–86.
192. Fang Y, Sang H, Yuan N, Sun H, Yao S, Wang J, Qin S (2013). Ethanolic extract of

- propolis inhibits atherosclerosis in ApoE-knockout mice. *Lipids Health Dis* 12: 1-6.
193. Daleprane JB, da Silva Freitas V, Pacheco A, Rudnicki M, Faine LA, Dörr FA, Ikegaki M, Salazar LA, Ong TP, Abdalla DSP (2012). Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *J Nutr Biochem* 23: 557–566.
 194. Oršolić N, Jurčević IL, Đikić D, Rogić D, Odeh D, Balta V, Junaković EP, Terzić S, Jut-rić D (2019). Effect of propolis on diet-induced hyperlipidemia and atherogenic indices in mice. *Antioxidants* 8(6): 156.
 195. Azab EA, Algridi MA, Lashkham NM (2015). Hypolipidemic and antiatherogenic effects of aqueous extract of Libyan propolis in lead acetate intoxicated male albino mice. *IJSR* 4(3): 1060-1068.
 196. Mukhopadhyay R (2013). Mouse models of atherosclerosis: explaining critical roles of lipid metabolism and inflammation. *J Appl Genet* 54: 185–192.
 197. Von SM, Zhao Y, Kurt Z, Pan C, Zeng LYX (2017). Applications and limitations of mouse models for understanding human atherosclerosis. *Cell Metab* 25: 248–61.
 198. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N (1992). Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 258 (5081): 468-471.
 199. 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: 1938–1944.
 200. Smith JD, Breslow JL (1997). The emergence of mouse models of atherosclerosis and their relevance to clinical research. *J Intern Med* 242: 99–109.
 201. Defesche JC (2004). Low-density lipoprotein receptor—its structure, function, and mutations. *Semin Vasc Med* 4(1): 5–11.
 202. Goldstein JL BM (2001). Molecular medicine. The cholesterol quartet. *Science* 18: 5520.
 203. Whitman SC, Ravisankar PDA (2002). IFN-gamma deficiency exerts genderspecific effects on atherogenesis in apolipoprotein E^{-/-} mice. *J Interferon Cytokine Res* 22: 661–670.

204. Goetz LG, Mamillapalli R, Sahin C, Majidi-Zolbin M, Ge G, Mani A, Taylor HS (2019). Addition of estradiol to cross-sex testosterone therapy reduces atherosclerosis plaque formation in female ApoE^{-/-} mice. *Endocrinology* 159: 754–762.
205. Furbee JW, 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: 3511–3519.
206. Okamura T, Hamaguchi M, Bamba R, Nakajima H, Yoshimura Y, Kimura T, Hashimoto Y, Majima S, Senmaru T, Ushigome E (2022). Brazilian green propolis improves gut microbiota dysbiosis and protects against sarcopenic obesity. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 13: 3028–3047.
207. Sakai T, Ohhata M, Fujii M, Oda S, Kusaka Y, Matsumoto M, Nakamoto A, Taki T, Nakamoto MSE (2017). Brazilian green propolis promotes weight loss and reduces fat accumulation in C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Biol Pharm Bull* 40: 391–395.
208. 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: 2022–2028.
209. 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.
210. Yigit E, Deger O, Korkmaz K, Huner YM, Uydu HA, Mercantepe T, Demir S (2024). Propolis reduces inflammation and dyslipidemia caused by high-cholesterol diet in mice by lowering ADAM10/17 activities. *Nutrients* 16(12):1861.
211. 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. *Adipocyte* 2: 227–236.
212. Turner PV, Brabb T, Pekow C, Vasbinder MA (2011). Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *JAALAS* 50(5):600-613.
213. Martins T, Matos AF, Soares J, Leite R, Pires MJ, Ferreira T, Antunes LM (2022). Comparison of gelatin flavors for oral dosing of C57BL/6J and FVB/N mice. *JAALAS* 61(1): 89-95.

214. Jiang H, Zhou Y, Nabavi SM, Sahebkar A, Little PJ, Xu S, Weng J, Ge J (2022). Mechanisms of oxidized LDL-mediated endothelial dysfunction and its consequences for the development of atherosclerosis. *Front Cardiovasc Med* 9: 925923.
215. Fang Y, Li J, Ding M, Xu X, Zhang J, Jiao P, Han P, Wang J, Yao S (2014). Ethanol extract of propolis protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein-induced injury by inhibiting lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1-mediated oxidative stress. *Exper Biol Med* 239: 1678-1687.
216. Yuan W, Chang H, Liu X, Wang S, Liu H, Xuan H (2019). Brazilian Green Propolis Inhibits OxLDL-Stimulated Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Partly through PI3K/Akt/mTOR-Mediated Nrf2/HO-1 Pathway. *eCAM* 2019: 5789574.
217. Yang T, Minami M, Yoshida K, Nagata M, Yamamoto Y, Takayama N, Suzuki K, Miyata T, Okawa M, Miyamoto S (2022). Niclosamide downregulates LOX-1 expression in mouse vascular smooth muscle cells and changes the composition of atherosclerotic plaques in ApoE^{-/-} mice. *Heart and Vessels* 37: 517–527.
218. Chang H, Yuan W, Wu H, Yin X, Xuan H (2018). Bioactive components and mechanisms of Chinese poplar propolis alleviates Ox-LDL induced endothelial cells injury. *BMC Complement Altern Med* 18: 1–11.
219. Akhmedov A, Sawamura T, Chen CH, Kraler S, Vdovenko D, Lüscher TF (2021). LOX-1: a crucial driver of atherosclerotic cardiovascular disease. *Eur Heart J* 42(18):1797–1807.
220. Xiao L, Liu L, Guo X, Zhang S, Wang J, Zhou F, Tang Y, Yao P (2017). Quercetin attenuates high fat diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice: a critical role of NADPH oxidase. *Food Chem Toxicol* 105: 22–33.
221. Li F, Zhang T, He Y, Gu W, Yang X, Zhao R, Yu J (2020). Inflammation inhibition and gut microbiota regulation by TSG to combat atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice. *J Ethnopharmacol* 247: 112232.
222. Roos TU, Heiss EH, Schwaiberger AV, Schachner D, Sroka IM, Oberan T, Dirsch VM (2011). Caffeic acid phenethyl ester inhibits PDGF-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of p38 MAPK, HIF-1 α , and heme oxygenase-1. *J Nat Prod* 74(3): 352-356.

223. Chavda VP, Chaudhari AZ, Teli D, Balar P, Vora L (2023). Propolis and its active components for chronic diseases. Biomedical 11(2):259.





EKLER

EK 2. Özet Grafik

