

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Biyokimya Anabilim Dalı**

**DARBEOETİN TEDAVİSİNİN APOLİPOPROTEİN E  
YETMEZLİKLİ (APOE KNOCK-OUT) FARELERDE  
ATEROSKLEROZ GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ VE  
ATEROSKLEROZDA PROTEİN DEĞİŞİKLİKLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Evrin ÖZDEMİR (DURSUN)**

**Doktora Tezi**

**Antalya, 2009**

T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Biyokimya Anabilim Dalı

**DARBEOETİN TEDAVİSİNİN APOLİPOPROTEİN E  
YETMEZLİKLİ (APOE KNOCK-OUT) FARELERDE  
ATEROSKLEROZ GELİŞİMİNDEKİ ROLÜ VE  
ATEROSKLEROZDA PROTEİN DEĞİŞİKLİKLERİNİN  
İNCELENMESİ**

**Evrin ÖZDEMİR (DURSUN)**

**Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Tomris ÖZBEN**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
ve Tübitak tarafından desteklenmiştir.  
(BAP Proje no: 2006.03.0122.004)  
(SBAG-HD-203(107S002))

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

**Antalya, 2009**

## **Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 tarih ve 02/09 sayılı Enstitü Kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisansüstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayının listesi aşağıdadır (Orjinali ekte sunulmuştur).

1. **Dursun E**, Monari E, Cuoghi A, Bergamini S, Ozben B, Suleymanlar G, Tomasi A, Ozben T. Proteomic profiling during atherosclerosis progression using SELDI-TOF-MS: Effect of darbepoetin treatment. Acta Histochem. Jun 3, 2009.

**Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;**

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir. .... /..... /.....

**Tez Danışmanı** : Prof. Dr. Tomris ÖZBEN  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı



**Üye** : Prof. Dr. Gültekin YÜCEL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı



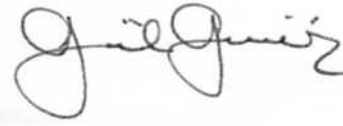
**Üye** : Prof. Dr. Saadet GÜMÜŞLÜ  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı



**Üye** : Doç. Dr. Gültekin SÜLEYMANLAR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
İç Hastalıkları Anabilim Dalı



**Üye** : Doç. Dr. Gül GÜNER  
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı



**Onay:**

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun .... /..... /..... tarih ve .... /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

**Prof Dr. İsmail ÜSTÜNEL**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Ateroskleroz ve aterosklerozla ilişkili komplikasyonlar tüm dünyada ölümlerin en önemli sebebi olarak bilinmektedir. İnflamasyon, artmış oksidatif stres ile ilişkili vasküler hasar, endotelial disfonksiyonu ilerletirken aterosklerotik lezyonlara neden olur. Uzun etkili bir eritropoietin türevi olan darbepoetin, endotelial hasar ve ateroskleroz için potansiyel terepatik bir ajan olabilir.

Bu çalışmada genetik olarak manupule edilmiş ApoE<sup>-/-</sup> fareler ateroskleroz modeli olarak kullanıldı. ApoE<sup>-/-</sup> farelerde ateroskleroz ve plak oluşumu histolojik olarak görüntülendi. Aterosklerozun erken ve ilerlemiş döneminde düşük doz darbepoetin tedavisi (0.1 µg/kg) intraperitoneal olarak uygulandı. Darbepoetin tedavisi alan gruplardan elde edilen sonuçlar salin uygulanan grupların sonuçları ile karşılaştırıldı.

Lipid profili (kolesterol, trigliserid), inflamasyon (CRP, IL-6 ve histamin), endotelial hasar (ICAM-1 ve selektin) ve oksidatif stres belirteçleri aterosklerotik grupta kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek bulundu. Darbepoetin tedavisinin hem erken hem de ileri aterosklerozda lipid profili, inflamasyon, endotelial hasar belirteçleri üzerine anlamlı etkisi olmadığı gösterildi. Bunun yanında, darbepoetin- $\alpha$  tedavisi 8-isoprostan ve protein karbonil gruplarının serum düzeylerinde anlamlı artışa yol açtı.

C57BL/6 ve ApoE<sup>-/-</sup> farelerin serum örneklerinin proteomik analizi yüzeyi genişletilmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi (SELDI-TOF- MS) ile yapıldı. Proteomik sonuçlara göre, C57BL/6 ve ApoE<sup>-/-</sup> farelerin serum örneklerinde 107 peptid/protein kümesinin istatistiksel olarak farklı olduğu tespit edildi. Serum proteomik analizler ayrıca darbepoetin- $\alpha$  ile tedavi edilen ve edilmeyen ApoE<sup>-/-</sup> fare gruplarında yapıldı. 145 peptid/protein kümesinin darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplar arasında istatistiksel olarak farklı ekspresyon gösterdiği bulundu.

ApoE<sup>-/-</sup> farelerde, uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin, lipid profili, inflamasyon ve endotelial hasara etki etmezken, oksidatif stresi anlamlı azalttığı belirlendi. Diğer yandan, ateroskleroz gelişimde serum protein profilinde meydana gelen değişiklikler, aterosklerozun erken tanısında yeni biomarkır keşfine ışık tutucu niteliktedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ateroskleroz, ApoE<sup>-/-</sup> fare, proteomik, oksidatif stres, inflamasyon, endotel disfonksiyon

## ABSTRACT

Atherosclerosis and atherosclerosis related complications are the major cause of morbidity and mortality in the world. Vascular injury in response to inflammation, enhanced oxidant stress promotes endothelial dysfunction and leads to atherosclerotic lesions. Low-dose treatment with the long-acting recombinant human erythropoietin analogue darbepoetin- $\alpha$  may be a potential therapeutic tool for endothelial injury and atherosclerosis.

ApoE<sup>-/-</sup> mice were used as atherosclerotic mice model in this study. Atherosclerosis and plaque formation were monitored histochemically.

Darbepoetin- $\alpha$  was injected intraperitoneally at a dose of 0.1  $\mu$ g/kg in early and late stage of atherosclerosis. The results of this group were compared with the results of control group that injected saline instead of darbepoetin- $\alpha$ .

The levels of lipid profile (total cholesterol, triglyceride), inflammatory (CRP, IL-6 and histamine), endothelial injury (ICAM-1 and selectin) and oxidative stress markers (lipid peroxidation and protein oxidation) were significantly increased in atherosclerotic groups when compared to control group. It was shown that darbepoetin- $\alpha$  had no significant effects on serum lipid profile, or markers of inflammation and endothelial injury. However, darbepoetin- $\alpha$  significantly decreased 8-isoprostane levels and protein carbonyl content in atherosclerotic groups.

Serum proteomic analyses were performed using surface-enhanced laserdesorption/ionization-time of flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS). Proteomic analysis of serum samples of C57BL/6 and ApoE<sup>-/-</sup> mice showed that a total of 107 peptid/protein clusters were significantly changed. Serum proteomic analyses were also performed in the darbepoetin-treated and non-treated ApoE<sup>-/-</sup> mice groups. 145 peptid/protein clusters had statistically significant differences in their peak intensities between the darbepoetin- $\alpha$  treated and non-treated groups.

Long term darbepoetin- $\alpha$  treatment reduced oxidative stress in ApoE<sup>-/-</sup> mice, but not lipid profile, inflammation and endothelial injury. On the other hand proteomic study contributes to understanding the changes in serum peptid/protein profiles during atherosclerosis development and may inform discovery of new biomarkers for early diagnosis of atherosclerosis.

**Keywords:** Atherosclerosis, ApoE<sup>-/-</sup> mice, proteomics, oxidative stress, inflammation, endothelial dysfunction

## TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması ve gerçekleştirilmesindeki değerli yardımları yanısıra, yürütücüsü olduğu TÜBİTAK proje desteği ile projenin Proteomik araştırmalarında kullandığım malzemeler için gerekli maddi kaynağı temin eden ve proteomik çalışmalarını yürüttüğüm İtalya’da bulunduğum sürece FEBS’den mali destek almamı sağlayan proje yürütücüsü ve akademik danışmanım Sayın Prof.Dr Tomris ÖZBEN’e, Doktora eğitimim boyunca benimle yakından ilgilenerek gerekli eğitim ve öğrenimi almamı sağlayan tüm hocalarıma, proteomiks çalışmalarımı yapabilmem için bana Modena Üniversitesindeki laboratuvarlarını açan ve her türlü desteği sağlayan Sayın Prof.Dr. Aldo TOMASI’e, bilimsel desteğinden dolayı Sayın Prof.Dr. Gültekin SÜLEYMANLAR’a, farelerin yurtdışından temini sırasındaki çabaları için Vet.Hek. Şakir ATALAY ve farelerin bakımı ve kesimi sırasındaki yardımlarından dolayı Deney Hayvanları Ünitesi çalışanlarına, dokularının incelenmesinde bilgi ve yardımları için Doç.Dr.Emin Türkay KORGUN’a, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma ve sonsuz destekleri için eşime ve aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Evrım ÖZDEMİR (DURSUN)

## İÇİNDEKİLER

|  | SAYFA |
|--|-------|
| <b>ÖZET</b>  | v     |
| <b>ABSTRACT</b>  | vi    |
| <b>TEŞEKKÜR</b>  | vii   |
| <b>İÇİNDEKİLER</b>   | viii  |
| <b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>                             | xi    |
| <b>TABLolar DİZİNİ</b>                                     | xiii  |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>                                     | xiv   |
| <b>GİRİŞ</b>   | 1     |
| <b>GENEL BİLGİLER</b>                                      | 3     |
| 2.1. Ateroskleroz  | 3     |
| 2.2. Ateroskleroza Neden Olan Risk Faktörleri              | 3     |
| 2.3. Normal Arter Duvarı                                   | 5     |
| 2.4. Vasküler Endotelyum                                   | 5     |
| 2.5. Endotel Disfonksiyon                                  | 7     |
| 2.6. Oksidatif Stres, Endotel Disfonksiyon ve Ateroskleroz | 8     |
| 2.7. Endotel Disfonksiyon, İnflamasyon ve Ateroskleroz     | 9     |
| 2.8. Ateroskleroz Patogenezi                               | 11    |
| 2.8.1. Yağlı Çizgilenme Oluşumu                            | 11    |
| 2.8.2. Lezyonun İlerlemesi                                 | 12    |
| 2.8.3. Plak Ruptürü ve Tromboz                             | 13    |
| 2.9. Aterosklerotik Hayvan Modelleri                       | 14    |
| 2.9.1. Aterosklerotik Fare Modelleri                       | 15    |
| 2.10. Proteomik  | 17    |
| 2.10.1. SELDI-TOF-MS Sistemi                               | 18    |
| 2.10.2. Proteomik ve Ateroskleroz                          | 20    |
| 2.11. Darbepoetin  | 21    |



|   |           |
|---|-----------|
| <b>MATERYAL VE YÖNTEM</b>   | <b>23</b> |
| 3.1. Deney Hayvanları   | 23        |
| 3.1.1. Deney Grupları   | 23        |
| 3.1.2. Tedavi Planı ve Uygulama   | 23        |
| 3.1.3. Örneklerin Eldesi  | 24        |
| 3.2. Histopatolojik Analizler   | 24        |
| 3.3. Biyokimyasal Analizler   | 25        |
| 3.3.1. Trigliserid Tayini   | 25        |
| 3.3.2. Kolesterol Tayini  | 25        |
| 3.3.3. Protein Karbonil Gruplarının Tayini  | 26        |
| 3.3.4. 8-İsoprostan Tayini  | 27        |
| 3.3.5. İnterlökin-6 (IL-6) Tayini   | 29        |
| 3.3.6. Histamin Tayini  | 29        |
| 3.3.7. C-Reaktif Protein (CRP) Tayini   | 31        |
| 3.3.8. E-Selektin Tayini  | 31        |
| 3.3.9. İntraselüler Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1) Tayini  | 32        |
| 3.4. Proteomik Analizler  | 33        |
| 3.4.1. SELDI-TOF-MS Analizleri İçin Serum Örneklerinin Hazırlanması                               | 33        |
| 3.4.2. Serum Örneklerinin Fraksiyonlama İşlemleri   | 33        |
| 3.4.3. Bioprosesörün Hazırlanması   | 34        |
| 3.4.4. Chiplerin Hazırlanması ve Serum Fraksiyonlarının Uygulanması                               | 35        |
| 3.4.5. Matriks Hazırlanması ve Chip Yüzeyine Uygulanması  | 36        |
| 3.4.6. Standartın NP20 Chipine Uygulanması  | 37        |
| 3.4.7. SELDI-TOF-MS Cihazında Örneklerin ve Standardın Okunması                                   | 37        |
| 3.5. İstatistiksel Analizler  | 37        |
| 3.5.1. Proteomik Data Analizleri ve Protein Profiline Belirlenmesi                                | 37        |
| 3.5.2. Biyokimyasal Analizlerin İstatistiksel Değerlendirmesi                                     | 38        |
| 3.6. Kullanılan Gereçler ve Kimyasal Maddeler   | 38        |
| 3.6.1. Gereçler   | 38        |
| 3.6.2. Kimyasal Malzemeler  | 38        |
| <b>BULGULAR</b>   | <b>39</b> |
| 4.1. Genel Görünüm  | 39        |
| 4.2. Histopatolojik Analiz Sonuçları  | 39        |
| 4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları  | 42        |
| 4.3.1. Trigliserid Düzeyleri  | 42        |
| 4.3.2. Kolesterol Düzeyi  | 42        |
| 4.3.3. Karbonil Düzeyleri   | 43        |
| 4.3.4. 8-İsoprostan Düzeyleri   | 44        |
| 4.3.5. İnterlökin-6 (IL-6) Düzeyleri  | 45        |
| 4.3.6. Histamin Düzeyleri   | 46        |
| 4.3.7. C-Reaktif Protein (CRP) Düzeyleri  | 47        |
| 4.3.8. E-Selektin Düzeyleri   | 48        |
| 4.3.9. İntraselüler Adezyon Molekülü-1 (sICAM-1) Düzeyleri  | 49        |
| 4.4. Proteomik Analiz Verileri  | 51        |
| 4.4.1. Kontrol ve Ateroskleroz Gruplarının SELDI-TOF-MS Analiz Verileri                           | 52        |
| 4.4.2. Darbepoetin Tedavisi Alan ve Almayan Ateroskleroz gruplarının SELDI-TOF-MS Analiz Verileri | 62        |

|                  |  |
|------------------|--|
| <b>TARTIŞMA</b>  | <b>73</b>  |
| <b>SONUÇLAR</b>  | <b>80</b>  |
| <b>KAYNAKLAR</b> | <b>83</b>  |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>  | <b>94</b>  |
| <b>EKLER</b>     | <b>95</b>  |
| <b>Ek 1</b>      | “Proteomic profiling during atherosclerosis progression using SELDI-TOF-MS: Effect of darbepoetin treatment” isimli makale |

## SİMGELER VE KISALTMALAR

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>• OH</b>                       | : Hidroksil radikali   |
| <b>2-DE</b>                       | : İki dimensiyonlu elektroforez  |
| <b>ACE</b>                        | : Anjiotensin dönüştürücü enzim  |
| <b>ADP</b>                        | : Adeneozin difosfat   |
| <b>AGE</b>                        | : İleri glikasyon son ürünleri   |
| <b>ApoE</b>                       | : Apolipoprotein E   |
| <b>AT II</b>                      | : Anjiotensin 2  |
| <b>ATP</b>                        | : Adenozin trifosfat   |
| <b>CRP</b>                        | : C-reaktif protein  |
| <b>CSF</b>                        | : Koloni stimüle edici faktör  |
| <b>DKH</b>                        | : Düz kas hücreleri  |
| <b>DNA</b>                        | : Deoksiribonükleik asit   |
| <b>DNPH</b>                       | : Dinitrofenilhidrazin   |
| <b>EDHF</b>                       | : Endotel kaynaklı hiperpolarizan faktör   |
| <b>ELISA</b>                      | : Enzim bağlı immün deney  |
| <b>eNOS</b>                       | : Entotelyal nitrik oksit sentaz   |
| <b>EPO</b>                        | : Eritropoietin  |
| <b>ET-1</b>                       | : Endotelin 1  |
| <b>H<sub>2</sub>O</b>             | : Su   |
| <b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> | : Hidrojen peroksit  |
| <b>HCl</b>                        | : Hidroklorik asit   |
| <b>HDL</b>                        | : Yüksek yoğunluklu lipoprotein  |
| <b>ICAM-1</b>                     | : İntraselüler adezyon molekülü  |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>     | : İnterlökin 1 beta  |
| <b>IL-6</b>                       | : İnterlökin 6   |
| <b>kD</b>                         | : Kilodalton   |
| <b>LDL</b>                        | : Düşük yoğunluklu lipoprotein   |
| <b>m/z</b>                        | : Kütle/iyon   |
| <b>MALDI–TOF-MS</b>               | : Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi |
| <b>MCP-1</b>                      | : Monosit kemoatraktan protein 1   |
| <b>mRNA</b>                       | : Mesajcı ribonükleik asit   |
| <b>MS</b>                         | : Kütle spektrometrisi   |
| <b>NF<math>\kappa</math>B</b>     | : Nükleer faktör kapa B  |
| <b>NO</b>                         | : Nitrik oksit   |
| <b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>  | : Süperoksit anyonu  |
| <b>O<sub>2</sub></b>              | : Oksijen  |
| <b>ONOO<sup>-</sup></b>           | : Peroksinitrit  |
| <b>PAI-1</b>                      | : Plazminojen aktivatör inhibitörü 1   |

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| <b>PGH<sub>2</sub></b>         | : Prostaglandin H 2  |
| <b>PGI<sub>2</sub></b>         | : Prostaglandin I 2  |
| <b>rHu-EPO</b>                 | : Rekombinant insan eritropoietini   |
| <b>ROS</b>                     | : Reaktif oksijen türleri  |
| <b>SELDI-TOF-MS</b>            | : Yüzeyi genişletilmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi |
| <b>SR</b>                      | : Süpürücü reseptör  |
| <b>TCA</b>                     | : Trikloroasetik asit  |
| <b>TMB</b>                     | : Tetrametilbenzidin   |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | : Tümör nekrozis faktör alfa   |
| <b>TXA<sub>2</sub></b>         | : Tromboksan A 2   |
| <b>VCAM-1</b>                  | : Vasküler adezyon molekülü 1  |
| <b>VLDL</b>                    | : Çok düşük yoğunluklu lipoprotein   |

## TABLULAR DİZİNİ

| <b>Tablo</b>  | <b>Sayfa</b> |
|---|--------------|
| <b>2.1.</b> Ateroskleroz için Risk Faktörleri   | <b>4</b>     |
| <b>2.2.</b> Endotel Fonksiyonları düzenleyen Faktörler  | <b>7</b>     |
| <b>4.3.1.</b> Kontrol ve ateroskleroz gruplarında kolesterol, trigliserid, karbonil, 8-isoprostan, IL-6, histamin, CRP, e-selektin, ICAM-1 düzeyleri                        | <b>51</b>    |
| <b>4.4.1.</b> Kontrol ve ateroskleroz gruplarında sinyal yoğunlukları istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren peptid/proteinler                                     | <b>53</b>    |
| <b>4.4.2.</b> Darbepoetin- $\alpha$ tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplarda sinyal yoğunlukları istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren peptid/proteinler | <b>63</b>    |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil  | Sayfa  |    |
|--------|--|----|
| 2.1.   | Normal Arter Duvarı  | 5  |
| 2.2.   | Normal vasküler endotelin fonksiyonları  | 6  |
| 2.3.   | Endotelin antitrombotik ve protrombotik durumları  | 7  |
| 2.4.   | Endotel disfonksiyonu ve ilk aterosklerotik değişimler   | 12 |
| 2.5.   | Aterosklerozda yağlı cizgilenme oluşumu  | 12 |
| 2.6.   | Aterosklerotik lezyon oluşumu  | 13 |
| 2.7.   | Fibroz plak  | 14 |
| 2.8.   | Normal ve ApoE knock out farelerde sıvı kromatografisi ile lipoprotein fraksiyonlarında kolesterol konsantrasyonları   | 17 |
| 2.9.   | Değişik ProteinChip yüzeyleri  | 18 |
| 2.10.  | SELDI-TOF-MS sisteminin şematik görüntüsü  | 20 |
| 3.1.   | Bioprosesör  | 35 |
| 4.2.1. | Kontrol C57BL/6 farelerin aort damarından elde edilen histolojik görüntü   | 39 |
| 4.2.2. | 8 haftalık ApoE yetmezlikli (knock-out) farelerin aort damarından elde edilen histolojik görüntü   | 40 |
| 4.2.3. | 12 haftalık ApoE yetmezlikli (knock-out) farelerin aort damarından elde edilen histolojik görüntü  | 40 |
| 4.2.4. | 20 haftalık ApoE yetmezlikli (knock-out) farelerin aort damarından elde edilen histolojik görüntü  | 41 |
| 4.3.1. | Deney gruplarının trigliserid düzeyleri  | 42 |
| 4.3.2. | Deney gruplarının kolesterol düzeyleri   | 43 |
| 4.3.3. | Deney gruplarının karbonil düzeyleri   | 44 |
| 4.3.4. | Deney gruplarının 8-isoprostan düzeyleri   | 45 |
| 4.3.5. | Deney gruplarının IL-6 düzeyleri   | 46 |
| 4.3.6. | Deney gruplarının histamin düzeyleri   | 47 |
| 4.3.7. | Deney gruplarının CRP düzeyleri  | 48 |
| 4.3.8. | Deney gruplarının e-selektin düzeyleri   | 49 |
| 4.3.9. | Deney gruplarının sICAM-1 düzeyleri  | 50 |
| 4.4.1. | Kontrol ve ateroskleroz gruplarında sinyal yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı peptid/proteinlerin farklı chiplerdeki sayısı                                  | 57 |
| 4.4.2. | Fraksiyon 5/6 dan elde edilen örneklerin protein ekspresyonlarının IMAC30 chipinde yüksek lazer enerjisi kullanılarak elde edilen ısı haritası                   | 58 |
| 4.4.3. | CM10 chipinde Fraksiyon 4'den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 27945 dalton m/z değerine sahip bir proteinin jel görüntüsü | 59 |

|   |    |
|---|----|
| 4.4.4. CM10 chipinde Fraksiyon 5/6'den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 43006 dalton m/z değerine sahip bir proteinin jel görüntüsü   | 59 |
| 4.4.5. IMAC30 chipinde Fraksiyon 4'den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 28195 dalton m/z değerine sahip bir proteinin jel görüntüsü   | 60 |
| 4.4.6. CM10 chipinde Fraksiyon 4'den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 27925 dalton m/z değerine sahip bir proteinin kümeleme görüntüsü  | 60 |
| 4.4.7. H50 chipinde Fraksiyon 5/6'den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 12739 dalton m/z değerine sahip bir proteinin kümeleme görüntüsü   | 61 |
| 4.4.8. IMAC30 chipinde Fraksiyon 5/6'den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 21550 dalton m/z değerine sahip bir proteinin kümeleme görüntüsü  | 61 |
| 4.4.9. Darbepoetin tedavisi alan ve almayan ateroskleroz gruplarında sinyal yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı peptid/proteinlerin farklı chiplerdeki sayısı  | 68 |
| 4.4.10. Fraksiyon 4'den elde edilen örneklerin protein yoğunluklarının H50 chipinde yüksek lazer enerjisi kullanılarak elde edilen ısı haritası   | 69 |
| 4.4.11. CM10 chipinde Fraksiyon 1/2'den elde edilen, Darbepoetin tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplarda farklı sinyal yoğunluğu gösteren 6844, 7001, 8142 dalton m/z değerlerine sahip bazı proteinlerin pik görüntüsü       | 70 |
| 4.4.12. H50 chipinde Fraksiyon 1/2'den elde edilen, Darbepoetin tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplarda farklı sinyal yoğunluğu gösteren 6994, 8145, 8737, 9321 dalton m/z değerlerine sahip bazı proteinlerin pik görüntüsü  | 70 |
| 4.4.13. IMAC30 chipinde Fraksiyon 5/6'den elde edilen, Darbepoetin tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplarda farklı sinyal yoğunluğu gösteren 19479, 21551, 22001 dalton m/z değerlerine sahip bazı proteinlerin pik görüntüsü. | 71 |
| 4.4.14. CM10 chipinde Fraksiyon 3'den elde edilen, Darbepoetin tedavisi alan ve almayan ateroskleroz gruplarında farklı sinyal yoğunluğu gösteren 33058 dalton m/z değerine sahip bir proteinin kümeleme görüntüsü                      | 71 |
| 4.4.15. IMAC30 chipinde Fraksiyon 4'den elde edilen, Darbepoetin tedavisi alan ve almayan ateroskleroz gruplarında farklı sinyal yoğunluğu gösteren 33127 dalton m/z değerine sahip bir proteinin kümeleme görüntüsü                    | 72 |

## GİRİŞ

Ateroskleroz ve aterosklerozla ilişkili koroner arter hastalığı, inme, üremi gibi komplikasyonlar halen ülkemizde ve gelişmiş ülkelerde ölümlerin yaklaşık %50'sinin sebebi olarak birinci sırada yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde 60'lı yıllardan beri epidemiyolojik faktörlerin düzeltilmesine ve tedavide sağlanan ilerlemelere bağlı olarak mortalitede azalma izlenirken, Amerikan tarzı yaşamın yaygınlaştığı gelişmekte olan ülkelerde ateroskleroz morbidite ve mortalitesinde artma meydana gelmektedir [1, 2]. Ülkemizde de aynı eğilim görülmektedir.

Aterosklerozun kronik inflamatuvar bir hastalık olduğu kabul edilmektedir. Kardiyovasküler risk faktörleri arasında hastalığın gelişimini tetikleyen en yaygın mekanizmalardan biri de vasküler inflamasyona da öncülük eden oksidatif süreçtir [3].

Normal endotel anti-inflamatuvar, anti-trombotik ve vazodilatör özelliklere sahiptir. Son çalışmalarda, normal endotelial homeostazın bozulması, inflamatuvar yolakta başlangıç kabul edilmektedir [4]. Son yıllarda, endotel disfonksiyonunun ve inflamasyonun etkilerini inhibe etmek ya da azaltmak için birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan araştırmalardan bir kısmı eritropoietinin inflamasyon ve endotel disfonksiyonuna etkileri üzerinedir. Literatürde, eritropoietinin aterosklerozla ilişkisi konusundaki veriler net değildir ve çelişkilidir. Eritropoietinin aterosklerozu tetiklediğini [5, 6], aterosklerozu önlediğini [7] ve ateroskleroz ile eritropoetin tedavisi arasında bir ilişki bulunmadığını bildiren [8] çalışmalar mevcuttur. Darbepoetin alfa (Aranesp) endojen eritropoetine benzer biçimde eritropoiezi uyaran bir glikoproteindir. Bahlmann et al., deneysel hayvan modelleri kullanarak yaptıkları çalışmada, düşük dozda uzun etkili eritropoetin analogu olan darbepoetin alfa'nın kullanımının endotel hasarı önlediğini ve vasküler koruma sağladığını bildirmişlerdir [9].

Ateroskleroz gibi hastalıkların erken tanısı, yaşam süresinin uzatılması ya da yaşam kalitesinin yükseltilmesi açısından önem kazanmaktadır. Tüm hastalıklarda olduğu gibi aterosklerozda da erken teşhis ve tedavi, lezyonların ilerlemesini geciktirmekte ve mortalite riskini azaltmaktadır. Ana risk faktörlerinin tanımlanmasına rağmen, sensitif ve spesifik erken biyomarkırların eksikliğinden dolayı, bu hastaların çoğunda hastalığın başlangıcı, gelişimi, stabilitesi ve/veya aterosklerotik lezyonun tipi belirlenememekte ve ilk klinik bulgular miyokard infarktüsü ya da ölüm olarak izlenmektedir [1, 10]

Günümüzde aterosklerotik hastalıkların tanı ve takibinde biyokimyasal ve radyolojik tetkikler kullanılmaktadır. Görüntüleme esasına dayanan, doppler ultrason



ve anjiyografi gibi teknikler hastalığı izlemede etkin olmalarına rağmen maliyet açısından pahalı yöntemlerdir. Vücut sıvılarında ateroskleroz gelişiminin göstergesi olabilecek farklı biyomarkırlar öne sürülse de, ateroskleroz tanı ve takibi için tam bir biyomarkır bulunabilmiş değildir. C-reaktif protein, okside olmuş düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) gibi belirteçler aterosklerozda bağımsız biyomarkırlar olarak dikkat çekmekte, ancak damar duvarındaki lezyonları, lezyon stabilliğini ya da gelişimindeki klinik değişiklikleri belirleyemediğinden klinik takipte tam olarak kabul görmemektedirler [1]. Günümüze kadar ateroskleroz ile ilgili yapılan biyokimyasal ve genetik çalışmalar, aterosklerozun tanı ve takibi için yeterli olmamıştır. Gen düzeyinde yapılan çalışmalar, 200 den fazla post-translasyonel modifikasyona uğrayarak farklı fonksiyonlar kazanan ve farklı yerlerde lokalize olan protein değişikliklerini belirlemede ve açıklamada yetersiz kalmaktadır. Gen ekspresyonlarının daha anlamlı olabilmesi, ekspresyon ürünlerinin, diğer bir deyişle hastalık fenotipinin asıl biyolojik belirteçleri olan proteinlerin karakterizasyonu ile mümkündür [11].

Proteomik, doku ve vücut sıvılarında protein değişikliklerinin belirlenmesi, çeşitli hastalıkların erken teşhisi için biyomarkır olabilecek proteinlerin tanımlanması açısından çok önemli ve yeni bir teknolojidir. Proteomik kelimesi ilk 1995’de kullanılmasına rağmen, bu teknolojinin kullanıldığı klinik ve biyomedikal alandaki çalışmalar, son yıllarda hız kazanmıştır [10].

Aterosklerozla ilgili son çalışmalar da proteinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu amaçla protein değişikliklerinin incelendiği son çalışmalarda, proteomik teknikleri kullanılmaktadır [12, 13]. Kardiyovasküler hastalıklarla ilgili proteomik çalışmalar hız kazanmasına rağmen ateroskleroz gelişiminde proteinlerde ne tür değişiklikler meydana geldiği sorusuna kapsamlı bir cevap henüz verilememiştir.

Son dönemlerdeki deneysel ateroskleroz çalışmalarında, diyet indüklü hiperkolesterolemik hayvanların yerine, Apolipoprotein E (ApoE) geni baskılanmış deney hayvanları tercih edilmektedir. Genetik olarak manupüle edilmiş ApoE negatif fareler erken ve ilerlemiş aterosklerozda aterosklerozdaki biyokimyasal değişiklikleri aydınlatmak, ilaçların ve diyetel faktörlerin etkilerini incelemek için son zamanlarda en yaygın kullanılan farelerdir [14-18] .

Projemizde, Apo E yetmezlikli farelerde patolojik olarak ateroskleroz ve plak oluşumu histolojik olarak görüntülendi. Ateroskleroz ve plak oluşmuş farelerde inflamatuvar markırlarda (CRP, IL-6 ve histamin) ve endotel hasar markırlarında (ICAM ve selektin) meydana gelen değişiklikler belirlendi. Ateroskleroz gelişimi ile oksidatif stres markırlarında (lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu) meydana gelen değişiklikler tespit edildi. Uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin, ateroskleroz ve plak gelişiminin önlenmesinde ve incelenen diğer biyokimyasal parametrelerdeki etkileri araştırıldı. Aterosklerozun erken döneminde ApoE negatif aterosklerotik farelerde serum protein profillerindeki değişiklikler incelendi ve darbepoetin protein profili üzerindeki etkisi belirlendi.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz, damar duvarında lipidlerin birikimiyle karakterize, monoselüler hücre infiltrasyonu ve düz kas hücrelerinin proliferasyonu ile ilişkili; sadece koroner damarları değil tüm arteriyel yapıları tutabilen ve etkileyen, nedenleri tespit edilip tedavi edilebildiği takdirde durdurulabilen veya geriletilebilen multifaktöriyel, morbid ve mortal bir hastalıktır [19, 20].

Aterosklerozun fizyopatolojisi oldukça komplekstir. Damarların subendotelyal aralığında, damar duvarının tüm yapısal elemanları, trombosit, lökosit, monosit, makrofaj gibi çeşitli inflamatuvar hücreler ile lipid ve lipoproteinlerin birikimini içeren, kronik ve inflamatuvar bir hastalıktır.

Aterosklerotik lezyonlar sıklıkla kan akımının bozulduğu, arterlerin ayırım noktalarında oluşur. Aterosklerotik lezyonun bulunduğu yere göre klinik sonuçlar değişkenlik gösterir, örneğin koroner arterin ateroskerozu miyokard enfarktüsü ve anjina pectorise yol açarken, merkezi sinir sistemini besleyen arterlerin ateroskerozu felç ya da geçici iskemik ataklara sebep olabilir [21, 22].

Ateroskleroz ve aterosklerozla ilişkili koroner arter hastalığı, inme, üremi gibi komplikasyonlar halen ülkemizde ve gelişmiş ülkelerde ölümlerin yaklaşık %50'sinin sebebi olarak birinci sırada yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletlerinde 60'lı yıllardan beri epidemiyolojik faktörlerin düzeltilmesi ve tedavide sağlanan ilerlemelere bağlı olarak mortalitede azalma izlenirken, Amerikan tarzı yaşamın yaygınlaştığı gelişmekte olan ülkelerde ateroskleroz morbidite ve mortalitesinde artma meydana gelmektedir. Bu ülkelerde yapılan epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, bu hastalardaki ölümlerde majör faktörün büyük damarlardaki hasar olduğunu göstermiştir [1, 2]. Ülkemizde de aynı eğilim görülmektedir.

### 2.2. Ateroskleroza Neden Olan Risk Faktörleri

Aterosklerozla ilgili yapılan çalışmalarda hastalığın ortaya çıkışı ile ilgili olduğu saptanan bazı risk faktörleri belirlenmiştir. Risk faktörleri, genel anlamda, hem yaşam biçimi, biyokimyasal ve fizyolojik karakteristikler gibi değiştirilebilir nitelikteki faktörleri, hem de yaş, cinsiyet ve kalıtım gibi değiştirilmesi ya da giderilmesi olanaksız faktörleri kapsar (Tablo 2.1) [23].

Günümüzde ateroskleroza karşı tam bir korunma henüz bilinmemektedir fakat bu hastalığın gelişimini veya ilerlemesini önlemek ya da seyrini yavaşlatmak özellikle değiştirilebilir risk faktörlerinin kontrol altında tutulması ile başarılabilir.

Bunlardan en önemlileri, sigara tüketimi, hipertansiyon ve hiperkolesterolemidir. Hiperkolesterolemi, diğer risk faktörlerinden bağımsız tek başına ateroskleroz oluşumunu tetikleyebilen tek risk faktörüdür [21, 24].

**Tablo 2.1.** Ateroskleroz için Risk Faktörleri [23]

---

|   |
|---|
| <b>A: Bireysel özellikler (değiştirilmeyen)</b>   |
| 1.Yaş   |
| 2.Cinsiyet  |
| 3.Ailede erken yaşta (erkeklerde <55, kadınlarda <45) aterosklerotik damar hastalığı öyküsü |
| 4.Özgeçmişte aterosklerotik damar hastalığının varlığı                                      |
| <b>B: Biyokimyasal veya fizyolojik özellikler (değiştirilebilir)</b>                        |
| 1.Plazma total kolesterolünün (ve LDL-kolesterolün) yüksekliği                              |
| 2.Plazma trigliseritlerinin yüksekliği  |
| 3.HDL-kolesterolünün düşüklüğü  |
| 4.Hipertansiyon   |
| 5.Hiperglisemi/diyabetes mellitus   |
| 6.Obezite   |
| 7.Trombojenik faktörler   |
| <b>C: Yaşam tarzı</b>   |
| 1.Aterojenik beslenme (Hayvansal ve doymuş yağ, kolesterol ve kalorili diyet)               |
| 2.Sigara kullanımı  |
| 3.Aşırı alkol tüketimi  |
| 4.Sedanter yaşam  |
| <b>D: Yeni Risk Faktörleri</b>  |
| 1.Homosistein düzey yüksekliği  |
| 2.Lipoprotein (a)   |
| 3.Fibrinojen  |
| 4.Fibrinolitik aktivite düşüklüğü   |
| 5.Faktör VII  |
| 6.Antitrombin III   |
| 7.Kan antioksidan düzeyi düşüklüğü  |

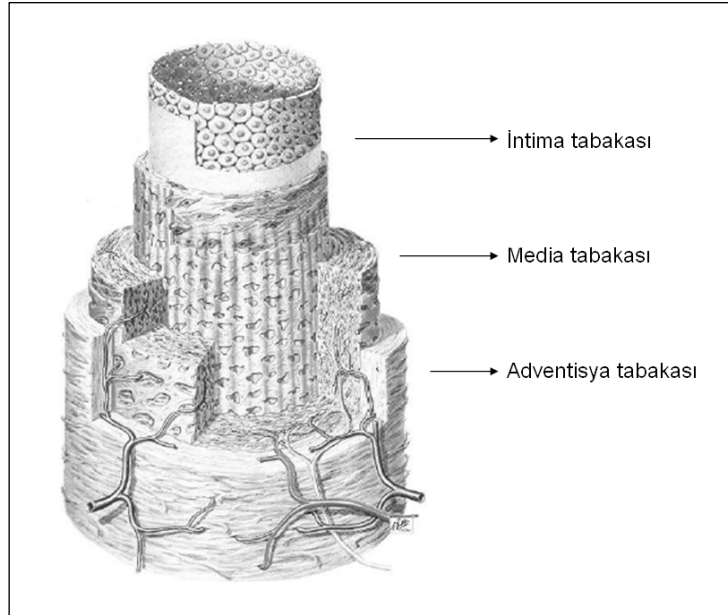
---

### 2.3. Normal Arter Duvarı

Normal arter duvarı üç tabakadan oluşur (Şekil 2.1). En içte bulunan ve lümeni çevreleyen tabaka intima tabakasıdır. Tek sıra biçiminde dizilmiş endotel hücreleri, bunları destekleyen subendotelyal matriks, bazal membran ve az sayıda düz kas hücresi intima tabakasını oluşturur. Arteriyel intimada bulunan endotel hücreleri, dolaşımdaki kan ile temas halindedir ve dolaşımdaki kan bileşenleri için bariyer görevi görür. Arteriyel endotel hücreleri, vasküler homeostazın dengelenmesinde yüksek öneme sahiptirler. Ateroskleroz gelişimi ile beraber yapılarında değişiklikler meydana gelir.

Arter duvarının orta tabakasına media adı verilir. Damarın en kalın tabakasıdır. Kollajen, elastik lifler ve glikozaminoglikanlardan oluşan bir matriks içindeki düz kas hücrelerinden oluşur. Medianın esas fonksiyonu, damar duvarında kontraksiyon ve dilatasyon meydana getirerek, kan akımının düzenlenmesini sağlamaktır.

Arter duvarının en dış tabakası adventisyadır. Gevşek bir bağ dokusu yapısındaki bu tabaka, boyuna dizilmiş kollajen lifler, sinir uçları ve artere kan sunan damarlardan (vaza vazorum) oluşur [21].



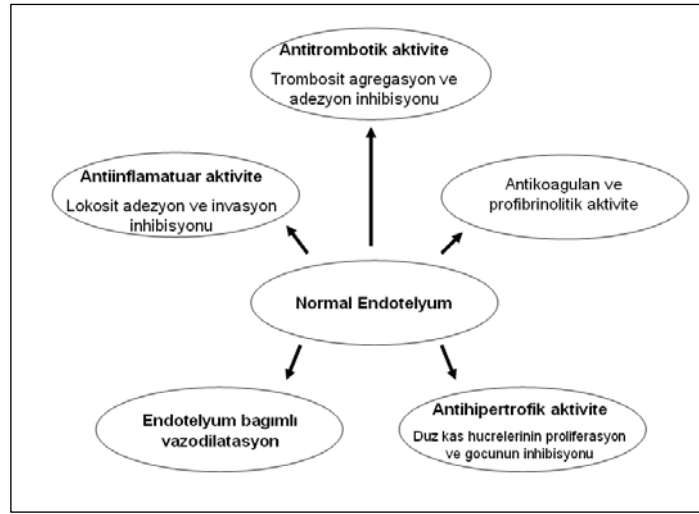
Şekil 2.1. Normal Arter Duvarı [25]

### 2.4. Vasküler Endotelyum

Endotelyum, hemangioblastlardan köken alan endotel hücrelerin oluşturduğu, kan ile damar duvarı arasında bir tabakadır. Endotelyum,  $1 \times 10^{13}$  hücreden oluşan, yaklaşık 1 kg ağırlığında, 350 m<sup>2</sup> yüzey alana sahip en büyük endokrin, otokrin ve parakrin organdır. Endotel hücreler, endokrin ve parakrin özelliği ile düz kas hücrelerine ve dolaşımdaki kan hücrelerine etki ederler. Aktif ve dinamik bir doku

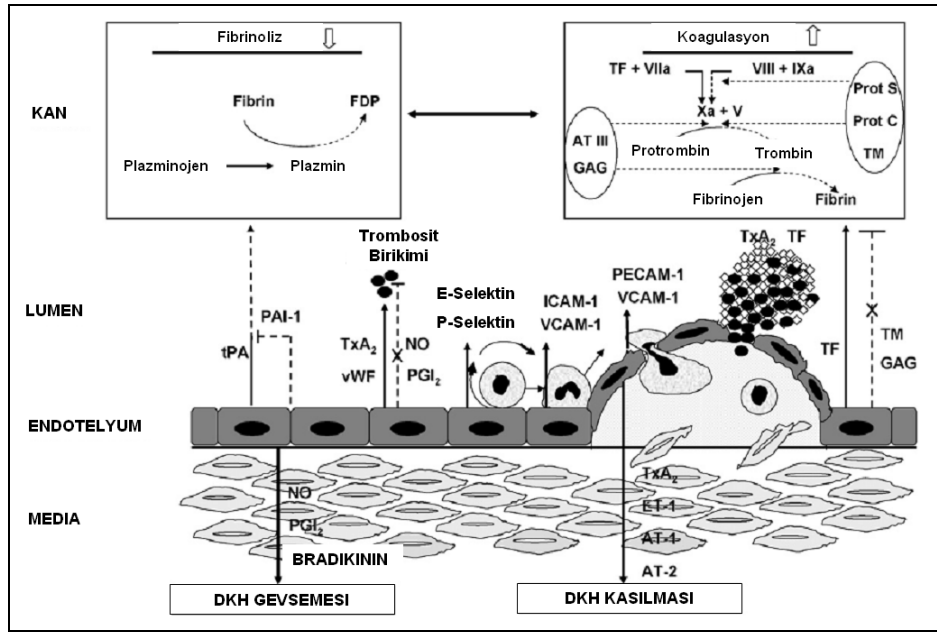
olan endotelyum, birçok sentetik ve metabolik fonksiyonu yönetebilme kapasitesine sahiptir. Kan ile doku arasındaki stratejik konumundan dolayı, hemodinamik güçlere ve kan bileşenlerindeki değişimlere duyarlıdır. Vasküler yapının değişik bölgelerinde farklı fenotiplere sahip endotel hücreler, aynı uyarana farklı cevaplar oluşturabilir.

Bir bariyer olarak endotelyum, yarı geçirgen özelliğe sahiptir; büyük, küçük tüm moleküllerin geçişini kontrol eder. Endotel hücrelerin yapı ve fonksiyonel bütünlüğü, damar duvarının korunması ve dolaşım için çok önemlidir [26-29]. Endotelial fonksiyonlar; vazodilatörler, vazokonstrüktörler, inflamatuvar mediatörler, antitrombotik, protrombotik faktörler, büyüme inhibitörleri, büyüme faktörleri ve hormonlarca düzenlenir.



Şekil 2.2. Normal vasküler endotelin fonksiyonları [26]

Normal koşullarda endotel hücreler, kan akışını, vasküler tonusu, koagülasyonu, trombositlerin ve lökositlerin damar duvarı ile etkileşimini düzenleyen tromboregülatör molekülleri ve büyüme faktörlerini sentezleyebilme, mekanik ve hormonal uyarılara yanıt verebilme özelliğine sahiptir. Endotel hücreler, gevşemeyi ve kasılmayı sağlayan, prostasiklin ve nitrik oksit gibi birçok vazoaaktif maddeyi üreterek fizyolojik ve patolojik uyarılara karşı damar tonus değişimlerini düzenlerken, aynı zamanda trombosit birikimini önler ve vazodilatasyon yapar. İnflamatuvar hücrelerin damar duvarına tutunmasına ve birikimine engel olur, profibrinolitik ve protrombotik aktivite arasında denge sağlar, vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunun inhibisyonunu sağlar (Şekil 2.2, Şekil 2.3). Endotelden salınan endotelin, anjiotensin II gibi vazokonstrüktör maddeler, düz kas hücre proliferasyonunu yaparak, aterosklerotik plak oluşumunda rol oynar. Bunun yanında vasküler endotelyum, anjiyogenezde, vasküler permabilitede, damar içi ve dışı arasındaki sıvı dengesini sağlar (Tablo 2.2). Damar duvarı ve lümeninde lokal olarak bulunan parakrin faktörlerin etkisiyle vasküler homostaz korunur. Aterosklerotik risk faktörleri tarafından endotelyumun zarar görmesi, vazodilatasyon ve vazokonstrüksiyon arasındaki dengeyi bozarak ateroskleroza giden olaylar zincirini başlatır. Bu da endotel geçirgenliği, trombositlerin agregasyonu, lökosit adezyonu, sitokinlerin salınımının artması gibi bir seri olaylarla ilişkilidir [26-28].



Şekil 2.3. Endotelin antitrombotik ve protrombotik durumları [27]

Tablo 2.2. Endotel Fonksiyonları düzenleyen Faktörler [26]

|                           |  |
|---------------------------|--|
| Vazodilatörler            | NO, bradikinin, PGI <sub>2</sub> , EDHF, C-natriüretik peptid                                      |
| Vazokonstrüktörler        | ET-1, AT II, PGH <sub>2</sub> , TXA <sub>2</sub> , ROS   |
| İnflamasyon modülatörleri | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , NO, ROS, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, VCAM-1, E selektin, NF $\kappa$ B |
| Antitrombotik faktörler   | Doku plazminojen aktivatörü, doku faktör inhibitörleri, PGI <sub>2</sub> , NO                      |
| Protrombotik faktörler    | PAI-1, fibrinojen, von Willebrand faktör, TXA <sub>2</sub>   |
| Büyüme hormonları         | NO, PGI <sub>2</sub> , C-natriüretik peptid  |
| Büyüme faktörleri         | Süperoksit radikali, ET 1, AT II   |
| Ostrojenler               | NO, EDHF, PGI <sub>2</sub> , ICAM-1, VCAM-1, E selektin, ROS, AT II, ET-1                          |

## 2.5. Endotel Disfonksiyon

Ateroskleroz gelişim sebeplerinin aydınlatılması için büyük çabalar gösterilmiştir, fakat bu çalışmalar sonucunda tam ve kesin bir sonuç elde edilememiştir. Bu konuda birçok teori ortaya atılmıştır. Bu teorilerden günümüzde en çok dikkat çeken hasara cevap (response to injury) teorisidir. Bu teoride en önemli unsur, normal endotel homeostazının bozulmasıdır. Endotel disfonksiyonu olarak da adlandırılan bu durum, fonksiyonel ve morfolojik olarak fizyolojik durumun tersidir. Lipid birikimi, mekanik hasarlar (angioplasti), ileri glikasyon son ürünleri (AGE), virüsler, üremi, sigara toksinleri, oksidatif stres, genetik değişkenlik, radyasyon, homosisteinemi, hemodinamik bozukluklar ve hipertansiyon, disfonksiyonda etkili

olan lokal ve sistemik faktörlerdir. Endotel hücre fonksiyonlarındaki en küçük değişiklik, sistemik faktörlerin etkisiyle artmaktadır [4].

Ateroskleroz oluşum hipotezlerinden hasara cevap hipotezine göre, damar endotelyumunun hasarlanması, yağlı çizgilenmelerin oluşumundan önce, lezyon gelişiminde ilk basamağı oluşturur. Temelde, endotelyumun mekanik hasarlanmasının gerekli olduğu düşünülmese rağmen, son yayınlarda endotel disfonksiyonun önemi vurgulanmaktadır [30, 31].

Endotelial disfonksiyon, endotelin-1 gibi endotel kaynaklı vazokonstriktörlerin arttığı durum ve özellikle nitrik oksit (NO) gibi vazodilatörlerin biyoyararlanımındaki azalma ile karakterizedir. Bu durum, endotel kaynaklı vazodilatasyonun azalmasına öncülük eder. Endotelial disfonksiyon, aterosklerozun tüm basamaklarında dikkat çeken proinflamatuvar, proliferatif ve prokoagulan durumlar ile karakterize olan endotelial aktivasyonun özel bir durumudur [30].

Endotelial fonksiyonların bozulması, lökositlerin arter duvarına tutunmasını, endotel altı dokuya geçişini, düz kas hücrelerinin göçünü ve proliferasyonunu tetikler [30]. Sigara, hiperlipidemi, diyabet, hipertansiyon, obezite, artmış C-reaktif protein (CRP), kronik sistemik enfeksiyon gibi aterosklerotik risk faktörlerinden birçoğunun, endotel disfonksiyonla ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu ilişkilerin doğası tam olarak bilinmemekle beraber, reaktif oksijen türlerinin etkisini içerdiği düşünülmektedir [27].

## **2.6. Oksidatif Stres, Endotel Disfonksiyon ve Ateroskleroz**

Son 150 yılda ateroskleroz gelişimi ile ilişkili karmaşık mekanizmaları açıklayabilmek için birçok çalışma yapılmıştır. Yapılan deneysel hayvan çalışmaları ve klinik sonuçlar, aterosklerozda reaktif oksijen türlerinin (ROS) önemli rolü olduğunu desteklemektedir [3, 32-34]. Süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $^{\bullet}OH$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^-$ ) gibi artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun, kardiyovasküler hastalıklar [35-37], nörolojik hastalıklar [38], diabetes mellitus [36, 39-41], kronik böbrek yetmezliği [35, 36, 39-43] ve kanser [44-46] gibi birçok hastalığın patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir.

Ateroskleroz patogenezi için öne sürülen teorilerden biri de oksidatif modifikasyon teorisidir. Bu teoriye göre, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'in doğal formu aterojenik değildir. LDL'nin oksidatif modifikasyonu ile okside LDL oluşur. LDL'de meydana gelen bu modifikasyonun, aterosklerozun başlamasında ve gelişiminde önemli bir faktör olduğu kabul edilmektedir [3].

Okside LDL'nin birçok biyolojik etkisi vardır; proinflamatuvar, endotelial nitrik oksit sentazın inhibisyonuna sebep olur, vazokonstriksiyonu ve adezyonu tetikler, sitokinlerin salınımını uyarır, trombosit birikimini artırır. Okside LDL'nin endotel hücrelerde ve makrofajlarda peroksizom proliferatör-aktive reseptör aktivasyonu aracılığı ile VEGF ekspresyonunu upregüle ettiği gösterilmiştir. Okside LDL kaynaklı ürünler sitotoksiktir ve apoptozisi tetikleyebilir. Okside LDL, doku faktörü ve plazminojen aktivatör inhibitör protein-1 sentezini uyararak koagülasyona ters etki edebilir. Okside LDL, ayrıca düz kas proliferasyonunu da stimüle eder.

Proliferasyon sonucu artan intimal kalınlaşma, lümeninde kan akımını azaltır ve sonuçta hipertansiyona ve ateroskleroza öncülük eder [3, 47-50].

Arteriyel damar duvarında, LDL oksidasyonuna sebep olan ROS'un ana kaynağı, endotel hücreler, makrofajlar ve düz kas hücreleridir [51]. Bunun yanında aterosklerotik risk faktörlerinin de, ROS üretimini artırdığı öne sürülmektedir. Hiperkolesterolemi, diabetes mellitus, arteriyel hipertansiyon, sigara tüketimi, yaşlanma, ROS üretimini artıran risk faktörlerindedir. Hiperkolesterolemi, düz kas hücrelerinde, süperoksit anyon radikallerinin ( $O_2^-$ ) üretimini uyarmaktadır, bu da LDL oksidasyonunu artırır. Artan  $O_2^-$ 'in NO ile etkileşimi, özellikle hiperkolesterolemi ve ateroskleroz açısından önem taşımaktadır [34, 52]. NO'nun, arterlerin vasküler tonusunu kontrol etmek dışında, trombosit agregasyonu/adezyonu ve düz kas hücre proliferasyonunu inhibe etmek gibi, antiaterosklerotik etkileri vardır. Endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak da bilinen NO'nun,  $O_2^-$  ile inaktive edildiği bilinmektedir.  $O_2^-$ 'nin NO ile reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), NO'nun biyoyararlanımlığını azaltır, protein oksidasyonunu artırır ve proaterojenik etki yapar [3, 34, 53-55]. Bu reaksiyonların sonucu olarak, arteriyel endotelyumun en önemli fonksiyonu olan endotel aracılı vazodilatasyon azalır. Endotel aracılı vazodilatasyonun azalması, organ perfüzyonunun bozulması ve sistemik hipertansiyon ile sonuçlanır [34, 56-58].

$H_2O_2$  tarafından oluşturulan oksidatif stres, tirozin kinazların fosforilasyonunu artırır. Bu durum, nötrofillerin damar duvarına daha sıkı tutunmasına ve damar geçirgenliğinde değişimlere sebep olur.  $H_2O_2$ 'nin aterogenez patogenezi içindeki diğer bir etkisi de aktivatör protein-1 (AP-1), nükleer faktör kapa B gibi transkripsiyon faktörlerinin üretimi üzerinedir. Bu faktörlerdeki artış, VCAM-1, ICAM-1, E-selektin, gibi adezyon moleküllerinin ve sitokinlerin ekspresyonunu değiştirir [3, 47, 59-61].

Vasküler duvarda ROS üretimini tetikleyen diğer kaynakta enzimlerdir. NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz, miyeloperoksidaz, nitrik oksit sentaz, lipoksijenaz, ateroskleroz gelişimi ve ilerlemesi basamaklarında, reaktif oksijen türlerinin önemli kaynaklarıdır [3].

Moleküler, hücresel ve doku düzeyindeki oksidatif hasarın en aza inebilmesi için, oksidanlar ve antioksidanlar arasında bir denge sağlanmalıdır. Kalp hastalıklarına karşı miyokardiyal savunma, bu açıdan birkaç aşama gösterir. Birincil savunma, hücre içi antioksidanlardan [süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GSH-redüktaz), vb.] oluşur. İkincil savunma, lipolitik ve proteolitik enzimleri (proteaz, fosfolipaz, vb.) içerir. Üçüncül savunma da, oksidatif stres sonucunda artan reaktif oksijen türleriyle başa çıkabilmek amacıyla, kalpteki gen ve proteinlerden (redoks duyarlı transkripsiyon faktörü olan) nükleer faktör kB (NF-kB) ve aktivatör protein I (AP-I) ile Bcl-2 geni sayesinde hücre içi antioksidanların üretimini artırılmasıdır [62].

## **2.7. Endotel Disfonksiyon, İnflamasyon ve Ateroskleroz**

Günümüzde, ateroskleroz inflamatuvar bir hastalık olarak kabul edilmektedir. İnflamasyon, ateroskleroz gelişiminde hem aterogeneze hem de aterotromboza eşlik



eder. Aterosklerotik plak inflamasyonunun, intima erozyonuna, rüptüre ve takip eden iskemiye sebep olduğu düşünülmektedir.

Aterosklerozun temelinde yatan nedenler tam olarak bilinmemekle beraber, oksidatif stres ya da fiziksel yollarla meydana gelen endotel hasar, en önemli sebeplerden biridir ve aterosklerozun ilk basamağını oluşturduğu düşünülmektedir. Hasarlı endotel, fonksiyonlarını kaybeder, eNOS aracılı NO üretimi azalır, vazokonstriksiyon, trombosit ve inflamatuvar hücrelerin adezyonu artar. İkinci sebep ise, inflamatuvar cevap oluşumudur. İnflamatuvar yolak, disfonksiyonel endotel hücrelerde vasküler adezyon molekülü (VCAM-1), intraselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi monositler ve lenfositler için kemotaktik ve adeziv olan moleküllerinin ekspresyonu ile başlar. İnflamatuvar aktivasyon başladığında, endotel hücrelerde selektin, VCAM-1 ve ICAM-1 ekspresyonu artar ve dolaşımdaki monositler hasarlanmış endotele tutunur ve endotel altı dokuya geçer. Adezyon moleküllerinin ekspresyonu, interlökin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) ve tümör nekrozan faktör (TNF- $\alpha$ ) gibi proinflamatuvar sitokinler, karaciğerde interlökin-6 (IL-6)'ya cevaben üretilen akut faz proteini olan C-Reaktif Protein (CRP), proteaz aktivasyonlu reseptör sinyalizasyonu, okside LDL reseptörü-1, CD40 CD40 ligand etkileşimi ve okside LDL moleküllerinin alınımı tarafından indüklenir [63]. Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1), monositlerin intimaya direk geçişinden sorumludur. Eş zamanlı olarak, T hücre kemoatraktanları, lenfositleri intimaya yönlendirir. Monositlerin arteriyel duvara geçişi ile kan kaynaklı inflamatuvar hücreler olaya katılır ve lokal inflamatuvar cevabı devam ettirirler [64]. MCP-1'e ilaveten hasarlı endotelden salınan koloni stimüle edici faktör (CSF), monositlerin makrofajlara dönüşümünü indükler. Bu dönüşümle beraber makrofajların membranlarında, okside LDL moleküllerini içlerine alabilmelerini sağlayan, süpürücü reseptörler (SR) eksprese olur [64, 65]. T hücrelerinden,  $\gamma$  interferon ve tümör nekrozan faktör (TNF- $\alpha$ ) gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımı, makrofajları, endotel hücreleri ve düz kas hücrelerini uyarır. Bu inflamatuvar yolak devam ederken, aktive lökositler ve intinsik arter hücreleri büyüme faktörlerini de içeren fibrojenik aracılı molekülleri salgırlar. Bu aracı moleküller, düz kas hücrelerinin replikasyonunu artırır ve ilerlemiş aterosklerotik lezyonun ve ekstraselüler matriksin olgunlaşmasına aracılık ederler [64].

Ateroskleroz gelişimi sırasında inflamasyonu artıran bazı durumlar söz konusudur. Bunların başında okside lipoproteinler gelir. Ateroskleroz oluşum hipotezlerinden oksidasyon hipotezine göre, intimadaki LDL molekülleri oksidatif modifikasyona uğrar. Lipid hidroperoksitler, lizofosfolipidler, karbonil bileşikleri, ateromdaki lipid fraksiyonunda lokalize olur. Bu modifiye lipidler, adezyon moleküllerinin, kemokinlerin, inflamatuvar sitokinlerin ve vasküler hücrelerden ve makrofajlardan diğer inflamatuvar moleküllerin ekspresyonunu indükler.

Aterosklerozda inflamasyonla ilişkili diğer bir durumda dislipidemidir. VLDL, IDL gibi diğer lipoprotein partikülleri de aterojenik potansiyele sahiptir. Bu lipoprotein partikülleri de LDL gibi oksidatif modifikasyona uğrayabilir. Buna ilaveten, beta VLDL partiküllerinin kendileri de endotel hücrelerinin inflamatuvar fonksiyonlarını aktive edebilir. HDL ise, damar duvarını ateroskleroza karşı korur. HDL'nin etkilediği ters kolesterol transportu onun koruyucu etkisinden gelir. Ayrıca, HDL molekülleri, okside lipidleri parçalayan ve onların proinflamatuvar etkilerini

nötralize eden, trombosit aktive edici faktör asetilhidrolaz ve paroksanaz gibi antioksidan enzimlerin transportunu da yapabilir [64].

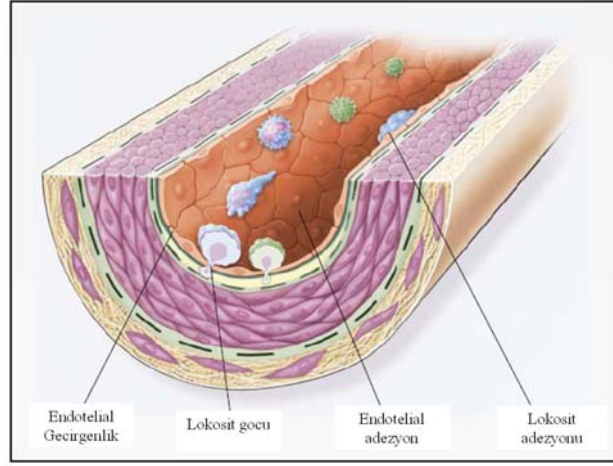
Klasik aterosklerotik risk faktörlerinden birisi hipertansiyondur. Aterosklerozda olduğu gibi hipertansiyonda da inflamasyonun yer alması bu iki hastalık arasında patofizyolojik bir bağ kurmaktadır. Vazokonstiktör etkilerinin yanı sıra, anjiotensin II (AII), inflamasyonu da tetiklemektedir. AII, arteriyal endotel hücrelerinden ve düz kas hücrelerinden süperoksit anyon salınımını sağlamaktadır. Ayrıca AII, düz kas hücrelerinden interlökin-6 (IL-6) ve MCP-1 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ve endotel hücrelerde lökosit adezyon molekülü VCAM-1'in ekspresyonunu artırır. Klinikte, anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitör tedavisi, bu proinflamatuvar yolları engelleyerek etki gösterir [64].

Diyabet, obezite ve enfeksiyon, ateroskleroz da inflamasyonla ilişkili diğer patolojik faktörlerdir. Diabette oluşan ileri glikasyon son ürünleri, endotel hücrelerinde proinflamatuvar sitokinlerin artışına sebep olur. Bunun yanında diyabete bağlı artmış oksidatif stres de, reaktif oksijen türlerinin ve karbonil gruplarının artışına sebep olur. Obezite, insülin resistansı ve diabetin yanında, ayrıca aterojenik dislipidemiye de indüklemektedir. Viseral yağlardan köken alan serbest yağ asitlerinin yüksek düzeyleri, portal dolaşım yoluyla karaciğere ulaşır ve burada trigliseridten zengin VLDL sentezini uyarır. VLDL artışı aynı zamanda HDL azalmasına sebep olur. Bunun yanında adipoz doku, TNF- $\alpha$ , IL-6 gibi sitokinleri sentezleyebilir. Bu şekilde obezite kendi başına inflamasyonu artırabilir ve insülin resistansı ve lipoproteinlerin etkisinden bağımsız olarak aterogenezi tetikleyebilir. İnfeksiyöz ajanlar, aterogenezi şiddetlendiren inflamasyona sebep olabilirler. Akut enfeksiyonlar, hemodinami, pıhtılaşma ve fibrinolitik sistemi değiştirebilir. Kronik ekstravasküler enfeksiyonlar, inflamatuvar sitokinlerin ekstravasküler üretimine artışına sebep olur ve bu da aterosklerotik lezyonların artmasını tetikleyebilir. Intravasküler enfeksiyonlar da, direk lokal inflamatuvar uyarıya sebep olarak ateroskleroza sebep olabilir. *Chlamydia pneumoniae* gibi mikrobiyal ajanlar, aterosklerotik plakların ilerlemesine neden olmaktadır [64].

## **2.8. Ateroskleroz Patogenezi**

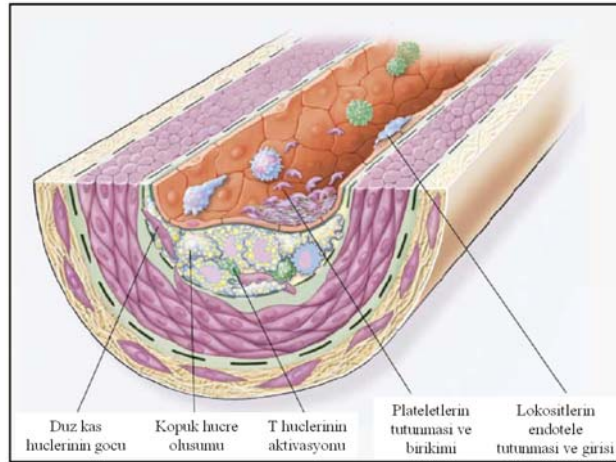
### **2.8.1. Yağlı Çizgilenme Oluşumu**

Ateroskleroz, yaşamın ilk dekadında büyük arterlerin endotelinde yağlı çizgilenmeler olarak oluşmaya başlar. Yağlı çizgilenmelerin oluşumu, LDL'nin damar lümeninden intimaya geçişi ve intimada LDL'nin oksidatif modifikasyonu ile başlar. LDL oksidatif modifikasyonu, metal katalizli reaksiyonlar ya da enzimatik yollarla oluşan, reaktif oksijen ve nitrojen türlerince oluşturulur. Okside LDL molekülü, endotel hücrelerden adezyon moleküllerinin salınımını indükler ve kemotaktik moleküllerin ekspresyonunu artırır. Bu moleküller, aterosklerozun oluşumuna öncülük eden bileşenlerdir. Normal hemostatik koşullarda, endotel hücreler, dolaşımdaki monositlerin damar duvarına uzun süreli temasına izin vermez. VCAM-1, P-Selektin, E-Selektin gibi adezyon moleküllerinin varlığında, monositler endotel hücrelerine tutunur ve subendotelial alana göç eder.



Şekil 2.4. Endotel disfonksiyonu ve ilk aterosklerotik değışimler [66]

Diapedez olarak adlandırılan bu geçiş, MCP-1 gibi birçok kemoatraktan moleküle ihtiyaç duyar. İntimaya lokalize olan monositler, makrofajlara transformlanır ve modifiye lipoprotein partiküllerini bağlayabilme özelliğinde olan süpürücü (scavenger) reseptörlerini eksprese ederler. Makrofajlar, süpürücü reseptörler (CD36, SR-A) aracılığıyla, okside lipoproteinleri hücre içine alır ve köpük hücre oluşumu başlar. Köpük hücrelerinin bir süre sonra ölmesi ile yağlı çizgilenme oluşur, inflamasyon ve lezyon ilerler [24, 66-68].

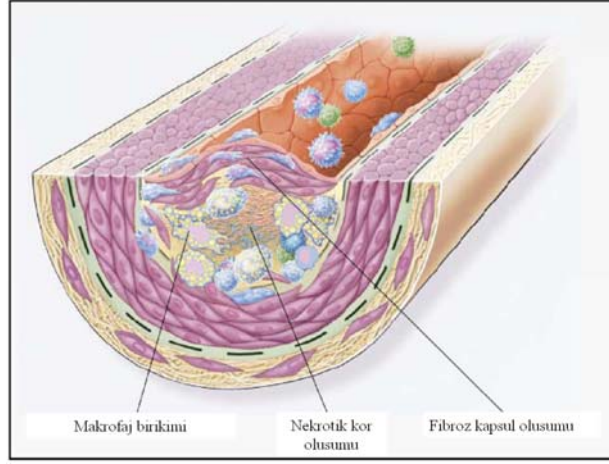


Şekil 2.5. Aterosklerozda yağlı çizgilenme oluşumu [66]

### 2.8.2. Lezyonun İlerlemesi

Yağlı çizgilenmelerden daha kompleks aterosklerotik plakların oluşumunda, düz kas hücreleri (DKH) rol alır. Yağlı çizgilenme oluştuğunda, makrofajlardan salınan sitokinler ve büyüme faktörlerinin etkisiyle, DKH media tabakasından intimaya göç eder. DKH, elastin, kollojen gibi ekstraselüler matris proteinlerini sentezleyerek, fibröz kapsül oluşumunu tetikler. Lezyonun ilerlemesini etkileyen diğer bir noktada, monosit/makrofaj ve lenfositler arasındaki etkileşimdir. Lenfositler, monositler gibi kemoatraktanların etkisiyle subendotelial alana geçer. T

hücrelerinin intimal alanda okside LDL, viral ajanlar, ısı şok proteinleri gibi antijenlerle karşılaşması, daha fazla sitokin salınımı ile sonuçlanır [24, 66]. Bu salınım lezyon ilerlemesini tetikler.

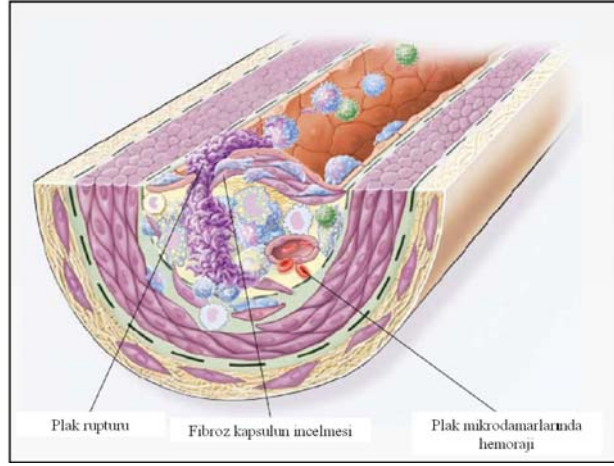


Şekil 2.6. Aterosklerotik lezyon oluşumu [66]

### 2.8.3. Plak Ruptürü ve Tromboz

Üç fiziksel hasar tipi, plak rüptürüne ve tromboza sebep olur. Birincisi, lokal inflamatuvar mediatörler aracılığıyla oluşan endotel hücre hasarı ya da ölümü ile sonuçlanan endotel hücrelerinin yüzeysel erozyonudur. İkincisi, aterosklerotik plak içindeki mikro damarların parçalanması, plak içinde hemorajiye ve tromboza, sonuçta da plak rüptürüne sebep olmasıdır. Üçüncüsü ise, plak fibroz kapsülünün yırtılması ve bunu takiben doku faktörlerinin koagülasyon faktörlerine maruz kalmasıdır [24].

Normal hemostatik koşullarda, fibrinolitik mekanizmalar, prokoagulan yollardan baskındır ve plak rüptürünün ilerlemesi ve klinik olarak koroner olaylar engellenir. Trombosit aktivasyonu trombus oluşumunun asıl sebebidir. Normal koşullarda, sağlam endotel, trombosit aktivasyonunu önler, fakat aterosklerotik plak hasarlandığında ya da yırtıldığında dolaşımdaki trombositler, subendotelial kollojen ve von willebrand faktör ile etkileşir. Ayrıca, plak rüptürünün öncülük ettiği doku faktörleri ile koagülasyon faktör VII'nin etkileşimi, intrensik ve ekstrensik koagülasyon kaskadlarının aktivasyonuna sebep olur. Bu etkileşimler trombosit aktivasyonuna ve tromboza sebep olur [24, 66].



Şekil 2.7. Fibroz plak [66]

## 2.9. Aterosklerotik Hayvan Modelleri

Rekombinant deoksiribonükleik asit (DNA) revolüsyonu, biyomedikal araştırmacılar için, kalp hastalıkları gibi birçok karmaşık insan hastalığının, genetik ve moleküler temelini araştırarak teknolojiyi sağlamıştır. 1990'lu yıllarda, moleküler genetik teknikleri ile kardiyovasküler hastalıkların birçok yönünü inceleyebilecek hayvan modelleri oluşturulmuştur. Günümüze kadar yapılan hayvan çalışmaları, kardiyovasküler hastalıkların genetik ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasında, en kullanışlı hayvanların fareler olduğunu ortaya koymuştur [18].

Geçmişten günümüze, kardiyovasküler hastalıkların patogenezinin belirlenmesinde ve tedavi protokollerinin geliştirilmesinde, birçok deneysel hayvan modeli kullanılmıştır. Deneysel aterosklerozda kullanılan ilk hayvan modeli 1908 yılında İgnatowski tarafından gerçekleştirilmiş ve yüksek protein diyeti ile beslenmiş tavşanlarda, aortun intima tabakasında genişleme görülmüştür [18]. Tavşanlar, spontan ateroskleroz geliştirmemelerine rağmen, kolesterol manüplasyonlarına duyarlı oldukları ve kısa sürede lezyon geliştirdikleri için kullanışlı hayvanlardır. Tavşan çalışmalarında karşılaşılan en önemli problem, insanda gözlenen aterosklerozla kıyasla daha yağlı ve makrofajdan zengin lezyonlar görülmesi ve kolesterol düzeylerinin insanla kıyaslanamayacak düzeye yükselmesidir.

Ateroskleroz çalışmalarında kullanılan diğer hayvanlar, sıçan, köpek, primatlar ve domuzdur. Sıçanlar ve köpekler, spontan ateroskleroz geliştirmedikleri ve vasküler lezyonların oluşturulması amacıyla içeriği değiştirilmiş diyetlerle beslenmeleri gerektiğinden, ateroskleroz için uygun modeller değildir. Domuzlar ve maymunlar, insan aterosklerotik lezyonlarını izlemek için uygun modellerdir ancak, günümüzde maymunlar türlerinin yok olma tehlikesi sebebiyle koruma altında olduklarından, temini ve bakımındaki yüksek maliyetten dolayı kullanılmamaktadır. Domuzlar, normal domuz diyeti ile beslendiklerinde ateroskleroz geliştirmekle birlikte, yüksek kolesterolü diyet ile beslendiklerinde meydana gelen aterosklerotik lezyon, insandaki lezyonlara çok benzerdir. Ancak, bakımlarında birçok laboratuvarında bulunmayan özel koşulların gerekmesi, yüksek maliyet ve homojen

kolonilerin elde edilmesindeki problemler, bu türün deneysel araştırmalarda kullanılmasındaki zorluklardır [69].

Aterosklerotik alışmalar 1992 yılına kadar daha çok tavşan, domuz ve maymunlar ile yapılmıştır. Son yıllarda aterosjenik mekanizmaların aydınlatılmasında fare modelleri kullanılmaya başlanmıştır. Fare, insandan sonra genomu ortaya çıkarılan ikinci memeli olarak araştırmacılar için başka hiçbir memelinin sunmadığı genetik ve moleküler imkanlar sunmaktadır. Farenin memeli olması araştırmalarda en fazla tercih edilen model sistemi olmasının en belirgin nedenidir. Küçük olması nedeniyle bakımı kolay ve ekonomiktir. Kısa ömüre (~2-3 yıl) ve kısa jenerasyon süresine (~10 hafta) sahiptir. Gebelik süreleri 19-21 gün olup, ırkına bağlı olarak 3-9 yavru verebilir. Kısa sürede ve kolay üretilbilir olmaları, az alanda birçok farenin barınabilmesi ve en önemlisi kısa sürede ateroskleroz geliştirmeleri, maliyeti düşürmekte ve deneysel çalışmalarda avantaj sağlamaktadır [18, 70].

### 2.9.1. Aterosklerotik Fare Modelleri

C57BL/6 soyu hariç diğer fareler, yüksek antiaterojenik HDL, düşük proaterojenik LDL ve VLDL düzeylerinden dolayı ateroskleroza oldukça dirençlidir. Bilinen hiçbir fare soyu, normal diyetle spontan olarak arterosklerotik lezyon geliştirmemektedir. Günümüzde aterosklerotik fare modelleri, genetik ya da diyetel manüplasyonlarla, lipoprotein metabolizmasında değişiklik oluşturulması temeline dayanmaktadır [18, 70, 71].

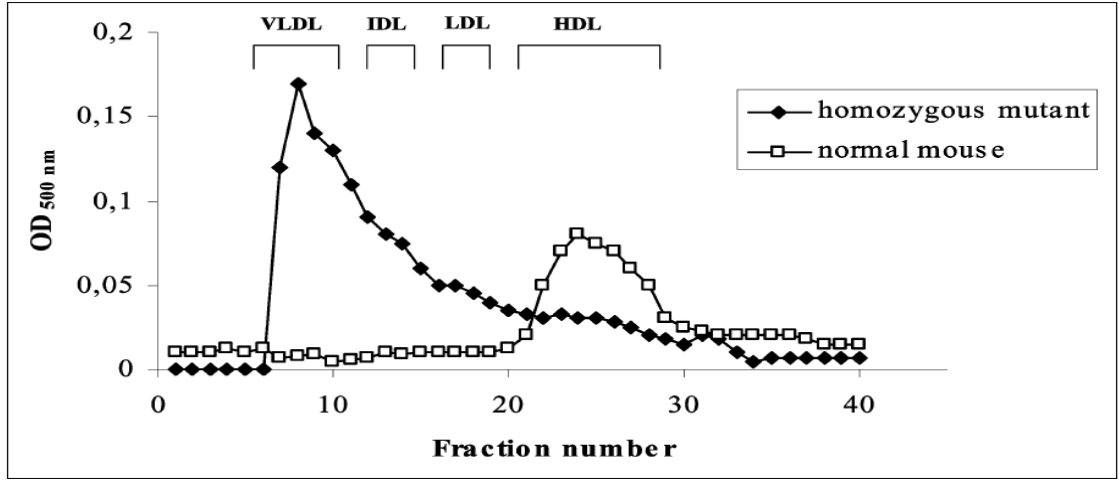
İlk fare modeli, 1960'lı yıllarda Wissler laboratuvarlarında, özel bir diyet ile aterosklerotik lezyon geliştiren fare modelidir. %30 yağ, %5 kolesterol ve %2 kolik asitten oluşan diyetle beslenen farelerde ateroskleroz oluşturulmuş, fakat bu diyet yüksek toksisitesinden dolayı kilo kaybına, ölümcül solunum enfeksiyonlarına sebep olabildiğinden, ilerleyen zamanda Paigen ve arkadaşları bu diyeti, %15 yağ, %1.25 kolesterol ve %0.5 kolik asit şeklinde modifiye etmiş ve "Paigen diyeti" olarak adlandırmıştır. Her ne kadar bu diyet modeli yaygın olarak kullanılmışsa da aterosklerotik lezyon patolojisi, insan ateroskleroz modelini tam olarak yansıtmadığından Hayek ve arkadaşları, eski Amerikan diyetine benzer bir kompozisyona sahip, Paigen diyetinden daha fizyolojik olan %21 yağ, %0.15 kolesterolden oluşan ve kolik asit içermeyen "Batı tipi diyeti" geliştirmiştir. Diyet indüklü fare modelleri, uzun yıllar efektif olarak kullanılmışsa da; lezyon alanlarının kk ve yağlı izgilenmelerle sınırlı olması, diyetlerin toksisitesi ve inflamatuvar yanıtlarından dolayı eleştirilmiş ve araştırmacılar diyetel manplasyonlar yerine genetik modifikasyonlara yönelmiştir [18, 70, 71]

Günümüzde, genetik olarak değişikliğe uğratılmış (transjenik ve gen hedeflenmiş) fare modelleri tıbbi araştırmaların vazgeçilmez araçları haline gelmiştir. Fare genlerinin modifiye edilebilmesi, gen fonksiyonlarının moleküler ve hüresel düzeyde ortaya konularak organizmanın patofizyolojisindeki ve patolojisindeki rollerinin anlaşılmasına mükemmel bir yaklaşım sunmaktadır. Bu şekilde insan hastalıklarının güvenilir olarak kopyalandığı çok sayıda model geliştirilmiş olup, her geçen gün yeni modeller eklenmektedir. Hastalık modeli fareler, hastalıklarının temellerinin detaylı incelenmesine olanak sağlamalarının yanı sıra, insanlar üzerinde

linik denemelere başlamadan önce özgün tedavilerin veriminin araştırılabileceği ön test sistemleri olarak kullanılmaktadır.

Bu alanda, ilk kez 1992 yılında, Apolipoprotein E (ApoE) geni baskılanarak, spontan olarak aterosklerotik lezyon geliştiren fare dizileri oluşturulmuştur. Bu tarihten itibaren, kardiyovasküler çalışmalarda, diyet indüklü hiperkolesterolemik hayvanlar yerine, genetik olarak manipüle edilmiş fare modellerinin kullanımı giderek hızlanmıştır [18].

Apolipoprotein E (ApoE), yaklaşık 34 kilodalton (kD) moleküler ağırlığında, insan ve farenin karaciğer, beyin ve diğer bazı dokularında sentezlenen, başta LDL olmak üzere tüm lipoprotein partiküllerinin yapısal bileşeni olan bir glikoproteindir. En önemli fonksiyonu, LDL (ApoB/E) ve hepatik ApoE (silomikron kalıntı) reseptörleri için yüksek afiniteli ligand olması ve bu sayede dolaşımdaki kolesterolün taşınması ve hepatik yolla uzaklaştırılmasını sağlamasıdır. Bununla beraber, ApoE proteininin lipoproteinlerin klirensini düzenlemenin yanısıra antioksidan, antiproliferatif, antiinflamatuvar, antitrombosit ve NO oluşturucu özellikleri ile antiaterojenik olduğu düşünölmektedir. ApoE polipeptidi fonksiyonel değilse ya da bulunmuyorsa, dolaşımdaki kolesterol miktarı artmakta ve sonuça spontan olarak ateroskleroz gelişmektedir [14, 15, 18].



**Şekil 2.8.** Normal ve ApoE knock out farelerde sıvı kromatografisi ile lipoprotein fraksiyonlarında kolesterol konsantrasyonları [18]

Apo E knock-out (Apo E<sup>-/-</sup>) fareler doğduklarında sağlıklı olmalarına rağmen normal farelerle kıyaslandıklarında, yüksek plazma lipid profiline sahiptirler ve hızlı bir şekilde ateroskleroz geliştirirler (Şekil 2.8). ApoE<sup>-/-</sup> farelerde görülen lezyonlar insanlardakine çok benzerdir ve diğer diyet indüklü hayvan modellerinden farklı olarak zaman içinde erken yağlı çizgilenmelerden daha kompleks lezyonlar oluşur. Bu süreç yağlı ve yüksek kolesterolü diyetle hızlandırılabilir [70]. Genetik olarak manipüle edilmiş ApoE<sup>-/-</sup> fareler, erken ve ilerlemiş aterosklerozda ilaçların ve diyetel faktörlerin etkilerini incelemek için son zamanlarda en yaygın kullanılan hayvan modelidir [70-73].

## 2.10. Proteomik

Genom projesinin tamamlanması, hücresel ve moleküler mekanizmaların anlaşılması için bir temel oluşturmuştur. İnsanlarda 30 000-40 000 gen ve bu genlerin tanımladığı 40 000 protein belirlenmiştir. Bu sayı RNA splicing ve yaklaşık 200 farklı post-tanslasyonel modifikasyonla 2 000 000'e ulaşmaktadır. Fosforilasyon, glikozilasyon, asetilasyon, deaminasyon, farnezilasyon, miristolizasyon, palmitolizasyon ve proteoliz gibi post-tanslasyonel modifikasyonlar, diğer biyomoleküllerle etkileşimi ya da hücresel lokalizasyonunu değiştirerek, proteinin fonksiyonunu düzenlemektedir [11]. Genomik teknolojisi hastalıkla ilgili gen aktivitesi hakkında bilgi vermesine rağmen, proteinlerin post-tanslasyonel modifikasyonlarını belirleyememektedir. Sonuçta, ne genomik sekans ne de transkripsiyonel profil, direk olarak protein ekspresyonu ile uyumlu olmadığından, proteinlerin incelenmesi giderek önem kazanmaktadır [11, 74-77].

Proteinleri tanımlamak, hücre içi ekspresyon miktarını belirlemek, üç boyutlu yapısını ve etkileşimini incelemek için birçok teknoloji kullanılmıştır. Genom tarafından eksprese edilen tüm proteinleri tanımlamak için 'proteom' terimi kullanılmaya başlanmıştır. Proteomun incelenmesi de 'proteomik' çalışma alanını oluşturmaktadır [77]. Proteomik, bir hücre, doku veya organizma proteomunun

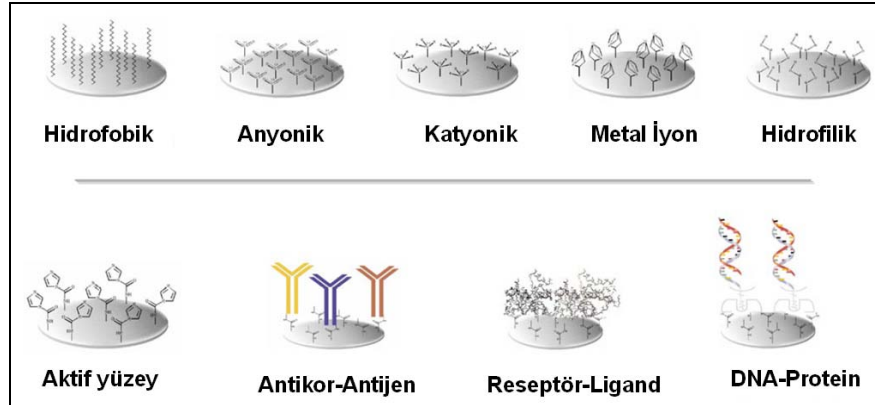


büyük boyutlarda ve sistematik olarak incelenip tanımlandığı yeni bir teknolojidir [75, 76].

Proteomik çalışmaların temeli, incelenecek numunenin hazırlanması, proteinin ayrıştırılması, görüntülenmesi ve tanımlanması basamaklarını içerir. Protein ayrıştırılması için çok yaygın olarak kullanılan ve proteomik teknolojisinin çekirdeğini oluşturan 2 yönlü elektroforez (2DE), ilk defa 1975 yılında O'Farrell ve Klose tarafından tanımlanmış ve protein karışımlarından tek tek proteinleri ayırmak için kullanılmıştır [76, 78, 79]. Fakat standartların eksikliğinden dolayı proteinlerin tanımlanmasında kısıtlamalar yaşanmıştır. Günümüzde protein tanımlanması amacıyla kütle spektrometrisi (MS) kullanılmaktadır. 2DE ve MS tekniklerinin birlikte kullanılması yeni bir araştırma alanı ortaya çıkmıştır. 2DE ve MS tekniklerinin birlikte kullanılması temeline dayanan ve proteomik çalışmalarda kullanılan benzer iki yöntem, matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF-MS) ve yüzeyi genişletilmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı kütle spektrometrisi (SELDI-TOF-MS) yöntemleridir [75, 80]. Çalışmamızda kullandığımız SELDI-TOF-MS yöntemi, proteomik çalışmalarda kullanılan en son teknolojilerden biridir.

### 2.10.1. SELDİ-TOF-MS

SELDI-TOF-MS teknolojisi, üç ana bileşenden oluşmaktadır: ProteinChip Array, kütle analizörü, ve veri analizi yazılım (software) programı. ProteinChip Arrayler, SELDI-TOF-MS teknolojisinin kalbini oluşturur. Array chipleri, 8 ya da 16 adet 2mm çapında spesifik kromatografik yüzey içeren, 10mm x 80 mm uzunluğunda alimünyum chiplerdir. Bu teknoloji, HPLC ya da gaz kromatografisinden farklı olarak protein elüsyonunu değil, tutunumunu hedefler.



Şekil 2.9. Değişik ProteinChip yüzeyleri. [81]

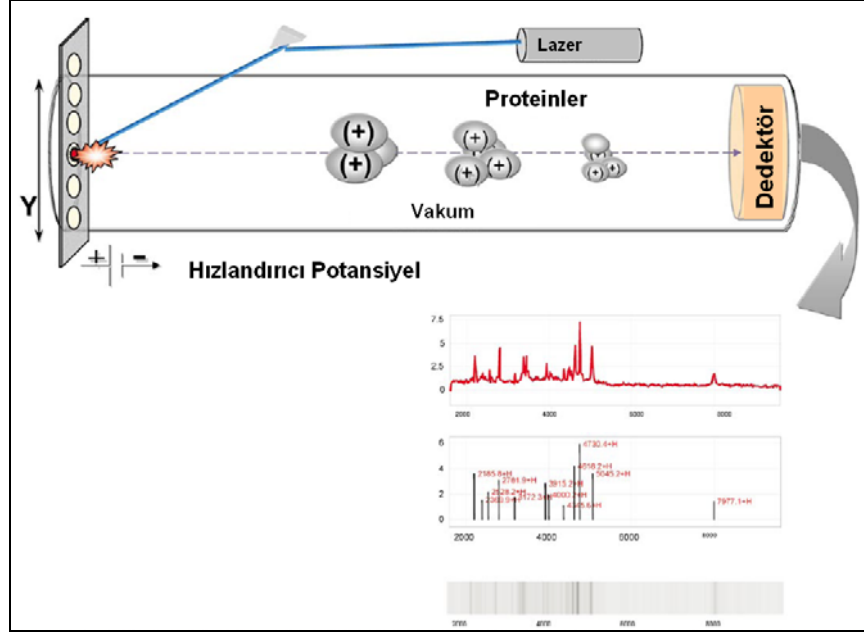
Bu yöntemde proteinler selektif olarak kimyasal ya da biyokimyasal yollarla modifiye edilmiş bir yüzeye tutunmakta, tutunmayan artıklar tamponla yıkanarak ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Özel maddelerle muamele edilerek aktive edilen iyonlar, lazerle uyarılarak özel bir kolonda hareket etmektedir. İncelenen numunedeki proteinler, kolon boyunca kütlelerinin yüklerine oranına ( $m/z$ ) göre ilerleyerek ayrılır. Kolon sonundaki dedektöre gelen iyonlar kütle spektrometrisi

yardımıyla belirlenir. Okumalar, spektrum piki şeklindedir. Proteinin spektrumdaki yeri, o proteinin uçuş zamanına bağlıdır. Küçük proteinler büyük olanlardan daha hızlı uçar. Deney sonunda dedektörce algılanan veriler uygun programlar (software) kullanılarak değerlendirilir. SELDI-TOF-MS yönteminin en büyük avantajı, idrar, plazma, kan, barsak sıvısı ya da hücrel sekresyon gibi çeşitli örneklerin analizinin yapılabilir olması ve az miktarda numunenin yeterli olmasıdır [80, 82-84].

Her bir chip yüzeyi, işlem görmemiş biyolojik örneklerdeki proteinlerin genel ya da spesifik özelliklerine göre ayırımını sağlar. Chipler, kimyasal (anyonik, katyonik, hidrofobik, hidrofilik, metal) ya da biyokimyasal olarak (antikor, reseptör, DNA, enzim) modifiye edilmiş yüzeyler içerir (Şekil 2.9). Biyokimyasal bir ajanla (antikor gibi) hazırlanmış yüzeyler, spesifik olan tek bir hedef proteini bağlarken, kimyasal özellikler kullanılarak hazırlanan yüzeyler, yüzey özelliğini içeren tüm protein sınıflarını bağlar.

SELDI-TOF-MS teknolojisinin en önemli avantajı, ham ve kompleks örneklerle yüksek kalitede ölçümler yapılabilmesidir. Serum, idrar ya da plazma gibi biyolojik sıvılar, herhangi bir ön işlem yapılmadan direk olarak kromatografik chip yüzeyine uygulanabilir. Diğer önemli bir avantaj da az hacimli örneklerle protein biyomarkır taraması yapılabilmesidir [80]. İncelenen numuneden alınan birkaç mikrolitrelik hacim direk olarak ya da biyoprosesör denen yardımcı aparatlarla (Şekil 3.1) chip yüzeyine uygulanabilir. Uygulama ardından bağlanmayan proteinler, interferans verebilecek maddeler, deterjanlar, tuzlar ve lipidler uygun çözücü ya da tamponlarla yıkanarak ortamdan uzaklaştırılır. Chipler kurutulduktan sonra Energy Absorbing Molecule (EAM) çözeltisi eklenir ve okuyucu sistemde (kütle analizörü) analiz edilir.

Kütle analizörü, lazer kaynağı içeren lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı-kütle spektrometri LDI-TOF-MS cihazıdır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. SELDI-TOF-MS sisteminin şematik görüntüsü [81]

Lazer aktivasyonu ile indüklenen chip yüzeyine bağlı proteinler, yüklü iyon ya da iyon parçaları oluşturarak, sistemin manyetik ya da elektrik alan içeren tüp kısmında hareket eder ve burada proteinler kütlelerinin yüklerine oranı ( $m/z$ ) temeline göre ayrılırlar. Yüklü iyonlar, dedektöre çarpınca yarattıkları akımlarla belirlenirler. Ortaya çıkan kütle spektrogramı bir seri pikten oluşur ve her pik değişik kütle/yük oranına sahip değişik bir iyonu ifade eder. Dedektöre gelen veriler, sisteme bağlı bir bilgisayarda özel yazılım programları kullanılarak analiz edilir. Yazılım programı, pik olarak belirlenen sonuçları tek yönlü jel elektroforez görüntüsü gibi farklı şekillerde de simüle edilebilir [80, 81, 85].

### 2.10.2. Proteomik ve Ateroskleroz

Günümüzde aterosklerotik hastalıkların tanı ve takibinde biyokimyasal ve radyolojik tetkikler kullanılmaktadır. Görüntüleme esasına dayanan, doppler ultrason ve anjiyografi gibi teknikler, hastalığı izlemede etkin olmalarına rağmen, maliyet açısından pahalı yöntemlerdir. Diğer taraftan, vücut sıvılarında ateroskleroz gelişiminin göstergesi olabilecek farklı biyomarkırlar öne sürülse de, ateroskleroz tanı ve takibi için tam bir biyomarkır bulunabilmiş değildir. C-reaktif protein, okside olmuş düşük yoğunluklu lipoprotein (okside LDL) gibi belirteçler aterosklerozda bağımsız biyomarkırlar olarak dikkat çekmekte, ancak damar duvarındaki lezyonları, lezyon stabilitesi ya da gelişimindeki klinik değişiklikleri belirleyemediğinden, klinik takipte tam olarak kabul görmemektedirler [1]. Günümüze kadar ateroskleroz ile ilgili yapılan biyokimyasal ve genetik çalışmalar, aterosklerozun tanı ve takibi için yeterli olmamıştır. Gen düzeyinde yapılan çalışmalar, 200 den fazla post-translasyonel modifikasyona uğrayarak farklı fonksiyonlar kazanan ve farklı yerlerde lokalize olan protein değişikliklerini belirlemede ve açıklamada yetersiz kalmaktadır. Gen ekspresyonlarının daha anlamlı olabilmesi, ekspresyon ürünlerinin, diğer bir deyişle hastalık fenotipinin asıl biyolojik belirteçleri olan proteinlerin

karakterizasyonu ile mümkündür [11]. Bir hücrenin, organın ya da organizmanın fenotipi, anlık proteomik değişikliklerle yansıtılır.

Proteomik kelimesi ilk 1995’de kullanılmasına rağmen, bu teknolojinin kullanıldığı klinik ve biyomedikal alandaki çalışmalar, son yıllarda hız kazanmıştır. Günümüzde hastalık mekanizmalarının anlaşılması, hastalığın gelişiminin ve tedavinin etkinliğinin izlenmesi, erken teşhis için yeni biyomarkırların belirlenmesi ve ilaç geliştirme çalışmalarında proteomik teknolojisinin kullanılması önem kazanmaktadır [74, 86]. Kansere, Alzheimer hastalığı, romatoid artrit ve kalp hastalıkları en çok çalışma yapılan alanların başında gelir [87]. Rutin uygulamaya tam olarak katılmasa da tanımlanan protein markırlarının hassasiyeti ve duyarlılığı, halen kullanılmakta olan markırlardan çok daha iyidir. Bu alanda en büyük gelişme kanserde izlenmiştir. Kardiyovasküler alandaki çalışmalar daha çok yenidir. Kardiyovasküler hastalıklarla ilgili proteomik çalışmalar hız kazanmasına rağmen, ateroskleroz gelişiminde proteinlerde ne tür değişiklikler meydana geldiği sorusuna kapsamlı bir cevap henüz verilememiştir.

Ateroskleroz patogenezinin araştırıldığı, ApoE<sup>-/-</sup> farelerle yapılan önceki çalışmalar, ApoE ile ilişkili değişiklikleri, transkriptomik olarak ortaya koymuştur[88, 89]. Bununla beraber, mRNA transkripsiyonundan elde edilen protein ekspresyon analizleri yetersiz kalmakta ve en önemlisi post-translasyonel protein değişiklikleri hakkında bilgi verememektedir [90]. Bu amaçla aterosklerozla ilgili son çalışmalar, proteomik teknolojisi üzerinde yoğunlaşmıştır [12, 13, 77, 91]. Yapılan çalışmaların çoğunda, vasküler doku ve hücreler, doku sekretomu ve hücre kültürleri, 2DE ve MS kullanılarak incelenmiştir. Farklı ekspresyon oldukları yayınlanan birkaç protein, henüz biyomarker olarak tanımlanmamıştır. HSP-27, Katepsin D, kontrol ile aterosklerotik durumda ekspresyonu değişen proteinlerdendir [92].

### 2.11. Darbepoetin- $\alpha$

Eritropoiez-stimüle edici proteinler (rekombinant insan eritropoietini (rHu-EPO), darbepoetin) kronik böbrek yetmezliği, kanser ve kronik kalp yetmezliği gibi hastalıklarla ilişkili anemi tedavisinde başarı ile kullanılmaktadır [93-97].

Eritropoietin (EPO), 30 kD ağırlığında, 165 amino asit ve 4 karbonhidrat zincirinden oluşan, ısı ve pH’ a dayanıklı bir glikoproteindir [95]. Molükül kütlesinin %60’ ı amino asit, %40’ ı karbonhidrattır. Oligosakkarit zincirleri, moleküle 1-O-glikozidik ve 3-N-glikozidik bağla bağlanır. Bu zincirler negatif yüklü siyalik asit molekülü ile sonlanır. Genelde karbonhidrat molekülleri nötr iken, siyalik asit rezidülerinin sayısı, EPO’nun net negatif yükünde belirleyicidir. Yapısından dolayı rHu-EPO, maksimum 14 siyalik asit rezidüsü içerebilir. Darbepoetin molekülü bu açıdan rHu-EPO’dan farklıdır. 5-O glikozidik bağla bağlanmış oligosakkarit rezidüleri içerir, moleküler ağırlığı 37 kD’dur ve kütlesinin %51’ i karbonhidrattır. 165 amino asitlik iskelete bağlanan bu ek zincirler molekülün üç boyutlu yapısını değiştirmezken, yarı ömrünü uzatır (yaklaşık 3 kat), biyolojik aktivitesini artırır ve reseptör afinitesini düşürür. In vitro ortamda darbepoetin EPO reseptörüne afinitesi, rHu-EPO’dan düşüktür, fakat bu durum in vivo etki kaybına sebep olmaz [96-98].

Hematopoetik sistemde EPO'nun primer fonksiyonu, spesifik hücre reseptörleri aracılığıyla kırmızı kan hücrelerinin üretimini düzenlemektir. Eritropoezin primer düzenleyicisi olan EPO, kemik iliğinde eritrositlerin öncülü olan hücrelerin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak, proliferasyonu, farklılaşmayı ve hayatta kalmayı destekler, apoptozisi inhibe eder. Temel üretim yeri böbrekler ve az miktarda da karaciğerdir. EPO sentezini, böbrekte bulunan oksijen sensörleri kontrol eder. Doku hipoksisi, hormon sentezini arttıran temel uyarandır. Eritropoietin artınca eritropoez de artar. Hipoksi sonlandığında eritropoietin üretimi de normale döner.

EPO, hematopoetik sistem dışında birçok hücreyel yolağa da etki eder. Endotelial progenitör kök hücrelerin sayısını ve aktivitesini arttırarak, neoanjiogenezi düzenler [99, 100]. EPO ayrıca endotelial ve miyokardial hücrelerin hasarında apoptotik mekanizmaları ve inflamatuvar hasarı inhibe eder. Benzer korumayı, kan damarlarında, böbreklerde, gözde, merkezi ve periferel sinir sisteminde de yapabilir [99, 100]. Hayvanlarda miyokart infarktüsünün indüklenmesi sırasında EPO uygulanması, hem infarkt alanını azaltmış, hem de kardiyak fonksiyonları belirli bir düzeyde korumuştur [99, 100].

## MATERYAL VE YÖNTEM

### 3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, aterosklerozun erken dönemindeki protein profilini belirlemek için, genetik olarak modifiye edilmiş homozigot Apolipoprotein E yetmezlikli (ApoE<sup>-/-</sup>) fareler ve kontrol olarak C57BL/6J fareler kullanıldı. Erkek, homozigot ApoE<sup>-/-</sup> fareler, Taconic Laboratuvarlarından (Danimarka), yaş ve cinsiyet uyumlu, ApoE geni dışında aynı genetik yapıya sahip C57BL/6J fareler Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarından (Antalya) 3–4 haftalıkken temin edildi. Tüm fareler deney süresi boyunca, ışık (12 saat aydınlık-karanlık döngüsü), ısı (22±2 °C) ve nem (%50±5) kontrollü, özel bir laboratuvarda, filtreli kafeslerde tutuldu ve normal çeşme suyu ve standart fare yemi ile beslendi. Yapılacak çalışma ile ilgili 5.6.2006 tarih ve 2006/17 sayılı Etik Kurul raporu, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Bakım ve Kullanım Kurulundan alınarak çalışmaya başlandı.

Yurtdışından temin edilen ApoE<sup>-/-</sup> fareler, karantina ve yeni çevrelerine uyum sürecinde 21 gün normal içme suyu ve standart diyetle beslendi. Karantina süresinin sonunda, ApoE<sup>-/-</sup> fareler, 4 deney grubuna ayrıldı. ApoE<sup>-/-</sup> farelerin verileriyle karşılaştırmak için, aynı soydan (C57BL/6J) ApoE pozitif farelerle kontrol grubu oluşturuldu. Farelerin sayısı her grup için 10 hayvan olacak şekilde planlandı.

#### 3.1.1. Deney Grupları

Ateroskleroz Grupları [ApoE yetmezlikli (knock-out) fareler]

Grup 1: Lezyon gelişmeden önce darbepoetin-α tedavisi uygulanan grup

Grup 2: Lezyon gelişmeden önce salin (serum fizyolojik) uygulanan grup

Grup 3: Lezyon geliştikten sonra darbepoetin-α tedavisi uygulanan grup

Grup 4: Lezyon geliştikten sonra salin uygulanan grup

Kontrol Grubu [ApoE pozitif fareler]

ApoE yetmezlikli (knock-out) farelerle aynı soydan gelen ApoE pozitif farelerle (C57BL/6J) kontrol grubu oluşturuldu.

#### 3.1.2. Tedavi Planı ve Uygulama

Aterosklerozun erken evresinde ortaya çıkan değişiklikleri izlemek amacıyla ApoE yetmezlikli (knock-out) Grup 1 ve Grup 2 tedavi periyoduna alındı. Grup 1'e, 0.1 mikrogram/kilogram/hafta Darbepoetin-α (Aranesp, Eczacıbaşı, Türkiye); Grup 2'ye ise salin intraperitoneal olarak enjekte edildi. Darbepoetin-α (Aranesp) enjeksiyonluk çözeltisi, kullanıma hazır dolu enjektörden alınarak farelerin ağırlıklarına göre salin ile dilüe edilerek hazırlandı. Tedavi süresi farelerin aterosklerotik plaklarındaki gelişme takip edilerek, lezyon gelişimi histopatolojik olarak belirlendiğinde (20 hafta) sonlandırıldı.

Histopatolojik çalışmalarla aterosklerotik plak gelişimi gösteren farelerde, aterosklerozun ileri evresinde ortaya çıkan değişiklikleri izlemek amacıyla, ApoE yetmezlikli (knock-out) Grup 3 ve Grup 4 tedavi periyoduna alındı. Grup 3'e, 0.1 mikrogram/kilogram/hafta Darbepoetin- $\alpha$ ; Grup 4'ye ise salin intraperitoneal olarak enjekte edildi. 20 hafta sonunda tedavi sonlandırıldı.

### 3.1.3. Örneklerin Eldesi

Yirmi haftanın sonunda, kontrol ve aterosklerotik farelerden eter anestezisi altında, abdominal aortadan kan örnekleri toplandı. 3 000g'de 10 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri ayrıldı. Proteomik analizler için ayrılan serum örnekleri proteaz inhibitör kokteyli (P2714, Sigma) ilave edilerek -80°C'de donduruldu ve kuru buz içinde Modena Üniversitesine gönderildi. Diğer parametre ölçümleri için ayrılan serum örnekleri -80°C'de saklandı. Histopatolojik çalışmalar için, arkus aorta bölgesini de içeren kalp dikkatlice çıkarılarak, bağ dokusu temizlendikten sonra serum fizyolojik ile yıkanarak, %10'luk formalin içinde fikse edildi.

### 3.2. Histopatolojik Analizler

Histopatolojik çalışmalar yedi aşamada gerçekleştirildi. Bunlar; fiksasyon (tespit), suyunu alma (dehidratasyon-sertleştirme), saydamlaştırma, parafinizasyon, blok hazırlama (gömme), kesit hazırlama ve boyama işlemleridir.

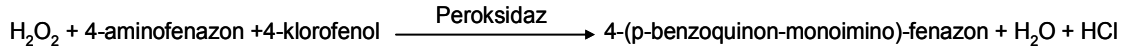
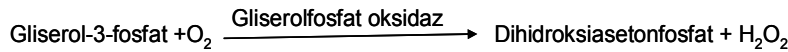
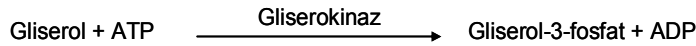
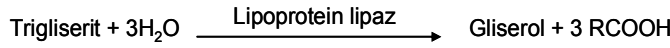
Kontrol (ApoE pozitif) ve aterosklerotik (ApoE yetmezlikli) farelerden çıkarılan kalp ve damar örnekleri, %10'luk formalin içine alındı. Dokuların iyi tespit olmaları için, 15 ml'lik falkon tüplerinde, formalin ile 24 saat bekletildi. Fiksasyon süresi sonunda örnekler, en az 3 saat, akan musluk suyu altında yıkandı. Dokunun sertleşmesi ve örnek içindeki suyun alkolle yer değiştirmesini sağlamak için 24 saat % 70 alkol, 24 saat % 80 alkol, 24 saat % 90 alkol ve 4 saat % 100 alkol içinde bekletildi. Alkolle inkübasyon süreleri sonunda doku içindeki alkolün ksilol ile yer değiştirmesi, 5'er dakikalık 3 yıkama ile gerçekleştirildi ve doku saydamlaştırıldı. Parafinizasyon işlemi sırasında saydamlaştırılan dokular, 56°C'lik parafinde 3 saat bekletildi. Her saat başında dokunun içinde bulunduğu parafin yenilendi. Sonuçta dokular kesilebilir sertliğe ve saydam hale getirildi. Sertleştirilen dokular, kesilecek yüzleri alt tarafa gelecek şekilde parafin içine gömülerek bloklar hazırlandı. Parafin bloklardan, mikrotom ile ince kesitler elde edildi. Bu kesitler 37–40 C° sıcaklıktaki su banyosuna konuldu. Oradan da lâm üzerine alındı. Lâmlar 60 C° lik etüvde 1–2 saat süre ile bekletilerek doku üzerindeki parafin uzaklaştırıldı. Preparatlar tüm parafinin temizlenmesi ve saydamlaşması için, 20 dakika ksilolde tutuldu. Daha sonra absolu ve %96'lık alkolde 5'er dakika tutulduktan sonra, eosin ve hemotoksilen ile boyandı.

### 3.3. Biyokimyasal Analizler

#### 3.3.1. Trigliserid Tayini

Trigliserit ölçümleri, ticari bir kit (Katalog no: 11730711. Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) kullanılarak Roche Hitachi Modular P800-ISE otoanalizöründe yapıldı.

**Prensip:** Triaçilgliseroller (trigliseritler) lipaz enzimi ile gliserol ve yağ asitlerine hidroliz edilir. Gliserol, gliserokinaz enzimiyle ATP gerektiren bir reaksiyonla gliserol-3-fosfata katalizlenir. Gliserol-3-fosfat, gliserolfosfat oksidaz katalizli bir reaksiyonla, dihidroksiaseton fosfat ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye okside olur. Hidrojen peroksit, 4-aminofenazon ve 4-klorofenolden, peroksidaz enziminin katalitik etkisiyle indikatör madde olan 4-(p-benzoquinon-monoimino)-fenazon oluşturulur. Oluşan renkli bileşiğin konsantrasyonu, 500 nm'de tayin edilir.

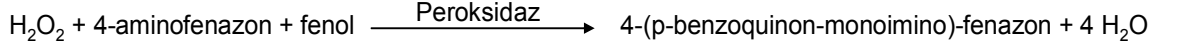
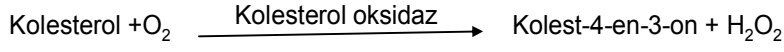
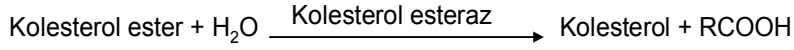


#### 3.3.2. Kolesterol Tayini

Kolesterol ölçümleri, ticari bir kit (Katalog no: 11491458. Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) kullanılarak Roche Hitachi Modular P800-ISE otoanalizöründe yapıldı.

**Prensip:** Kolesterol esteri, enzimatik olarak kolesterol esteraz ile hidroliz edilerek, serbest kolesterol ve yağ asitleri elde edilir. Kolesterol oksidaz, oksijen kullanarak serbest kolesterolden kolest-4-en-3-on ve hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oluşumunu sağlar. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, fenol ve peroksidaz varlığında indikatör madde olan 4-aminofenazondan 4-(p-benzoquinon-monoimino)-fenazon oluşturulur. Kolesterol düzeyi ile doğru orantılı olarak oluşan renkli bileşiğin konsantrasyonu 500 nm'de tayin edilir.

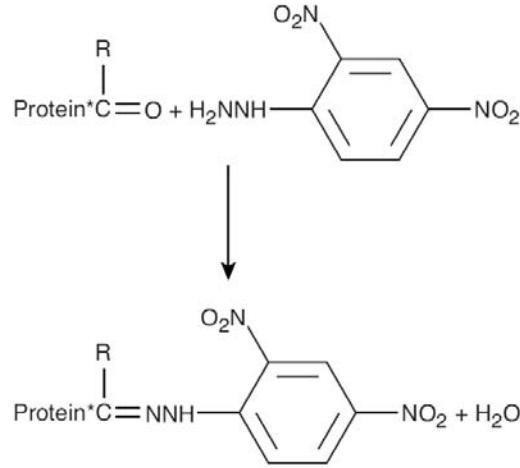




### 3.3.3. Protein Karbonil Gruplarının Tayini

Protein karbonil ölçümleri ticari bir kit (Katalog no: 10005020. Cayman Chemical Ann Arbor, MI) ile yapıldı.

**Prensip:** Protein karboniller, dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile reaksiyona girerek Schiff bazı oluştururlar ve son ürün olarak gösterilen protein hidrazon bileşikleri meydana gelir. 360-385 nm'de absorbans veren bu bileşikler aracılığı ile protein karboniller spektrofotometrik olarak tayin edilir.



#### Ayıraçlar:

1. Hidroklorik Asit (HCl)
2. DNPH
3. Trikloroasetik asit (TCA)
4. Guanidin Hidroklorit
5. Etanol
6. Etil Asetat

**Yöntem:** Serum numunelerinden alınan 200'er mikrolitre (µl) örnekler numune tüpü ve kontrol tüpü olmak üzere iki ayrı tüpe aktarılır. Numune tüpüne 800 µl DNPH, kontrol tüpüne 800 µl 2.5 M HCl ilave edilerek, 15 dakikada bir karıştırılarak, 1 saat inkübe edilir. Daha sonra bütün tüplere sırası ile %20 ve %10'luk TCA eklenerek, 5 dakika inkübe edilir ve her basamağın ardından +4 C°'de 10 000g'de 10 dakika

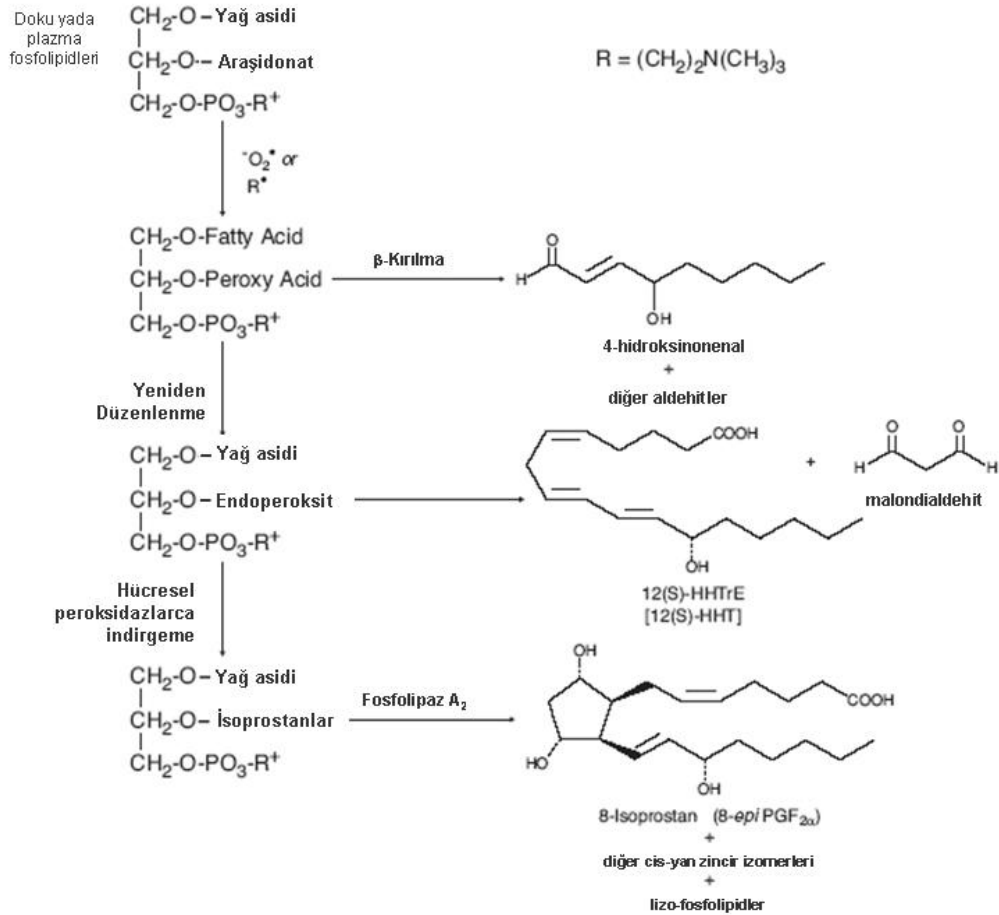
santrifüj edilir. Pelet, etanol/etil asetat karışımı içerisinde resüspanse edilerek, +4 C°'de 10 000g'de 10 dakika santrifüj edilir. Bu basamak iki kere daha tekrarlanıp son yıkamadan sonra peletler, 500 µl guanidin hidroklorit içerisinde vorteksenerek resüspanse edilir. +4 C°'de 10 000g'de 10 dakika santrifüj edilir. Süpernatant absorbanları, 360-385 nm arasında bir dalga boyunda plak okuyucu kullanarak ölçülür.

**Protein Karbonil düzeyinin hesaplanması:** Kontrol örneklerinin ortalama absorbanı numune örneklerinin ortalama absorbanından çıkartılarak bir absorban değeri elde edilir ve bu değer dilüsyon faktörü ile çarpılıp, dinitrofenilhidrazinin molar absorblama katsayısına bölünerek, karbonil düzeyi (mg/ml) olarak ifade edilir.

### 3.3.4. 8-İsoprostan Tayini

8-İsoprostan ölçümleri ticari bir kit (Katalog no: 516351. Cayman Chemical Ann Arbor, MI) ile yapıldı.

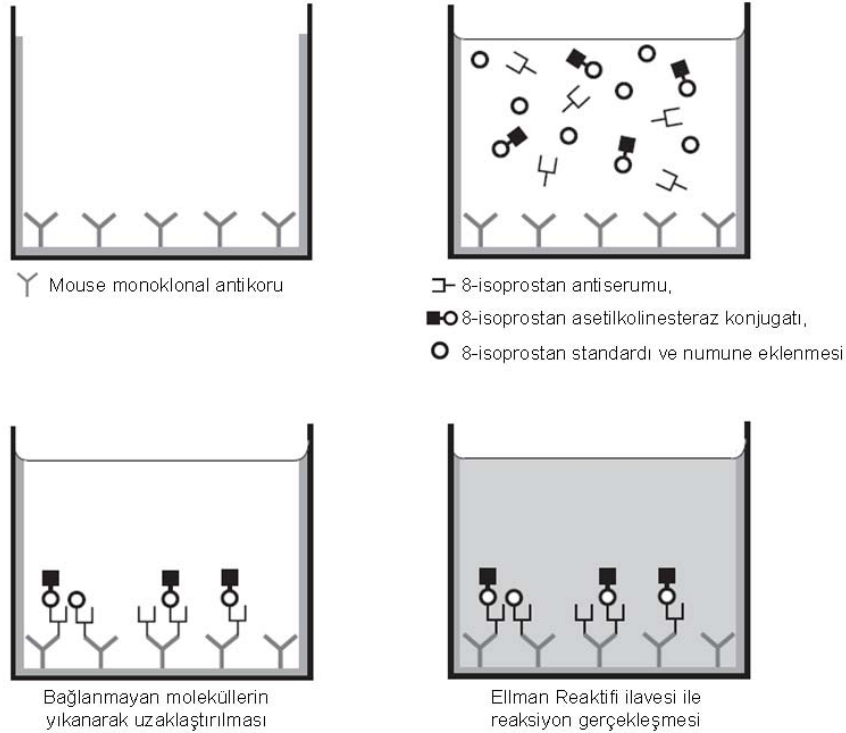
**Prensip:** 8-isoprostan ve 8-isoprostan-asetilkolinesteraz konjugatının sınırlı sayıda 8-isoprostan-spesifik tavşan antikor bağlanma bölgesi için yarışması prensibine dayanır.



### Ayır a lar:

1. Anti-IgG ile kaplanmış 96 kuyucuklu plak
2. 8-isoprostan antikoru
3. 8-isoprostan asetilkolinesteraz konjugatı
4. 8-isoprostan standardı
5. Dilüsyon tamponu
6. Yıkama tamponu
7. Tween 20
8. Ellman Reaktifi

**Yöntem:** Plağın uygun kuyucuklarına 50 µl numuneler ve standartlar eklenir. Plak, 50 µl asetilkolinesteraz bağı 8-isoprostan ilavesinden sonra oda ısısında 18 saat inkübe edilir. Bağılanmayan moleküller, %0.05 Tween 20 içeren 10 mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile beş kez yıkanır. Reaksiyon, asetilkolinesterazın substratı olan asetilkolin ile DTNB içeren Ellman reaktifi eklenmesiyle 60-90 dakika devam eder. Enzimatik reaksiyon sonunda, DTNB ve asetilkolinden oluşan, 5-thio-2-nitrobenzoik asit'in verdiği renk 412 nm'de okunur.



**8-İsoprostan düzeyinin hesaplanması:** Serum 8-isoprostan düzeyleri, 0.8, 2.0, 5.1, 12.8, 32, 80, 200, 500 pg/ml'lik 8-isoprostan standartlarının absorban-konsantrasyon grafiği kullanılarak hesaplanır.

### 3.3.5. İnterlökin-6 (IL-6) Tayini

IL-6 konsantrasyonları, ticari bir kit (Katalog no: 550950. BD OptEIA, USA) kullanılarak ölçüldü.

**Prensip:** IL-6 metodu bir solid faz enzim-bağlı immün deney (ELISA) yöntemi olup, "sandwich" prensibine dayanır.

#### **Ayırıcılar:**

1. Anti-IL-6 monoklonal antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu plak
2. Biotin bağlı anti-IL-6 monoklonal antikor
3. IL-6 standartı
4. Streptavidin-HRP
5. Dilüsyon tamponu
6. Yıkama tamponu
7. 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)
8. Durdurma çözeltisi

**Yöntem:** IL-6'ya spesifik monoklonal antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu plağın tüm kuyucuklarına 50 µl dilüsyon tamponu ve uygun kuyucuklarına 50 µl standart ve numune eklenir. Plak üzeri kaplanarak 2 saat oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon süresinin bitiminde plak içindeki sıvı boşaltılır. Kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır. Hazırlanan biyotinlenmiş IL-6 antikor ve streptavidin-HRP konjugat karışımı tüm kuyucuklara eklenir ve plak üzeri kaplanarak 1 saat oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon süresinin bitiminde plak yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır. 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) reaktifi eklenmesiyle, serumda bulunan IL-6 miktarıyla doğru orantılı olarak renkli ürün oluşur. Ortama asit eklenerek reaksiyon durdurulur ve renkli ürünün 450 nm dalga boyundaki absorbansı okunur.

**IL-6 düzeyinin hesaplanması:** Serum IL-6 düzeyleri, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 pg/ml'lik IL-6 standartlarının absorbans-konsantrasyon grafiği kullanılarak hesaplanır.

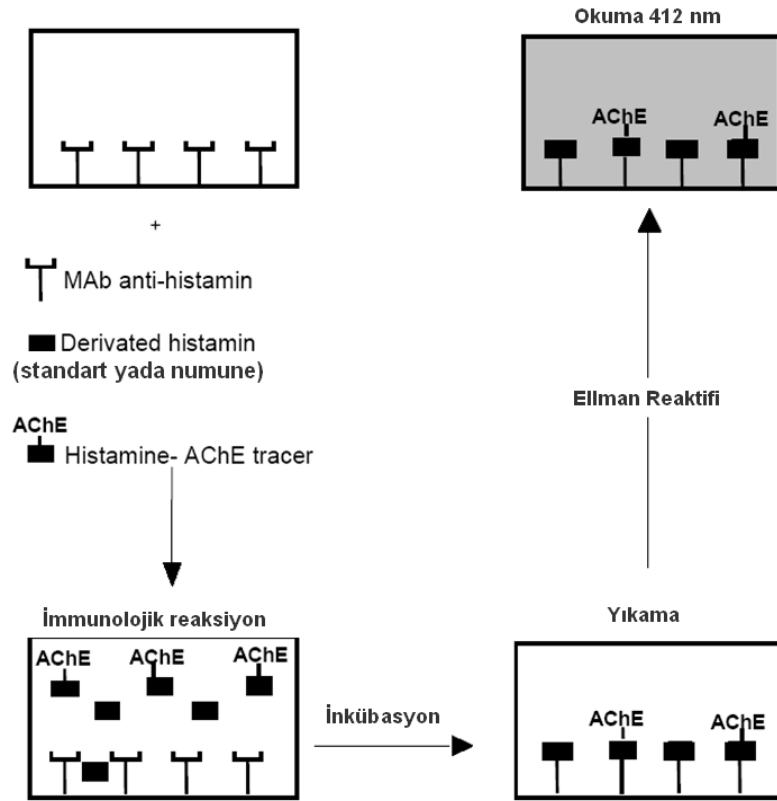
### 3.3.6. Histamin Tayini

Histamin ölçümleri ticari bir kit (Katalog no: A05890. SPI BIO, Fransa) ile yapıldı.

**Prensip:** Sınırlı sayıdaki histamin-spesifik fare antikor bağlanma bölgelerine histamin ve histamin-asetilkolinesteraz konjugatının bağlanmak için yarışması prensibine dayanır.

### Ayır lar:

1. Monoklonal antikorunu ile kaplanmış 96 kuyucuklu plak
2. Histamin Antikoru
3. Histamin Asetilkolinesteraz konjugatı
4. Histamin standartı ve kontrol
5. Türevlendirme tamponu
6. Türevlendirme reaktifi
7. Dilüsyon tamponu
8. Yıkama tamponu
9. Tween 20
10. Ellman Reaktifi



**Yöntem:** Histamin standartı, kontrol, numuneler, dilüsyon tamponu, türevlendirme tamponu ve reaktifi ile iyice karıştırılır. Mouse monoklonal antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu plak yıkama tamponu ile beş kez yıkanarak plak deneye hazırlanır. 100 µl standart, kontrol ve numuneler kuyucuklara pipetlenir. 100 µl asetilkolinesteraz bağlı histamin ilavesinden sonra 4°C’de 24 saat inkübe edilir. Bağlanmayan moleküller, Tween 20 içeren yıkama tamponu ile beş kez yıkanır. Asetilkolinesterazın substratı olan asetilkolin ile DTNB’yi içeren Ellman reaktifi eklenir. Enzimatik reaksiyon sonunda DTNB ve asetilkolinden oluşan, 5-thio-2-nitrobenzoik asit’in verdiği renk 405-414 nm arasında okunur.

**Histamin düzeyinin hesaplanması:** Histamin düzeyleri, 0.39, 0.78, 1.56, 2.13, 6.25, 12.5, 25, 50 nM'lık histamin standartlarının absorbans-konsantrasyon grafiği kullanılarak hesaplanır.

### 3.3.7. C-Reaktif Protein (CRP) Tayini

CRP konsantrasyonları, ticari bir kit (Katalog no: 41-CRPMS-E01, Alpcó Diagnostics) kullanılarak ölçüldü.

**Prensip:** CRP enzime bağlı bir immün absorban deney (ELISA) metodu ile ölçüldü. Bu çift antikorlu ELISA yöntemi olup, "sandwich" prensibine dayanır.

#### Ayrıağlar:

1. Anti-CRP antikoruna ile kaplanmış 96 kuyucuklu plak
2. HRP bağlı anti-CRP antikoruna
3. CRP referans serumu
4. Kromojen-Substrat çözeltisi
5. Dilüsyon tamponu
6. Yıkama tamponu
7. CRP Standardı
8. Durdurma çözeltisi

**Yöntem:** CRP antikoruna ile kaplanmış 96 kuyucuklu plağın uygun kuyucuklarına 100 µl dilüsyon tamponu, referans serum, standart ve numune eklenir. 10 dakika oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon süresinin bitiminde plak içindeki sıvı boşaltılır. Kuyucuklar yıkama tamponu ile dört kez yıkanır. Hazırlanan HRP bağlı CRP antikoruna tüm kuyucuklara eklenir ve plak üzeri kaplanarak 10 dakika oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon süresinin bitiminde plak yıkama tamponu ile dört kez yıkanır. TMB reaktifi eklenmesiyle serumda bulunan CRP miktarıyla doğru orantılı olarak renkli ürün oluşur. Ortama asit eklenerek reaksiyon durdurulur ve renkli ürünün 450 nm dalga boyundaki absorbansı okunur.

**CRP düzeyinin hesaplanması:** Serum CRP düzeyleri, 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25 ng/ml'lik CRP standartlarının absorbans-konsantrasyon grafiği kullanılarak hesaplanır.

### 3.3.8. E-Selektin Tayini

E-Selektin ölçümleri ticari bir kit (Katalog no: MES00. R&D Systems, Minneapolis, MN) ile yapıldı.

**Prensip:** E-Selektin enzime bağlı bir immün absorban deney metodu ile ölçüldü. Bu bir solid faz ELISA yöntemi olup, "sandwich" prensibine dayanır.

#### Ayrıağlar:

1. E-Selektin monoklonal antikoruna ile kaplanmış 96 kuyucuklu plak
2. HRP bağlı anti-E-Selektin monoklonal antikoruna
3. E-Selektin standardı ve kontrol
4. Streptavidin-HRP
5. Dilüsyon tamponları

6. Yıkama tamponu
7. Hidrojen peroksit
8. Tetrametilbenzidin
9. Durdurma çözültüsü

**Yöntem:** E-Selektin monoklonal antikoru ile kaplanmış 96 kuyucuklu plağa, 50 µl dilüsyon tamponu ve uygun kuyucuklara 50 µl standart veya numunelerden eklenir. Plak üzeri kaplanarak 2 saat oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon süresinin bitiminde plak içindeki sıvı boşaltılır. Kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır. Enzim bağlı monoklonal antikor tüm kuyucuklara eklenir ve 30 dakika oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon süresinin bitiminde plak yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve tetrametilbenzidin reaktifi eklenmesiyle serumda bulunan E-Selektin miktarıyla doğru orantılı olarak renkli ürün oluşur. Ortama asit eklenerek reaksiyon durdurulur ve renkli ürünün 450 nm dalga boyundaki absorbanısı okunur.

**E-Selektin düzeyinin hesaplanması:** Serum E-Selektin düzeyleri, 15.6, 31.2, 62.5, 125, 250, 500, 1000 pg/ml'lik standartlarının absorban-konsantrasyon grafiği kullanılarak hesaplanır.

### 3.3.9. İnterselüler Adezyon Molekülü-1 (ICAM-1) Tayini

ICAM-1 konsantrasyonları, ticari bir kit (Katalog no: 633215, Pierce Biotechnology, IL, USA) kullanılarak ölçüldü.

**Prensip:** ICAM-1, enzime bağlı bir immün absorban deney (ELISA) metodu ile ölçüldü.

#### Ayrıçlar:

1. Anti-ICAM-1 antikoru ile kaplanmış 96 kuyucuklu plak
2. HRP bağlı anti-ICAM-1 antikoru
3. ICAM-1 standardı
4. Dilüsyon tamponları
5. Plak reaktifi
6. Yıkama tamponu
7. TMB reaktifi
8. Durdurma çözültüsü

**Yöntem:** ICAM-1 monoklonal antikoru ile kaplanmış 96 kuyucuklu plağa 50 µl plak reaktifi ve uygun kuyucuklara 50 µl standart ve numune eklenir. Plak üzeri kaplanarak 2 saat oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon süresinin bitiminde plak içindeki sıvı boşaltılır. Kuyucuklar yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır. Hazırlanan HRP bağlı ICAM-1 antikoru tüm kuyucuklara eklenir ve plak üzeri kaplanarak 1 saat oda ısısında inkübe edilir. İnkübasyon süresinin bitiminde plak yıkama tamponu ile 5 kez yıkanır. TMB reaktifi eklenmesiyle serumda bulunan ICAM-1 miktarıyla doğru orantılı olarak renkli ürün oluşur. Ortama asit eklenerek reaksiyon durdurulur ve renkli ürünün 450 nm dalga boyundaki absorbanısı okunur.

**ICAM-1 düzeyinin hesaplanması:** Serum ICAM-1 düzeyleri, 0, 25.6, 64, 160, 400, 1000 ng/ml'lik ICAM-1 standartlarının absorbans-konsantrasyon grafiği kullanılarak hesaplanır.

### **3.4. Proteomik Analizler**

Kontrol (ApoE pozitif) ve darbepeotin tedavisi alan ve almayan aterosklerotik (ApoE yetmezlikli) farelerdeki protein profilini taramak, ekspresyon değişikliği olan proteinleri belirlemek için, araştırmalarımızda Yüzeysel genişletilmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon-uçuş zamanlı-kütle spektrometresi (SELDI-TOF-MS) teknolojisi kullanıldı. Proteomik çalışmalarımız, İtalya Modena Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Laboratuvarlarında yapıldı.

#### **3.4.1.SELDI-TOF-MS Analizleri İçin Serum Örneklerinin Hazırlanması**

Ham serum örnekleri, örnek kompleksliğini azaltmak, pik sayısını artırmak, az bulunan proteinleri belirleyebilmek ve analizleri kolaylaştırmak için, içerdikleri proteinlerin biyofiziksel özelliklerine göre, ProteinChip serum fraksiyonlama kiti (Katalog no: K10-00007, Biorad, USA) ile pH'larına göre fraksiyonlandı. 96 kuyuluk ProteinChip Q Filtrasyon Plağında, anyon değiş tokuş işlemi gerçekleştirildi. Rehidrasyon basamağından sonra, örnekler plağa eklendi. Yıkama solüsyonunun pH'ı basamak basamak değiştirilerek 6 fraksiyon toplanana kadar elüe edildi. Fraksiyonlar, profil protokolüne göre ProteinChip arraylerde analiz edildi. 6 fraksiyonun her biri iki kere toplandı ve bu iki toplanan fraksiyon birleştirildi.

#### **3.4.2.Serum Örneklerinin Fraksiyonlama İşlemleri**

Yirmi µl serum örnekleri, çift (dublike) olarak 96 kuyucuklu plaklara pipetlendi. Her kuyucuğa 30 µl ProteinChip U9 tamponu (9 M üre, % 2 CHAPS, 50 mM Tris-HCl, pH 9) eklenerek 20 dakika +2-8°C'de çalkalandı. Üre içeren bu tampon ile örneklerin denatürasyonu ve dilüsyonu gerçekleştirildi.

Filtrasyon kabı açıldı. Kuyucuklara 200 µl rehidrasyon tamponu eklendi. 60 dakika oda ısısında çalkalandıktan sonra tamponun uzaklaştırılması için vakum uygulandı. Bu işlem 3 kere tekrarlanarak destek materyali (Q Ceramic HyperD® F rezin (Chipergen Biosystems)) rehidrate edildi. Aynı işlemler 3 kez U1 tamponu (1 M üre, % 0.2CHAPS, 50 mM Tris-HCl, pH9) ile yapıldı.

#### Serum fraksiyonları

##### Fraksiyon 1 (F1)

Tüm örnekler, 96 kuyucuklu filtrasyon plağına pipetlendi ve 30 dakika +2-8°C'de çalkalanarak, örneklerin destek materyaline tutunması sağlandı. Fraksiyonların toplanacağı yeni bir plak altta, filtrasyon plağı üstte olacak şekilde vakum aparatına yerleştirildi. Vakum uygulandı ve ilk eluent toplandı. Filtrasyon plağına, 100 µl 1. yıkama tamponu ilave edildi. 10 dakika oda ısısında çalkandıktan sonra vakum uygulandı ve pH9 olan ilk eluent yine aynı plağa toplandı.



#### Fraksiyon 2 (F2)

Vakum aparatından alınan filtrasyon plağının kuyucuklarına, 100 µl 2. yıkama tamponu ilave edildi. 10 dakika oda ısısında çalkalandıktan sonra vakum uygulandı ve pH7 olan eluent yeni bir plağa toplandı. İşlem bir kez daha tekrarlandı.

#### Fraksiyon 3 (F3)

Vakum aparatından alınan filtrasyon plağının kuyucuklarına, 100 µl 3. yıkama tamponu ilave edildi. 10 dakika oda ısısında çalkandıktan sonra vakum uygulandı ve pH5 olan eluent yeni bir plağa toplandı. İşlem bir kez daha tekrarlandı.

#### Fraksiyon 4 (F4)

Vakum aparatından alınan filtrasyon plağının kuyucuklarına, 100 µl 4. yıkama tamponu ilave edildi. 10 dakika oda ısısında çalkandıktan sonra vakum uygulandı ve pH4 olan eluent yeni bir plağa toplandı. İşlem bir kez daha tekrarlandı.

#### Fraksiyon 5 (F5)

Vakum aparatından alınan filtrasyon plağının kuyucuklarına, 100 µl 5. yıkama tamponu ilave edildi. 10 dakika oda ısısında çalkandıktan sonra vakum uygulandı ve pH3 olan eluent yeni bir plağa toplandı. İşlem bir kez daha tekrarlandı.

#### Fraksiyon 6 (F6)

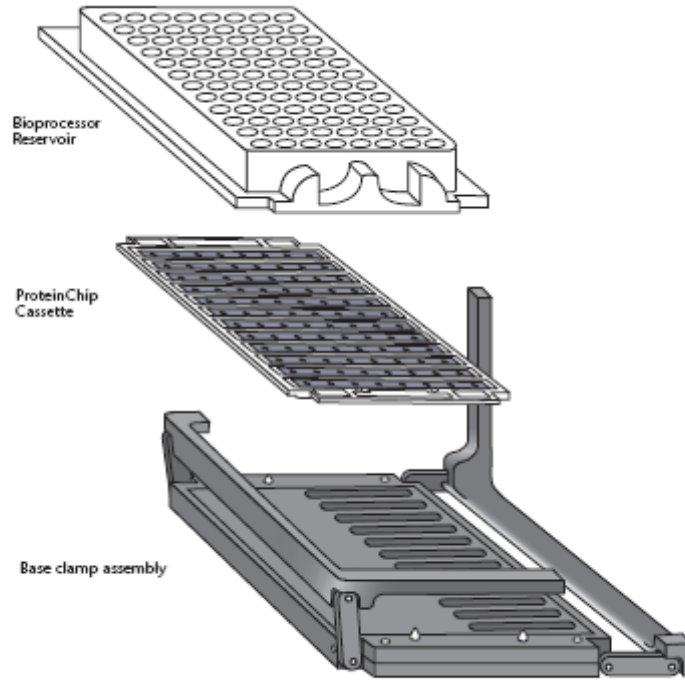
Vakum aparatından alınan filtrasyon plağının kuyucuklarına, 100 µl organik çözücü bir tampon ilave edildi. 10 dakika oda ısısında çalkandıktan sonra vakum uygulandı ve diğer fraksiyonlarda destek materyalinden ayrılmayan tüm proteinleri içeren eluent yeni bir plağa toplandı. İşlem bir kez daha tekrarlandı.

Daha önceki çalışmalarımızın sonuçlarına ve Biorad firmasının önerilerine dayanarak elde edilen 6 farklı fraksiyondan (pH9, pH7, pH5, pH4, pH3 ve organik çözücü), 1.fraksiyon ile 2.fraksiyon; ve 5.fraksiyon ile 6.fraksiyon birleştirildi. Bu 4 farklı fraksiyon (F1/2, F3, F4, F5/6) CM-10 (zayıf katyon değiştirici), H50 (ters faz) ve IMAC-30 (metal afinite yakalayıcısı) chiplerinde analiz edilmek üzere -80°C'de saklandı.

Chiplerin hazırlanması, örneklerin uygulanması ve matriksin eklenmesi işlemlerindeki, tüm aşamalar, araştırmacıdan kaynaklanacak pipetleme hatalarını ortadan kaldırmak ve tekrarlanabilirliği sağlamak için robot sistemler (Biomek 3000) kullanılarak gerçekleştirildi.

#### **3.4.3. Bioprosesörün Hazırlanması**

CM10, H50 ve IMAC30 chiplerini içeren kasetin üzerine bioprosesör yerleştirildi. Bu bioprosesör, spotların üzerinde kuyucuklar oluşturarak inkübasyonları gerçekleştirmemize olanak sağladı.



Şekil 3.1. Bioprosesör

Metal bir çerçeve içine hazırlanacak chip yerleştirildi. Üzerine plastik, tabanı yumuşak ve vakum özelliği olan bioprosesör şekilde gösterildiği gibi yerleştirildi. Metal çerçeve kapatılarak işlem tamamlandı. Tüm chip yüzeylerinin hazırlanmasında bu yöntem kullanıldı.

#### 3.4.4. Chiplerin Hazırlanması ve Serum Fraksiyonlarının Uygulanması

##### 3.4.4.1. ProteinChip CM10 Array (Zayıf Katyon Değiştirici) (Katalog No: C57-30075. Biorad, USA)

ProteinChip CM10 array'i zayıf bir katyon değiştiricisi olup, seçilen pH'daki pozitif yüklü proteinleri bağlar.

CM10 chiplerini içeren kasetin üzerine bioprosesör yerleştirildi. CM10 bağlama (binding) solüsyonu (200 µl) tüm kuyucuklara pipetlendi. Oda ısısında 5 dakika çalkalanan chiplerden sıvı uzaklaştırıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. 90 µl bağlama solüsyonu ile karıştırılan 10 µl örnekler chip yüzeyine pipetlendi ve chip yüzeyine tutunmasını sağlamak için 45 dakika şiddetli olarak çalkalandı. Örnekler chip yüzeyinden uzaklaştırıldı. 200 µl bağlama solüsyonu ile bağlanmayan örnekler uzaklaştırıldı. Kuyucuklar bağlama solüsyonuyla 5'er dakika 2 kez daha çalkalanarak yıkandıktan sonra bağlama solüsyonu uzaklaştırıldı. Bioprosesörden çıkarılan kaset 15-20 dakika havada kurutuldu. Her spota 2 µl Energy Absorbing Molecules (EAM) Matriks solüsyonu eklendi. Tekrar havada kurutuldu ve ProteinChip SELDI sisteminde analiz edildi.

#### **3.4.4.2. ProteinChip H50 Array (Ters Faz) (Katalog No: C57-30065. Biorad, USA)**

ProteinChip H50 Array'ı, ters faz veya hidrofobik etkileşimlerle proteinleri bağlar.

H50 chiplerini içeren kasetin üzerine bioprosesör yerleştirildi. Kuyucuklar, 50 µl %50 asetonitril solüsyonu ile 5'er dakika çalkalanarak iki ön yıkama yapıldı. Ön yıkamanın ardından H50 bağlama (binding) solüsyonu (200 µl) tüm kuyucuklara pipetlendi. Oda ısısında 5 dakika çalkalanan chiplerden sıvı uzaklaştırıldı. Bu işlem 1 kez daha tekrarlandı. 90 µl bağlama solüsyonu ile karıştırılan 10 µl örnekler chip yüzeyine pipetlendi ve chip yüzeyine tutunmasını sağlamak için 45 dakika çalkalandı. Örnekler chip yüzeyinden uzaklaştırıldı. 100 µl bağlama solüsyonu ile bağlanmayan örnekler uzaklaştırıldı. Kuyucuklar bağlama solüsyonuyla 5'er dakika 2 kez daha çalkalanarak yıkandıktan sonra bağlama solüsyonu uzaklaştırıldı. Bioprosesörden çıkarılan kaset 15-20 dakika kurutuldu. Her spota 2 µl EAM matriks solüsyonu eklendi. Tekrar havada kurutuldu ve ProteinChip SELDI sisteminde analiz edildi.

#### **3.4.4.3. ProteinChip IMAC30 Array (Metal Afinite Yakalayıcısı) (Katalog No:C57-30078. Biorad, USA)**

ProteinChip IMAC30 Array'ı, koordine metal etkileşimi ile proteinleri reversibl bir şekilde yüzeyine bağlar.

IMAC30 chiplerini içeren kasetin üzerine bioprosesör yerleştirildi. Her bir kuyucuğa 50 µl 0.1 M bakır sülfat çözeltisi pipetlenerek, bakır iyonlarının chip yüzeyine bağlanması için 10 dakika çalkalandı. Metal içeren solüsyon uzaklaştırılarak kuyucuklar deiyonize su ile yıkandı. Hemen ardından 100 µl 0.1 M sodyum asetat içeren nötralizasyon tamponu (pH4) pipetlendi ve 5 dakika çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda nötralizasyon tamponu uzaklaştırılan kuyucuklar tekrar deiyonize su ile yıkandı. Metal bağlanmasının sağlandığı ve bağlanmayan iyonların uzaklaştırıldığı ön yıkamanın ardından IMAC30 bağlama solüsyonu (200 µl) tüm kuyucuklara pipetlendi. Oda ısısında 5 dakika çalkalanan chip yüzeyinden tampon uzaklaştırıldı. Bu işlem 1 kez daha tekrarlandı. 90 µl bağlama solüsyonu ile karıştırılan 10 µl örnekler chip yüzeyine pipetlendi ve chip yüzeyine tutunmasını sağlamak için 45 dakika çalkalandı. Örnekler chip yüzeyinden uzaklaştırıldıktan sonra, kuyucuklara 200 µl bağlama solüsyonu pipetlendi. 5 dakika çalkalamanın ardından kuyucuklardan bağlanmayan örnekler uzaklaştırıldı. Kuyucuklar bağlama solüsyonuyla 5'er dakika 2 kez daha çalkalanarak yıkandıktan sonra bağlama solüsyonu uzaklaştırıldı. Chip yüzeyleri iki kere daha deiyonize su ile yıkandıktan sonra bioprosesörden çıkarılan kaset 15-20 dakika kurutuldu. Her spota 2 µl EAM matriks solüsyonu eklendi. Tekrar havada kurutuldu ve ProteinChip SELDI sisteminde analiz edildi.

#### **3.4.5. Matriks Hazırlanması ve Chip Yüzeyine Uygulanması**

CM-10, H50 ve IMAC-30 chipleri kendi uygun protokolleri ile hazırlandıktan sonra spotlar üzerindeki proteinlerin kristalize olması EAM matriks eklenmesiyle sağlandı.

100 µl %1 trifluoroasetik asit ve 100 µl %50 asetonitril, sinapinik asit içeren EAM tüpüne pipetlendi. 5 dakika vortekslendi ve santrifüj edildi. Matriksin süpernatanı, % 1trifluoroasetik asit / %50 asetonitril karışımı ile eşit hacimde karıştırılarak dilüe edildi.

SELDI-TOF-MS cihazında okunacak chip yüzeyine matriks eklenmesi Biomek 3000 sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Her spota 1 µl matriks pipetlendi ve kuruması için beklendi. Aynı işlem bir kere daha tekrarlandı. Chip yüzeyi tamamen kuruduğu zaman chip okunmaya hazır hale geldi.

#### **3.4.6. Standartın NP20 Chipine Uygulanması**

“ProteinChip All-in-One Protein Standard II” protein standardıyla ProteinChip System Series 4000 cihazı kalibre edildi. Kalibrasyonu takiben örnekler analiz edildi. NP20 chipleri üzerindeki aktif spotlardaki silikon oksit grupları, proteinlerin serin, treonin ve lizin gibi hidrofilik ve yüklü kalıntılarının bağlanmasını sağlar.

NP20 chipleri üzerindeki her bir spot bir damla suyla yıkandı ve kurumaya bırakıldı. 1 µl standart solüsyonu “All-in-one Protein Standard”, 1 µl %100 matriks ile spotlara pipetlendi. Kurutulduktan sonra SELDI-TOF-MS sistemine uygulandı.

#### **3.4.7. SELDI-TOF-MS Cihazında Örneklerin ve Standartın Okunması**

Bioprosesör yardımıyla pipetlenen CM-10, H50 ve IMAC-30, NP20 chipleri pipetlendikleri gün “ProteinChip System Series 4000” cihazında, ilk dönemdeki çalışmalarımızda belirlediğimiz her chipe göre değişen yüksek ve düşük lazer enerji düzeylerinde çalışılarak, elde edilen veriler değerlendirilmek üzere kaydedildi.

### **3.5. İstatistiksel Analizler**

#### **3.5.1. Proteomik Data Analizleri ve Protein Profilinin Belirlenmesi**

CM-10, H50 ve IMAC-30 chipleri ile yapılan proteomik SELDI-TOF-MS çalışmalarının sonuçları “ChiphergenExpress Software” yazılım programı kullanılarak değerlendirildi. Değerlendirme, veri yönetimi (pik belirlenmesi, kalibrasyon, normalizasyon, hizalama, ve spektrum özelliklerinin belirlenmesi) ve istatistiksel analiz (p değerlerinin belirlenmesi, p değerlerinin gösterimi, ROC eğrilerinin hazırlanması, ısı haritalarının çıkarılması) şeklinde iki kısımda gerçekleştirildi. Listelenen ve sinyal-artefakt oranı >5 olarak nitelendirilen 5 000 ile 200 000 kütle/iyon (m/z) değerleri arasındaki tüm spektralar otomatik olarak belirlendi. Pik kümeleri sinyal-artefakt oranı >2 olan ikinci piklerin eklenmesi ile tamamlandı. Pik yoğunlukları 1 500 ile 200 000 arasında olan m/z değerine sahip pikler, toplam iyon akımına göre normalize edildi. Tüm data analizleri, yazılım programı [ProteinChip Software 3.0 (CIPHERGEN, USA)] ile gerçekleştirildi. Aterosklerozun erken dönemindeki protein profilini belirlemek ve darbepoetin aterosklerozda protein profili üzerindeki etkisini belirlemek için darbepoetin-α tedavisi almayan aterosklerotik ApoE<sup>-/-</sup> farelerden elde edilen protein profili, aterosklerotik olmayan kontrol farelerin protein profili ile ve darbepoetin-α tedavisi alan ApoE<sup>-/-</sup> farelerden elde edilen protein profili ile karşılaştırıldı. p değeri 0.05’ten küçük olan peptid/proteinleri içeren pikler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### **3.5.2. Biyokimyasal Analizlerin İstatistiksel Değerlendirmesi**

İstatistiksel değerlendirmeler, “SPSS Statistics 17.0” paket programı kullanılarak yapıldı. Tüm sonuçlar, ortalama± standart hata şeklinde verildi.

### **3.6. Kullanılan Gereçler ve Kimyasal Maddeler**

#### **3.6.1. Gereçler**

Otoanalizör (Roche Hitachi)

Otomatize laboratuvar robotu (Biomek 3000, Beckman)

SELDI-TOF-MS Cihazı (Chiphergen)

Santrifüj (Eppendorf)

Manyetik karıştırıcı (Heidolph)

Hassas terazi (Sartorius 2472)

Buzdolabı (Arcelik, no-frost)

Derin Dondurucu (Sanyo, -80°C)

Deney tüpleri

Eppendorf tüpler (0.25, 1.5 ve 2 ml'lik)

Kapaklı plastik tüpler (15 ve 50 ml'lik)

Otomatik pipetler (Biohit marka, 20-200 ve 100-1000 µl kapasiteli)

Çok kanallı pipetler (Gilson, 0-50 ve 20-300 µl kapasiteli)

Cam pipetler (1, 5, 10 ml'lik)

Cam mezürler, şişeler, balonjojeler, beherler, huniler

96 kuyucuklu plaklar

#### **3.6.2. Kimyasal Malzemeler**

Kimyasal malzemeler, Merck, Sigma ve Biorad'tan temin edildi.

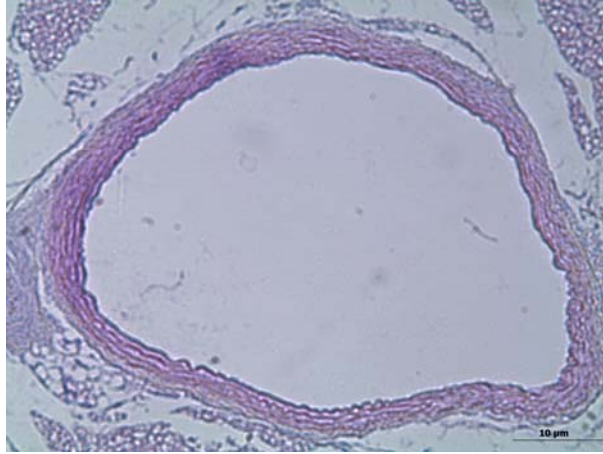
## BULGULAR

### 4.1. Genel Görünüm

Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ( $28,4 \pm 2,3$  g), darbepoetin- $\alpha$  tedavisi almayan ( $26,5 \pm 2,0$  g) aterosklerotik ve kontrol ( $25,7 \pm 1,8$  g) fare gruplarında vücut ağırlıkları arasında anlamlı farklılık bulunmadı. ApoE<sup>-/-</sup> fareler aktivite ve davranışları açısından kontrol farelerinden farklılık göstermedi.

### 4.2. Histopatolojik Analiz Sonuçları

Kontrol (C57BL/6) farelerinin aortlarında ateroskleroz gözlenmedi (Şekil 4.2.1). Aterosklerotik farelerdeki lezyon gelişimi, belli aralıklarla feda edilen farelerden alınan damar örneklerinin incelenmesi ile takip edildi. İlk haftalarda ApoE yetmezlikli (knock-out) farelerden alınan damarlarda belirgin intima-media kalınlaşması gözlenmedi (Şekil 4.2.2).

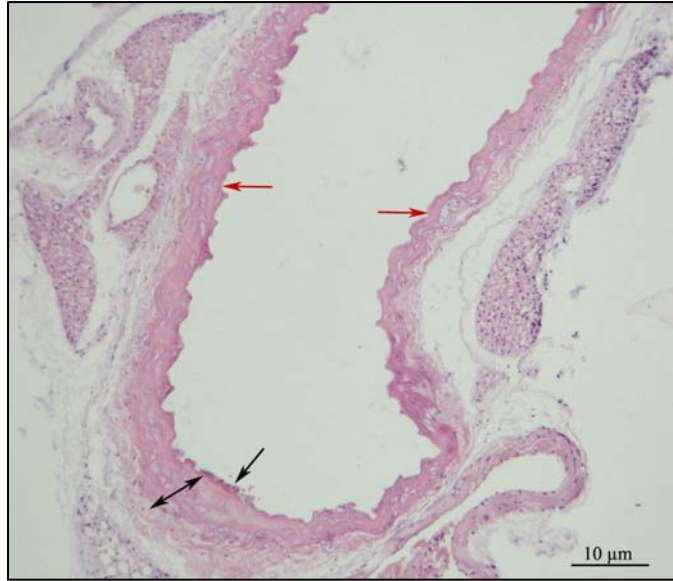


Şekil 4.2.1. Kontrol C57BL/6 farelerin aort damarından elde edilen histolojik görüntü.

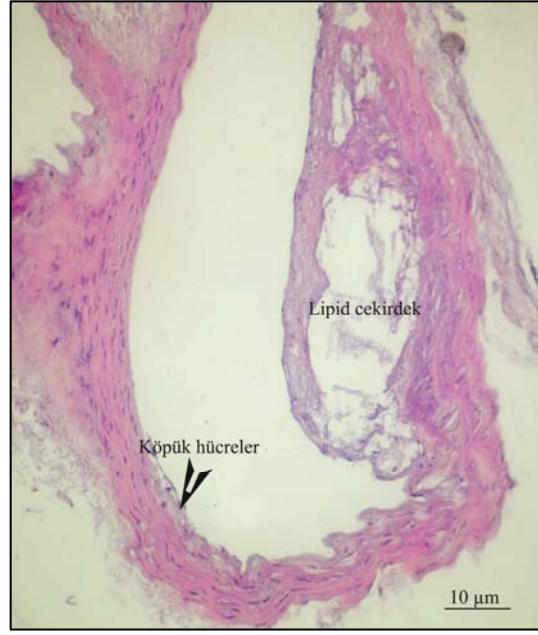


**Şekil 4.2.2.** 8 haftalık ApoE yetmezlikli (knock-out) farelerin aort damarından elde edilen histolojik görüntü.

12 haftalık ApoE yetmezlikli (knock-out) farenin damarından hazırlanan preparatta, lipid birikimleri ve intima-media kalınlaşması belirgindi (Şekil 4.2.3). Lokal lipid birikimleri, damar lümenini daraltacak boyutta olmadığından takibe devam edildi.



**Şekil 4.2.3.** 12 haftalık ApoE yetmezlikli (knock-out) farelerin aort damarından elde edilen histolojik görüntü. Kırmızı oklar normal damar duvarını gösterirken, siyah oklar lipid birikimini ve intima kalınlaşmasını göstermektedir.



**Şekil 4.2.4.** 20 haftalık ApoE yetmezlikli (knock-out) farelerin aort damarından elde edilen histolojik görüntü. Ateroskleroz gelişim süreci içerisinde gözlenen iki aşama (köpük hücreler ve lipid çekirdek) preparatta aynı anda görülmektedir.

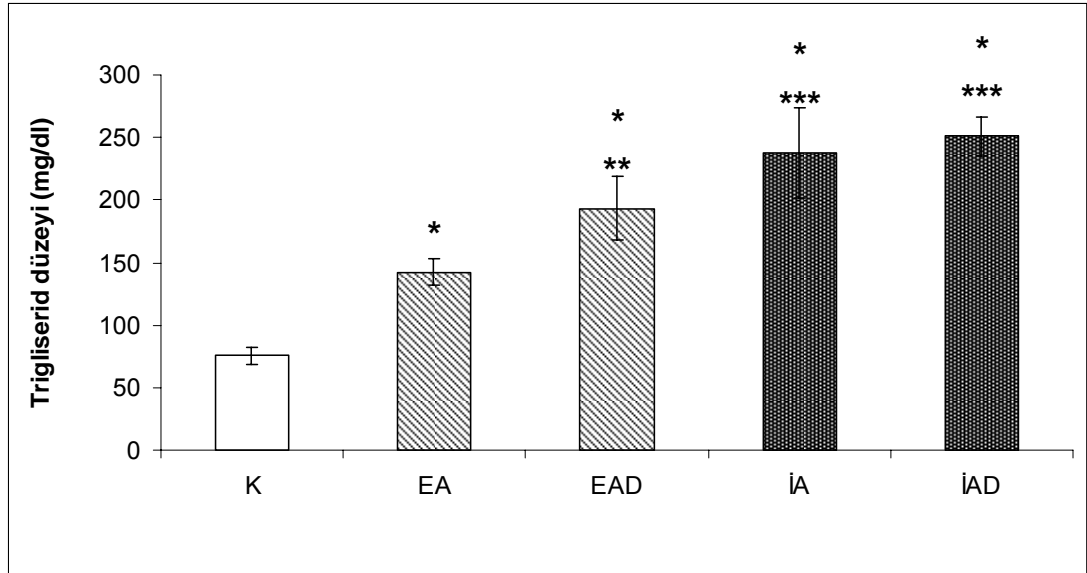
Histolojik takiplerin 20. haftasında ApoE yetmezlikli (knock-out) farelerde, endotel altı dokuda köpük hücrelerinin birikimi, lipid çekirdeğin oluşumu, intima-media kalınlaşması ve lümen daralması ile karakterize belirgin aterosklerotik lezyon gözlemlendi (Şekil 4.2.4).



### 4.3. Biyokimyasal Analiz Sonuçları

#### 4.3.1. Trigliserid Düzeyleri

Kontrol ve aterosklerotik grupların kolesterol düzeyleri Şekil 4.3.1’de verildi. Kontrol grubu ile tüm aterosklerotik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan tüm aterosklerotik grupların trigliserid düzeylerinin, kontrol grubunun trigliserid düzeylerinden istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edildi. ( $p<0.001$ ). Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan ileri aterosklerotik grupların trigliserid düzeyleri, Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan erken aterosklerotik grupların trigliserid düzeylerinden, istatistiksel olarak yüksekdi ( $p>0.05$ ). Darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin, ileri aterosklerotik grupta trigliserid düzeylerine istatistiksel olarak etki etmediği ( $p>0.05$ ), fakat erken ateroskleroz dönemlerinde trigliserid düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı yükselttiği belirlendi ( $p<0.05$ ).

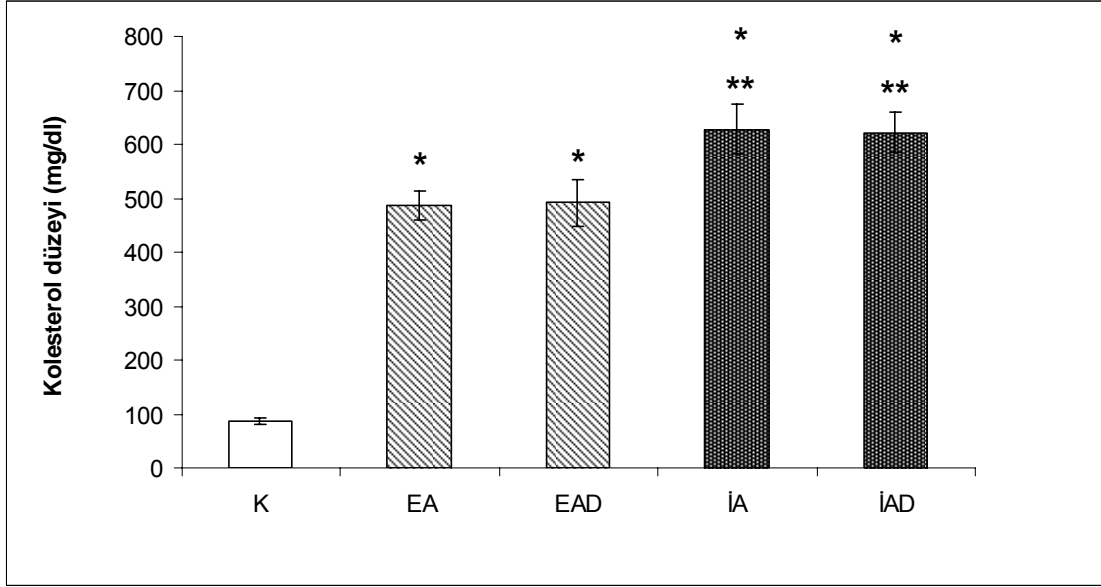


**Şekil 4.3.1.** Deney gruplarının trigliserid düzeyleri. K: Kontrol grubu, EA: Erken ateroskleroz grubu, EAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan erken ateroskleroz grubu, İA: İleri ateroskleroz grubu, İAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ileri ateroskleroz grubu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. \*  $p<0.001$  aterosklerotik grupların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması, \*\*  $p<0.05$  EAD'nin EA ile istatistiksel karşılaştırılması, \*\*\*  $p<0.05$  ileri aterosklerotik grupların erken aterosklerotik gruplar ile istatistiksel karşılaştırılması.

#### 4.3.2. Kolesterol Düzeyi

Kontrol ve aterosklerotik grupların kolesterol düzeyleri Şekil 4.3.2’de verildi. Kontrol grubu ile tüm aterosklerotik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan tüm aterosklerotik grupların kolesterol düzeylerinin, kontrol grubunun kolesterol düzeylerine göre istatistiksel olarak arttığı tespit edildi ( $p<0.001$ ). Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan erken ateroskleroz (EAD ve EA) ve Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan

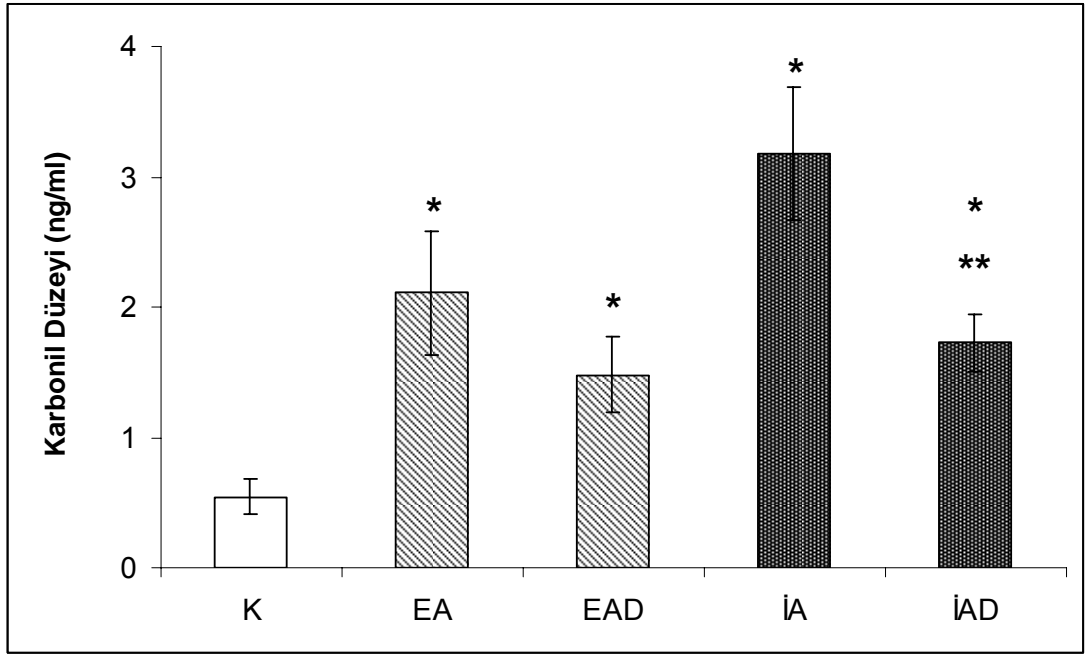
ileri ateroskleroz (İAD ve İA) grupları karşılaştırıldığında, İA ve İAD gruplarının kolesterol düzeylerinin EA ve EAD gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yükseldiği belirlendi ( $p<0.05$ ). Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan EAD ve İAD gruplarının kolesterol düzeyleri ile tedavi almayan EA ve İA gruplarının kolesterol düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.3.2.** Deney gruplarının kolesterol düzeyleri. K: Kontrol grubu, EA: Erken ateroskleroz grubu, EAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan erken ateroskleroz grubu, İA: İleri ateroskleroz grubu, İAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ileri ateroskleroz grubu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. \*  $p<0.001$  aterosklerotik grupların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması \*\*  $p<0.05$  ileri aterosklerotik grupların erken aterosklerotik gruplar ile istatistiksel karşılaştırılması.

### 4.3.3. Karbonil Düzeyleri

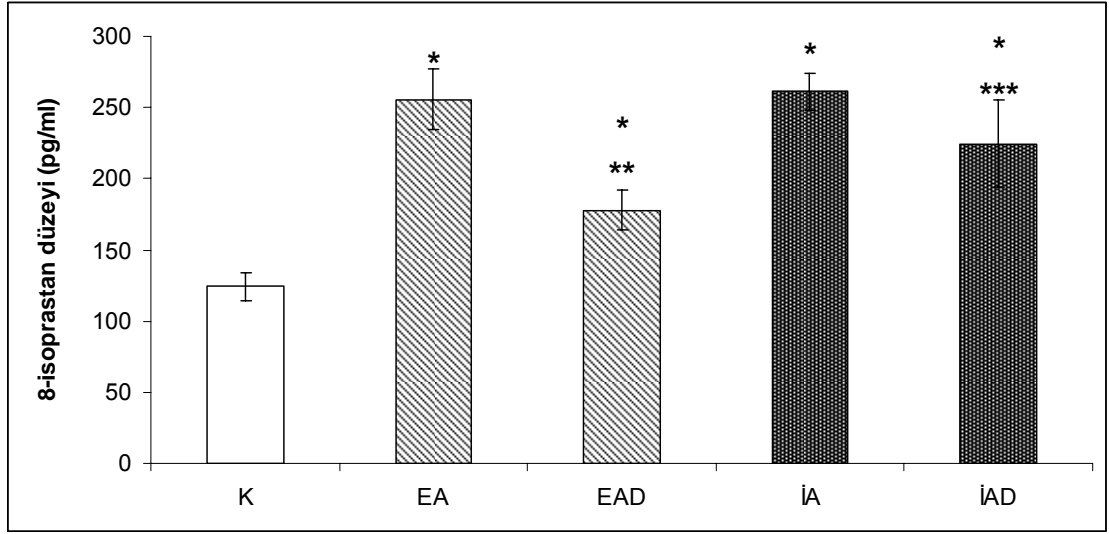
Kontrol ve aterosklerotik grupların karbonil düzeyleri Şekil 4.3.3’de verildi. Kontrol grubu ile tüm aterosklerotik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan tüm aterosklerotik grupların karbonil düzeylerinin, kontrol grubunun karbonil düzeylerine göre arttığı tespit edildi ( $p<0.01$ ). Erken ateroskleroz (EA) ve ileri ateroskleroz (İA) grupları karşılaştırıldığında, karbonil düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı ( $p>0.05$ ). Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan EAD ve İAD grupların karbonil düzeylerinin, tedavi almayan EA ve İA grupların karbonil düzeylerine göre azaldığı, ancak istatistiksel farklılığın sadece İAD ve İA grupları arasında olduğu tespit edildi ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.3.3.** Deney gruplarının karbonil düzeyleri. K: Kontrol grubu, EA: Erken ateroskleroz grubu, EAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan erken ateroskleroz grubu, İA: İleri ateroskleroz grubu, İAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ileri ateroskleroz grubu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. \*  $p<0.001$  aterosklerotik grupların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması \*\*  $p<0.05$  İAD ile İA'nın istatistiksel karşılaştırılması.

#### 4.3.4. 8-İsoprostan Düzeyleri

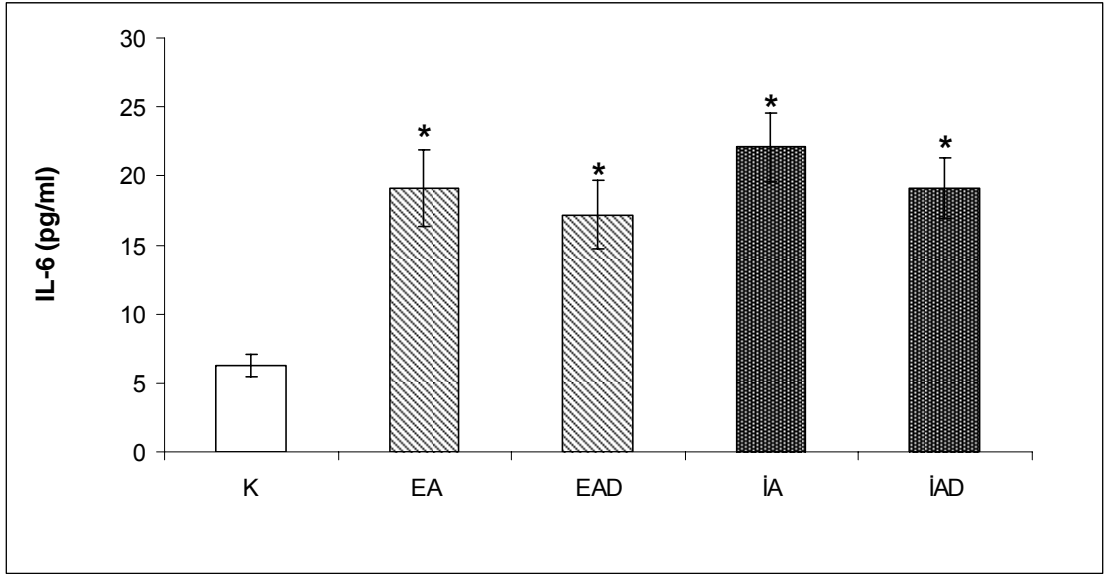
Kontrol ve aterosklerotik grupların 8-İsoprostan düzeyleri Şekil 4.3.4'de verildi. Kontrol grubu ile tüm aterosklerotik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan tüm aterosklerotik grupların 8-İsoprostan düzeylerinin, kontrol grubunun 8-isoprostan düzeylerine göre arttığı tespit edildi ( $p<0.001$ ). Erken ateroskleroz (EA) ve ileri ateroskleroz (İA) grupları karşılaştırıldığında, 8-İsoprostan düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı ( $p>0.05$ ). Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan EAD ve İAD gruplarının 8-İsoprostan düzeylerinin tedavi almayan EA ve İA grupların 8-İsoprostan düzeylerine göre istatistiksel olarak anlamlı azaldığı tespit edildi ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.3.4.** Deney gruplarının 8-isoprostan düzeyleri. K: Kontrol grubu, EA: Erken ateroskleroz grubu, EAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan erken ateroskleroz grubu, İA: İleri ateroskleroz grubu, İAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ileri ateroskleroz grubu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. \*  $p<0.001$  aterosklerotik grupların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması, \*\*  $p<0.01$  EAD'nin EA ile istatistiksel karşılaştırılması, \*\*\*  $p<0.05$  İAD'nin İA ile istatistiksel karşılaştırılması.

#### 4.3.5. İnterlökin-6 (IL-6) Düzeyleri

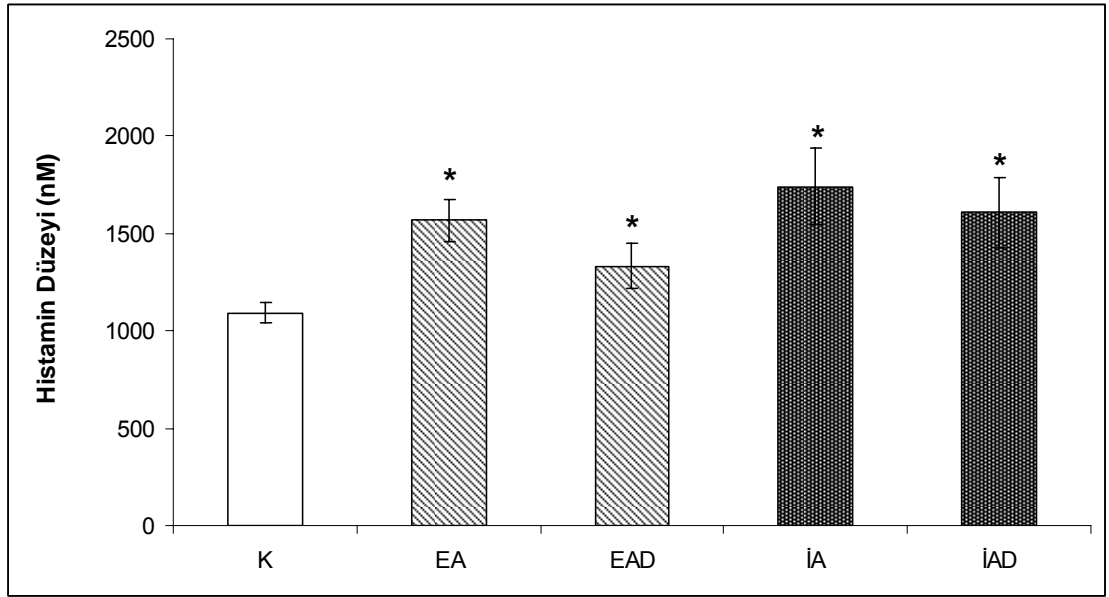
Kontrol ve aterosklerotik grupların IL-6 düzeyleri Şekil 4.3.5'te verildi. Kontrol grubu ile tüm aterosklerotik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan tüm aterosklerotik gruplarının IL-6 düzeylerinin, kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi ( $p<0.001$ ). Erken ateroskleroz (EA) ve ileri ateroskleroz (İA) grupları karşılaştırıldığında, İA grubunun IL-6 düzeylerinde, EA grubunun IL-6 düzeylerine göre belirgin olarak artış olduğu, fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulundu. ( $p>0.05$ ). Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan EAD ve İAD gruplarının IL-6 düzeylerinin, tedavi almayan EA ve İA gruplarının IL-6 düzeylerine göre azaldığı görülse de, aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.3.5.** Deney gruplarının IL-6 düzeyleri. K: Kontrol grubu, EA: Erken ateroskleroz grubu, EAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan erken ateroskleroz grubu, İA: İleri ateroskleroz grubu, İAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ileri ateroskleroz grubu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. \*  $p < 0.001$  aterosklerotik grupların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması

#### 4.3.6. Histamin Düzeyleri

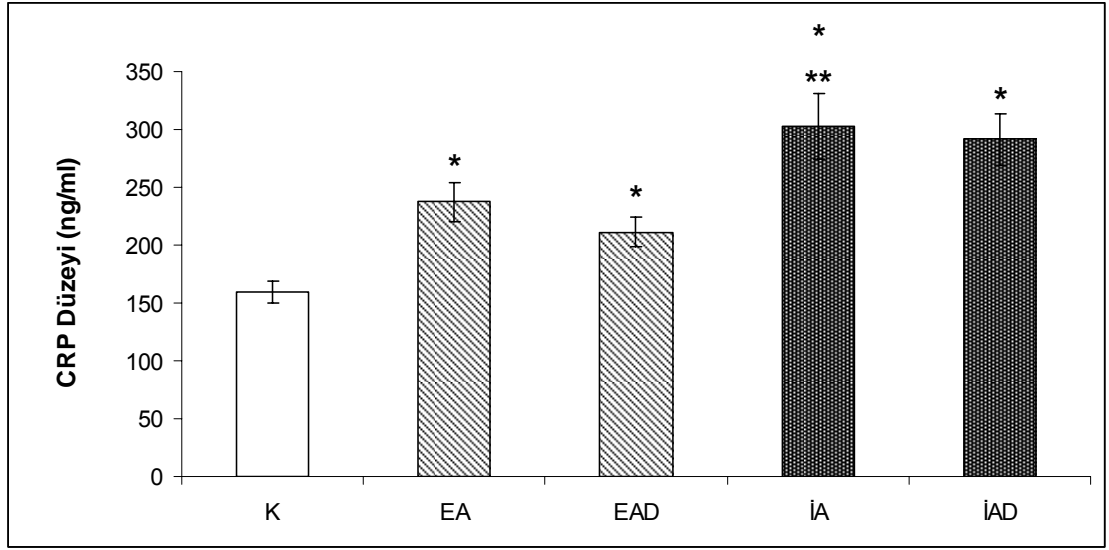
Kontrol ve aterosklerotik grupların histamin düzeyleri Şekil 4.3.6’da verildi. Kontrol grubu ile tüm aterosklerotik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan tüm aterosklerotik gruplarının histamin düzeylerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Erken ateroskleroz (EA) ve ileri ateroskleroz (İA) grupları karşılaştırıldığında, İA grubunun histamin düzeyi EA grubuna göre artmış olsa da, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p > 0.05$ ). Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan EAD ve İAD gruplarının her ikisinde de histamin düzeylerinin, tedavi almayan EA ve İA gruplarının histamin düzeylerine göre azaldığı, fakat farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ( $p > 0.05$ ).



**Şekil 4.3.6.** Deney gruplarının histamin düzeyleri. K: Kontrol grubu, EA: Erken ateroskleroz grubu, EAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan erken ateroskleroz grubu, İA: İleri ateroskleroz grubu, İAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ileri ateroskleroz grubu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. \*  $p<0.05$  aterosklerotik grupların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması.

#### 4.3.7. C-Reaktif Protein (CRP) Düzeyleri

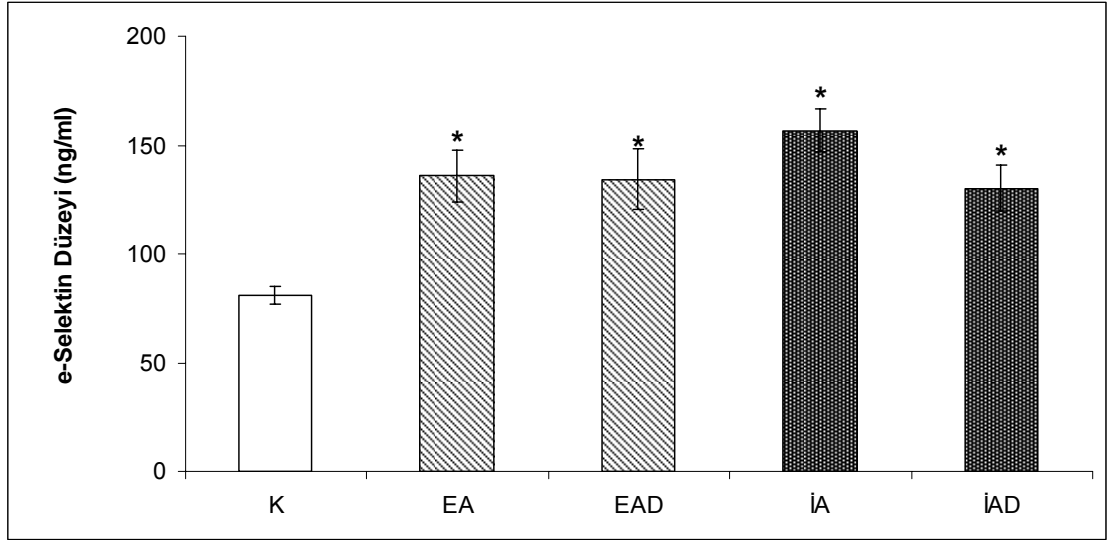
Kontrol ve aterosklerotik grupların CRP düzeyleri Şekil 4.3.7’de verildi. Kontrol grubu ile tüm aterosklerotik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan tüm aterosklerotik grupların CRP düzeylerinin kontrol grubuna göre arttığı tespit edildi ( $p<0.01$ ). Erken ateroskleroz (EA) ve ileri ateroskleroz (İA) grupları karşılaştırıldığında, İA grubunun EA grubundan daha yüksek CRP düzeylerine sahip olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0.01$ ). Bunun yanında darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan EAD ve İAD gruplarının CRP düzeylerinin, tedavi almayan EA ve İA gruplarının CRP düzeylerine göre azalmış olduğu, fakat azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ).



**Şekil 4.3.7.** Deney gruplarının CRP düzeyleri K: Kontrol grubu, EA: Erken ateroskleroz grubu, EAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan erken ateroskleroz grubu, İA: İleri ateroskleroz grubu, İAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ileri ateroskleroz grubu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. \*  $p<0.01$  aterosklerotik grupların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması, \*\*  $p<0.01$  İA'nın EA ile istatistiksel karşılaştırılması.

#### 4.3.8. E-Selektin Düzeyleri

Kontrol ve aterosklerotik grupların E-Selektin düzeyleri Şekil 4.3.8'de verildi. Kontrol grubu ile tüm aterosklerotik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan tüm aterosklerotik gruplarının E-Selektin düzeylerinin, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı bulundu ( $p<0.01$ ). Erken ateroskleroz (EA) ve ileri ateroskleroz (İA) grupları karşılaştırıldığında, İA grubunun EA grubundan daha yüksek E-Selektin düzeylerine sahip olduğu, fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ( $p>0.05$ ). Benzer şekilde, darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan İAD grubunun E-Selektin düzeylerinin, tedavi almayan İA grubunun E-Selektin düzeylerine göre azalmış olduğu, fakat azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ).

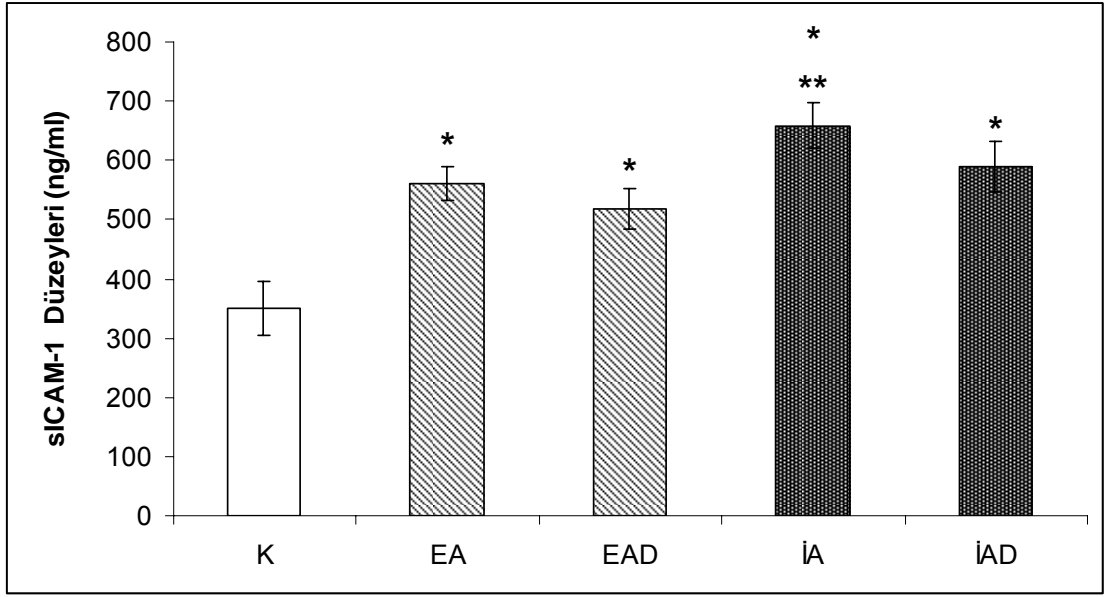


**Şekil 4.3.8.** Deney gruplarının e-selektin düzeyleri. K: Kontrol grubu, EA: Erken ateroskleroz grubu, EAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan erken ateroskleroz grubu, İA: İleri ateroskleroz grubu, İAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ileri ateroskleroz grubu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. \*  $p<0.01$  aterosklerotik grupların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması.

#### 4.3.9. İntraselüler Adezyon Molekülü-1 (sICAM-1) Düzeyleri

Kontrol ve aterosklerotik grupların sICAM-1 düzeyleri Şekil 4.3.9'da verildi. Kontrol grubu ile tüm aterosklerotik gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan tüm aterosklerotik grupların sICAM-1 düzeylerinin, kontrol grubuna göre arttığı bulundu ( $p<0.01$ ). Erken ateroskleroz (EA) ve ileri ateroskleroz (İA) grupları karşılaştırıldığında, İA grubunun EA grubundan daha yüksek sICAM-1 düzeylerine sahip olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ( $p<0.05$ ). Bunun yanında darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan EAD ve İAD gruplarının sICAM-1 düzeylerinin, tedavi almayan EA ve İA gruplarının sICAM-1 düzeylerine göre azalmış olduğu, fakat azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ( $p>0.05$ ).





**Şekil 4.3.9.** Deney gruplarının sICAM-1 düzeyleri. K: Kontrol grubu, EA: Erken ateroskleroz grubu, EAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan erken ateroskleroz grubu, İA: İleri ateroskleroz grubu, İAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ileri ateroskleroz grubu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi. \*  $p < 0.01$  aterosklerotik grupların kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılması, \*\*  $p < 0.05$  İA'nın EA ile istatistiksel karşılaştırılması.

**Tablo 4.3.1.** Kontrol ve ateroskleroz gruplarında kolesterol, trigliserid, karbonil, 8-isoprostan, IL-6, histamin, CRP, e-selektin, ICAM-1 düzeyleri.  
K: Kontrol grubu, EA: Erken ateroskleroz grubu, EAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan erken ateroskleroz grubu, İA: İleri ateroskleroz grubu, İAD: Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ileri ateroskleroz grubu. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata olarak verildi.

|                                | K                   | EA                   | EAD                  | İA                   | İAD                  |
|--------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Kolesterol Düzeyleri (mg/dl)   | 86.10 $\pm$ 5.23    | 485.63 $\pm$ 27.14   | 491.6 $\pm$ 42.52    | 628.3 $\pm$ 47.28    | 622.29 $\pm$ 36.04   |
| Trigliserid Düzeyleri (mg/dl)  | 75.33 $\pm$ 6.74    | 142.28 $\pm$ 10.65   | 193.12 $\pm$ 25.42   | 237.57 $\pm$ 35.98   | 251.00 $\pm$ 15.83   |
| Karbonil Düzeyleri (ng/ml)     | 0.54 $\pm$ 0.14     | 2.20 $\pm$ 0.47      | 1.48 $\pm$ 0.29      | 3.18 $\pm$ 0.50      | 1.72 $\pm$ 0.22      |
| 8-İsoprostan Düzeyleri (pg/ml) | 124.26 $\pm$ 9.89   | 255.84 $\pm$ 21.25   | 177.79 $\pm$ 14.24   | 261.16 $\pm$ 13.35   | 224.58 $\pm$ 30.86   |
| IL-6 Düzeyleri (pg/ml)         | 6.27 $\pm$ 0.84     | 19.12 $\pm$ 2.81     | 17.19 $\pm$ 2.49     | 22.08 $\pm$ 2.49     | 19.10 $\pm$ 2.22     |
| Histamin Düzeyleri (nM)        | 1090.96 $\pm$ 52.44 | 1568.41 $\pm$ 107.98 | 1332.34 $\pm$ 116.72 | 1741.78 $\pm$ 193.56 | 1607.42 $\pm$ 182.70 |
| CRP Düzeyleri (ng/ml)          | 159.66 $\pm$ 9.36   | 237.50 $\pm$ 17.22   | 211.37 $\pm$ 12.40   | 302.85 $\pm$ 28.42   | 291.59 $\pm$ 22.20   |
| e-Selektin Düzeyleri (ng/ml)   | 80.86 $\pm$ 3.92    | 135.92 $\pm$ 12.02   | 134.34 $\pm$ 13.84   | 156.652 $\pm$ 9.838  | 130.27 $\pm$ 10.44   |
| ICAM-1 Düzeyleri (ng/ml)       | 350.14 $\pm$ 45.68  | 560.33 $\pm$ 28.69   | 519.16 $\pm$ 34.53   | 658.00 $\pm$ 38.38   | 588.50 $\pm$ 42.94   |

#### 4.4. Proteomik Analiz Verileri

Belirgin ateroskleroz oluştuğu saptandığında (20. hafta), ApoE yetmezlikli (knock-out) ve aynı yaştaki kontrol farelerden eter anestesizi altında proteomik analizler için kan örnekleri alındı. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan ateroskleroz ve kontrol grupları arasındaki serum proteomik değişikliklerini belirlemek için tüm farelerden alınan serum örnekleri SELDI-TOF-MS teknolojisi kullanılarak analiz edildi.

##### 4.4.1. Kontrol ve Ateroskleroz Gruplarının SELDI-TOF-MS Analiz Verileri

Kontrol ve ateroskleroz gruplarından elde edilen 4 farklı serum fraksiyonunun, 3 farklı chipte (CM10, H50, IMAC30) toplam 12 farklı analizinin, düşük ve yüksek lazer enerjisi ile okunup, değerlendirilmesi sonucunda, molekül ağırlığı >5 kDa olan toplam 742 tane kümelenmiş protein/peptid piki belirlendi. 742 protein/peptid pikinden, 107 tanesinin sinyal yoğunluklarının (protein ekspresyon göstergesi), aterosklerotik serum örneklerinde kontrole göre istatistiksel bakımdan anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Tablo 4.4.1'de, düşük ve yüksek lazer enerjisi ile okunan 3 farklı chipte istatistiksel olarak anlamlı ekspresyon farklılığı gösteren 107 protein/peptidin, kütle/iyon oranı (m/z) değerleri, elde edildikleri serum fraksiyonları, kontrol ve aterosklerotik gruplardaki pik yoğunlukları ve istatistiksel anlamlılık değerleri gösterilmektedir.

Toplam 107 protein/peptid pikinden 63'unun istatistiksel anlamlılığı (p) 0.0-0.01 arasında, kalan 44'unun ise 0.01-0.05 arasında bulundu. 107 protein/peptid pikinden 66'sinin sinyal yoğunlukları, ateroskleroz grubunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yüksek (upregüle), 41 pikin sinyal yoğunlukları ise ateroskleroz grubunda kontrol grubuna göre düşüktü (downregüle).

**Tablo 4.4.1.** Kontrol ve ateroskleroz gruplarında sinyal yoğunlukları istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren peptid/proteinler

|                         | m/z<br>(Ort±SS) | Fraksiyon | p-değeri | Yoğunluk   |              |
|-------------------------|-----------------|-----------|----------|------------|--------------|
|                         |                 |           |          | Kontrol    | Ateroskleroz |
| CM10 Düşük Lazer Enerji | 7000.71±0.00    | 1/2       | 0.020    | 0.88±0.37  | 2.68±1.59    |
|                         | 7849.98±6.61    | 1/2       | 0.020    | 17.31±4.40 | 11.55±1.73   |
|                         | 7878.79±3.22    | 1/2       | 0.038    | 14.31±1.84 | 11.59±2.57   |
|                         | 7931.39±7.65    | 1/2       | 0.020    | 15.10±2.02 | 12.34±2.40   |
|                         | 13767.02±24.52  | 3         | 0.007    | 1.498±0.34 | 2.12±0.37    |
|                         | 14003.45±22.14  | 3         | 0.016    | 1.30±0.35  | 1.72±0.31    |
|                         | 30608.41±223.96 | 3         | 0.009    | 0.32±0.08  | 0.22±0.04    |
|                         | 13826.45±27.33  | 4         | 0.024    | 0.30±0.45  | 0.48±0.17    |
|                         | 25930.59±34.09  | 4         | 0.003    | 0.22±0.03  | 0.29±0.04    |
|                         | 27945.29±19.90  | 4         | 0.001    | 0.19±0.12  | 0.05±0.021   |
|                         | 9350.90±7.82    | 5/6       | 0.007    | 4.22±0.84  | 3.22±0.43    |
|                         | 10764.21±5.10   | 5/6       | 0.001    | 0.29±1.10  | 0.75±0.24    |
|                         | 13987.15±3.49   | 5/6       | 0.037    | 2.78±0.72  | 2.09±0.48    |
|                         | 14420.80±4.64   | 5/6       | 0.049    | 0.90±0.27  | 1.26±0.30    |
|                         | 21500.34±9.73   | 5/6       | 0.001    | 0.18±0.05  | 0.45±0.15    |
|                         | 22026.36±12.32  | 5/6       | 0.020    | 0.23±0.08  | 0.33±0.06    |
|                         | 28030.50±9.37   | 5/6       | 0.037    | 0.79±0.14  | 0.58±0.18    |

|                          | m/z<br>(Ort±SS)  | Fraksiyon | p-değeri | Yoğunluk  |              |
|--------------------------|------------------|-----------|----------|-----------|--------------|
|                          |                  |           |          | Kontrol   | Ateroskleroz |
| CM10 Yüksek Lazer Enerji | 29849.32±53.78   | 1/2       | 0.045    | 1.22±0.24 | 0.78±0.33    |
|                          | 42512.89±138.72  | 3         | 0.002    | 0.25±0.09 | 0.46±0.16    |
|                          | 49898.81±289.86  | 3         | 0.020    | 0.14±0.05 | 0.07±0.02    |
|                          | 71937.12±263.52  | 3         | 0.020    | 0.60±0.06 | 0.69±0.06    |
|                          | 25878.55±25.57   | 4         | 0.015    | 0.46±0.08 | 0.58±0.05    |
|                          | 27929.50±32.21   | 4         | 0.001    | 0.62±0.26 | 0.13±0.05    |
|                          | 29288.73±492.78  | 4         | 0.020    | 0.30±0.11 | 0.16±0.02    |
|                          | 42945.29±34.76   | 4         | 0.001    | 0.13±0.03 | 0.26±0.08    |
|                          | 165477.86±347.25 | 4         | 0.035    | 0.03±0.01 | 0.02±0.00    |
|                          | 21722.77±79.24   | 5/6       | 0.002    | 0.46±0.16 | 0.94±0.28    |
|                          | 22209.50±80.09   | 5/6       | 0.007    | 0.54±0.14 | 0.70±0.15    |
|                          | 28069.94±21.91   | 5/6       | 0.003    | 2.87±0.80 | 1.69±0.42    |
|                          | 34007.35±30.82   | 5/6       | 0.001    | 0.65±0.14 | 0.44±0.08    |
|                          | 43122.35±41.94   | 5/6       | 0.001    | 0.36±0.12 | 0.78±0.24    |
|                          | 45201.99±705.16  | 5/6       | 0.001    | 0.29±0.06 | 0.43±0.05    |

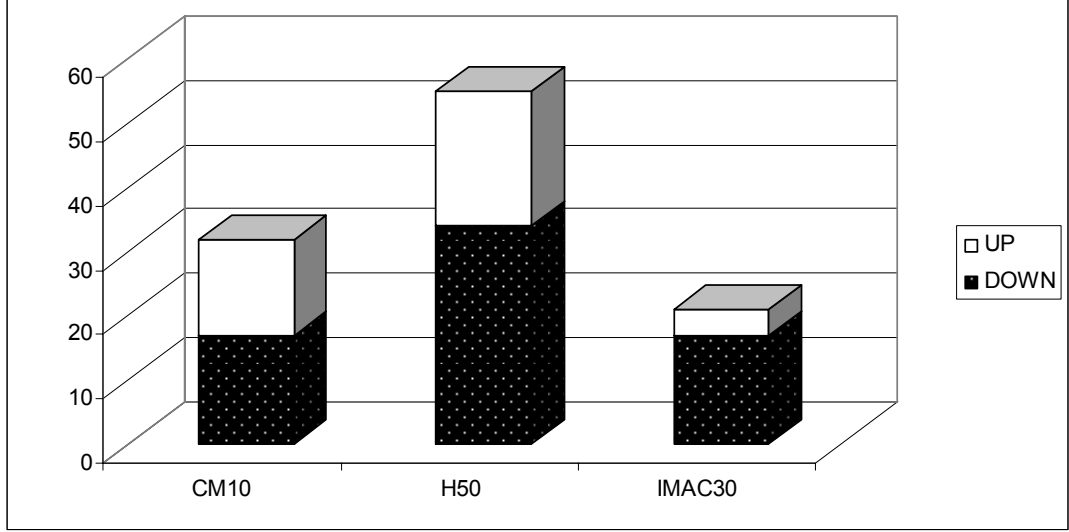
|                        | m/z<br>(Ort±SS) | Fraksiyon | p-değeri | Yoğunluk    |              |
|------------------------|-----------------|-----------|----------|-------------|--------------|
|                        |                 |           |          | Kontrol     | Ateroskleroz |
| H50 Düşük Lazer Enerji | 6993.80±0.23    | 1/2       | 0.028    | 0.13±0.06   | 0.70±0.09    |
|                        | 7034.39±0.00    | 1/2       | 0.005    | 0.57±0.36   | 1.22±1.06    |
|                        | 7858.10±34.22   | 1/2       | 0.040    | 51.10±11.80 | 42.92±12.83  |
|                        | 9521.56±0.00    | 1/2       | 0.008    | 0.12±0.10   | 0.46±0.63    |
|                        | 10969.69±46.74  | 3         | 0.030    | 1.57±0.77   | 3.61±2.10    |
|                        | 14439.24±9.05   | 3         | 0.046    | 2.68±1.63   | 4.86±2.53    |
|                        | 14626.78±11.36  | 3         | 0.024    | 1.89±1.35   | 3.47±1.88    |
|                        | 30705.32±896.89 | 3         | 0.001    | 0.58±0.42   | 0.19±0.08    |
|                        | 6942.05±71.58   | 4         | 0.043    | 8.62±3.76   | 6.92±1.74    |
|                        | 8817.46±8.89    | 4         | 0.026    | 23.84±3.49  | 48.96±3.45   |
|                        | 8918.48±30.58   | 4         | 0.043    | 8.98±5.45   | 12.66±4.49   |
|                        | 10743.23±42.71  | 4         | 0.016    | 1.09±0.73   | 2.74±1.72    |
|                        | 13944.76±15.39  | 4         | 0.034    | 2.95±2.90   | 1.85±0.37    |
|                        | 21556.38±30.16  | 4         | 0.001    | 0.57±0.25   | 1.67±0.71    |
|                        | 22440.49±177.71 | 4         | 0.007    | 0.56±0.30   | 1.11±0.23    |
|                        | 25981.01±31.88  | 4         | 0.004    | 0.76±0.47   | 1.62±0.53    |
|                        | 7015.94±14.98   | 5/6       | 0.002    | 22.63±6.16  | 15.82±5.02   |
|                        | 8852.70±18.81   | 5/6       | 0.004    | 29.07±6.23  | 43.17±9.81   |
|                        | 9352.48±9.45    | 5/6       | 0.003    | 40.99±8.29  | 28.92±8.82   |
|                        | 10819±10.89     | 5/6       | 0.005    | 1.98±0.71   | 4.02±1.68    |
|                        | 12739.20±16.10  | 5/6       | 0.001    | 2.14±0.83   | 0.03±0.11    |
|                        | 13259.09±13.02  | 5/6       | 0.009    | 2.99±1.66   | 1.43±0.47    |
|                        | 13975.53±0.00   | 5/6       | 0.001    | 7.92±1.96   | 4.91±1.25    |
|                        | 14053.49±8.09   | 5/6       | 0.001    | 27.47±6.05  | 16.87±5.07   |
|                        | 21556.33±13.87  | 5/6       | 0.007    | 0.82±0.25   | 1.46±0.52    |
|                        | 27944.89±38.47  | 5/6       | 0.002    | 3.55±1.77   | 1.80±0.43    |
|                        | 28169.70±24.54  | 5/6       | 0.002    | 6.92±1.56   | 4.23±1.10    |
|                        | 29000.03±18.80  | 5/6       | 0.012    | 5.58±1.28   | 4.09±0.98    |

|                         | m/z<br>(Ort±SS)   | Fraksiyon | p-değeri | Yoğunluk  |              |
|-------------------------|-------------------|-----------|----------|-----------|--------------|
|                         |                   |           |          | Kontrol   | Ateroskleroz |
| H50 Yüksek Lazer Enerji | 30685.36±374.01   | 3         | 0.009    | 0.45±0.11 | 0.26±0.13    |
|                         | 43066.98±86.12    | 3         | 0.005    | 0.87±0.41 | 2.12±0.55    |
|                         | 43716.60±172.72   | 3         | 0.002    | 0.73±0.29 | 1.92±0.52    |
|                         | 51857.56±77.01    | 3         | 0.039    | 0.15±0.07 | 0.31±0.14    |
|                         | 86889.98±1739.78  | 3         | 0.039    | 0.06±0.08 | 0.11±0.05    |
|                         | 106226.49±2063.36 | 3         | 0.017    | 0.02±0.01 | 0.03±0.01    |
|                         | 21501.56±57.99    | 4         | 0.006    | 0.72±0.27 | 1.74±0.29    |
|                         | 22414.93±307.89   | 4         | 0.006    | 0.59±0.10 | 1.33±0.19    |
|                         | 24488.70±203.34   | 4         | 0.006    | 0.09±0.06 | 0.31±0.07    |
|                         | 28022.37±9.69     | 4         | 0.010    | 6.41±1.92 | 3.20±0.75    |
|                         | 28949.02±13.74    | 4         | 0.006    | 4.40±0.92 | 2.61±0.52    |
|                         | 36736.90±59.22    | 4         | 0.028    | 0.12±0.06 | 0.03±0.01    |
|                         | 42988.66±0.00     | 4         | 0.006    | 0.19±0.04 | 0.92±0.16    |
|                         | 43162.98±23.09    | 4         | 0.006    | 0.42±0.12 | 1.50±0.22    |
|                         | 44140.31±54.98    | 4         | 0.006    | 0.30±0.04 | 1.15±0.15    |
|                         | 60494.80±1337.07  | 4         | 0.028    | 0.31±0.15 | 0.12±0.04    |
|                         | 66373.68±162.00   | 4         | 0.006    | 0.86±0.32 | 1.36±0.13    |
|                         | 21768.33±76.38    | 5/6       | 0.001    | 0.37±0.14 | 0.91±0.15    |
|                         | 28062.34±19.39    | 5/6       | 0.001    | 4.54±0.44 | 3.19±0.36    |
|                         | 29005.23±12.48    | 5/6       | 0.016    | 3.24±0.22 | 2.92±0.22    |
|                         | 33609.35±379.12   | 5/6       | 0.027    | 0.32±0.09 | 0.22±0.05    |
|                         | 43133.12±9.77     | 5/6       | 0.001    | 0.19±0.05 | 0.56±0.12    |
|                         | 43296.57±27.37    | 5/6       | 0.001    | 0.28±0.05 | 0.80±0.13    |
|                         | 44206.09±56.63    | 5/6       | 0.001    | 0.19±0.04 | 0.54±0.08    |
|                         | 51852.21±274.66   | 5/6       | 0.043    | 0.03±0.01 | 0.06±0.03    |
|                         | 57870.93±485.22   | 5/6       | 0.004    | 0.16±0.02 | 0.11±0.01    |

| IMAC30 Düşük Lazer Enerji | m/z<br>(Ort±SS) | Fraksiyon | p-değeri | Yoğunluk   |              |
|---------------------------|-----------------|-----------|----------|------------|--------------|
|                           |                 |           |          | Kontrol    | Ateroskleroz |
|                           | 6857.99±3.70    | 1/2       | 0.032    | 10.91±2.68 | 32.22±20.58  |
|                           | 13936.41±46.72  | 3         | 0.049    | 2.01±1.46  | 2.49±0.52    |
|                           | 27655.79±392.43 | 4         | 0.034    | 1.01±0.65  | 0.38±0.24    |
|                           | 21094.72±30.53  | 5/6       | 0.001    | 0.47±0.22  | 1.16±0.36    |
|                           | 21550.59±55.46  | 5/6       | 0.001    | 1.50±0.53  | 4.70±1.04    |
|                           | 22000.59±55.14  | 5/6       | 0.001    | 2.26±0.68  | 4.49±0.61    |
|                           | 29997.95±47.80  | 5/6       | 0.020    | 2.29±0.76  | 1.84±0.44    |

| IMAC30 Yüksek Lazer Enerji | m/z<br>(Ort±SS)   | Fraksiyon | p-değeri | Yoğunluk  |              |
|----------------------------|-------------------|-----------|----------|-----------|--------------|
|                            |                   |           |          | Kontrol   | Ateroskleroz |
|                            | 125385.25±826.97  | 1/2       | 0.032    | 0.04±0.01 | 0.06±0.02    |
|                            | 140077.41±911.68  | 1/2       | 0.022    | 0.01±0.00 | 0.02±0.01    |
|                            | 33126.18±14.25    | 4         | 0.005    | 4.85±0.52 | 5.76±0.62    |
|                            | 59110.09±562.85   | 4         | 0.049    | 0.45±0.12 | 0.60±0.15    |
|                            | 66060.59±32.69    | 4         | 0.007    | 9.38±1.75 | 11.64±1.17   |
|                            | 96719.61±0.00     | 4         | 0.010    | 0.12±0.02 | 0.09±0.02    |
|                            | 21608.67±148.95   | 5/6       | 0.002    | 0.77±0.24 | 1.41±0.30    |
|                            | 30673.93±253.76   | 5/6       | 0.002    | 0.61±0.24 | 0.31±0.07    |
|                            | 33192.75±61.49    | 5/6       | 0.002    | 1.52±0.38 | 2.37±0.40    |
|                            | 43220.10±71.23    | 5/6       | 0.001    | 0.39±0.15 | 1.04±0.26    |
|                            | 45161.38±459.12   | 5/6       | 0.001    | 0.40±0.09 | 0.75±0.05    |
|                            | 66152.79±251.58   | 5/6       | 0.002    | 2.46±0.74 | 3.88±0.58    |
|                            | 66792.12±58.29    | 5/6       | 0.002    | 1.83±0.66 | 3.05±0.62    |
|                            | 131167.74±1979.19 | 5/6       | 0.022    | 3.05±0.17 | 0.55±0.09    |

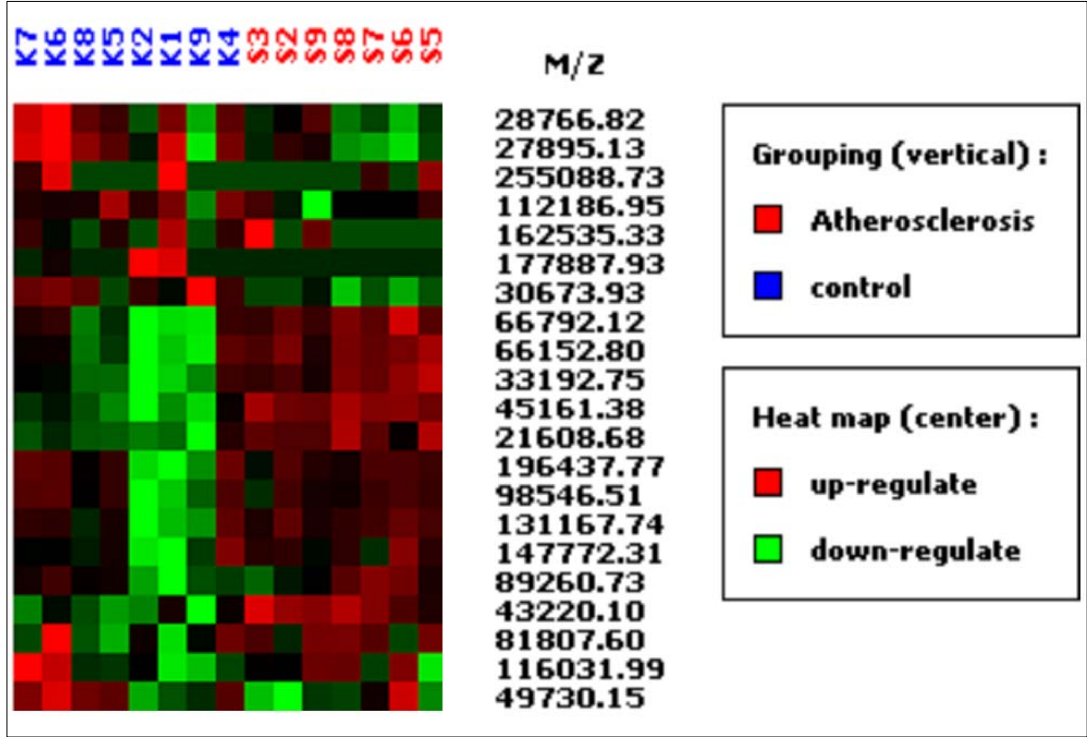
Ateroskleroz grubunda kontrol grubuna göre sinyal yoğunluğu belirgin olarak yüksek (up) ya da düşük (down) protein/peptidlerin sayısı farklı chiplere göre Şekil 4.4.1’de gösterilmektedir. Yapılan analiz ve istatistiksel değerlendirmelere göre yüksek ve düşük sinyal yoğunluğu gösteren piklerin sayısı en fazla H50, en az pik sayısı da IMAC30 chipinde bulundu.



**Şekil 4.4.1.** Kontrol ve ateroskleroz gruplarında sinyal yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı peptid/proteinlerin farklı chiplerdeki sayısı. Yüksek (Up) ya da düşük (down) olarak eksprese edilen pik gruplarının toplam sayısı gösterilmiştir.

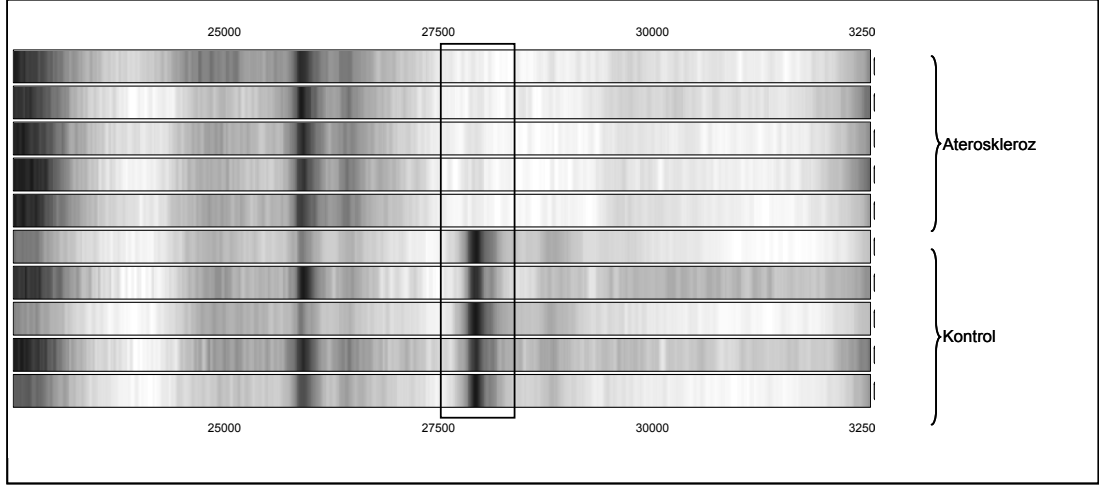
Tablo 4.4.1’de yer alan istatistiksel olarak anlamlı 107 peptid/protein pikinden bazıları aşağıda farklı şekillerde de gösterilmektedir. F5/6 fraksiyonun IMAC30 chipinde yüksek lazer enerjisi ile okunmasından elde edilen pik yoğunlukları Şekil 4.4.2’de ısı haritası olarak verilmiştir.



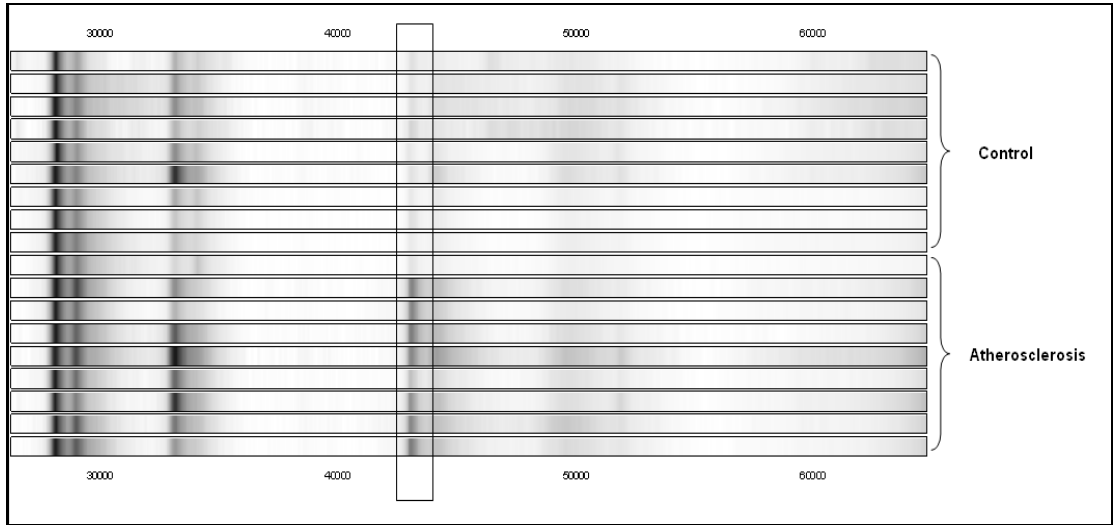


Şekil 4.4.2. Fraksiyon 5/6 dan elde edilen örneklerin protein paterninin IMAC30 chipinde yüksek lazer enerjisi kullanılarak elde edilen ısı haritası. Harita içerisindeki kırmızı bölgeler ekspresyonu yüksek (upregüle), yeşil bölgeler ise ekspresyonu düşük (downregüle) protein/peptidleri göstermektedir. Gruplar mavi (kontrol) ve kırmızı (ateroskleroz) ile haritanın üst kısmında gösterilmiştir. Isı haritasının sağ tarafındaki sayısal değerler bu chipde elde edilen istatistiksel olarak anlamlı protein/peptidlerin kütle/iyon oranı (m/z, dalton) değerlerini göstermektedir.

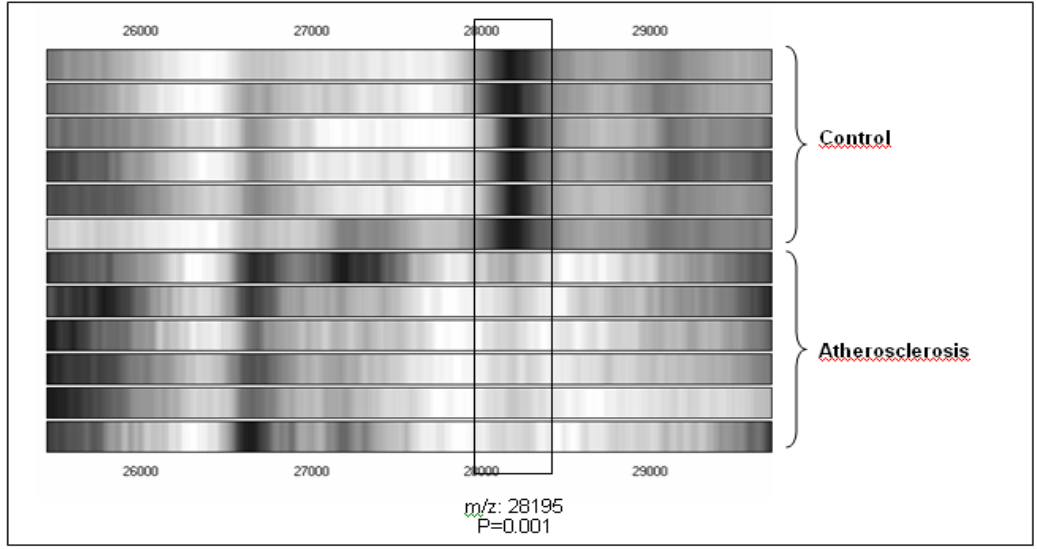
Kontrol ve ateroskleroz gruplarında istatistiksel olarak farklı olan bazı peptid/proteinlerin jel görüntüleri Şekil 4.4.3, Şekil 4.4.4 ve Şekil 4.4.5’de verilmektedir.



**Şekil 4.4.3.** CM10 chipinde Fraksiyon 4’den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 27945 dalton m/z değerine sahip bir proteinin jel görüntüsü. Bu proteinin yoğunluğu ateroskleroz grubunda kontrol grubuna göre düşüktü (downregüle).

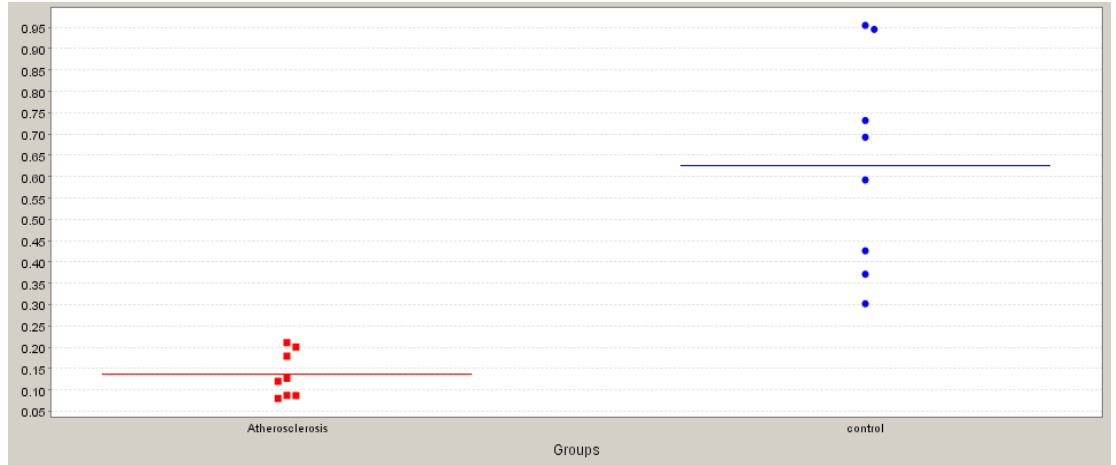


**Şekil 4.4.4.** CM10 chipinde Fraksiyon 5/6’den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 43006 dalton m/z değerine sahip bir proteinin jel görüntüsü. Bu proteinin yoğunluğu ateroskleroz grubunda kontrol grubuna göre yüksekti (upregüle).

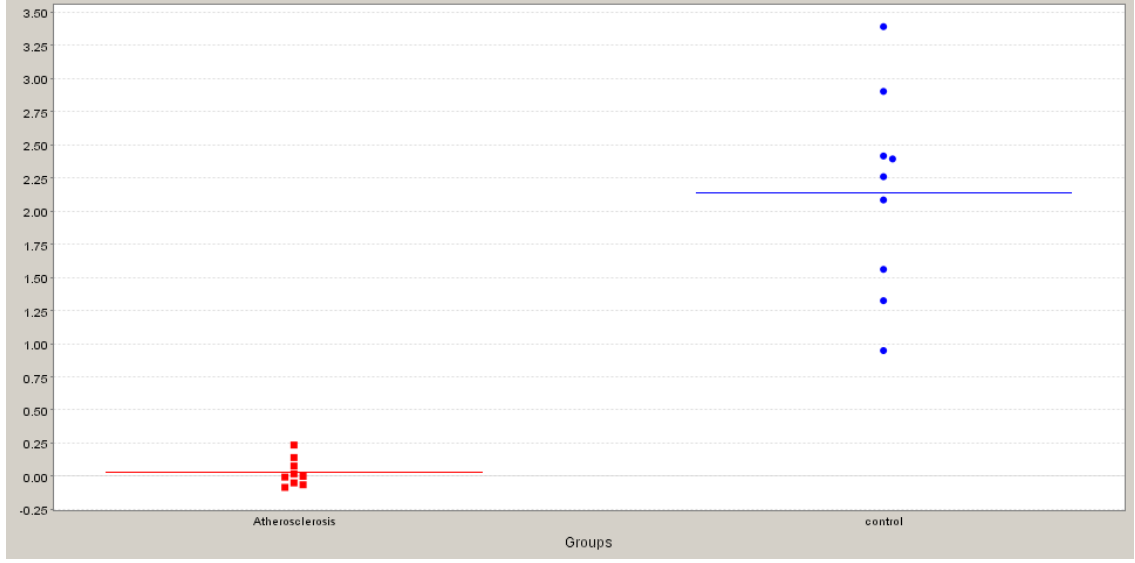


**Şekil 4.4.5.** IMAC30 chipinde Fraksiyon 4'den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 28195 dalton m/z değerine sahip bir proteinin jel görüntüsü. Bu proteinin yoğunluğu ateroskleroz grubunda kontrol grubuna göre düşüktü (downregüle).

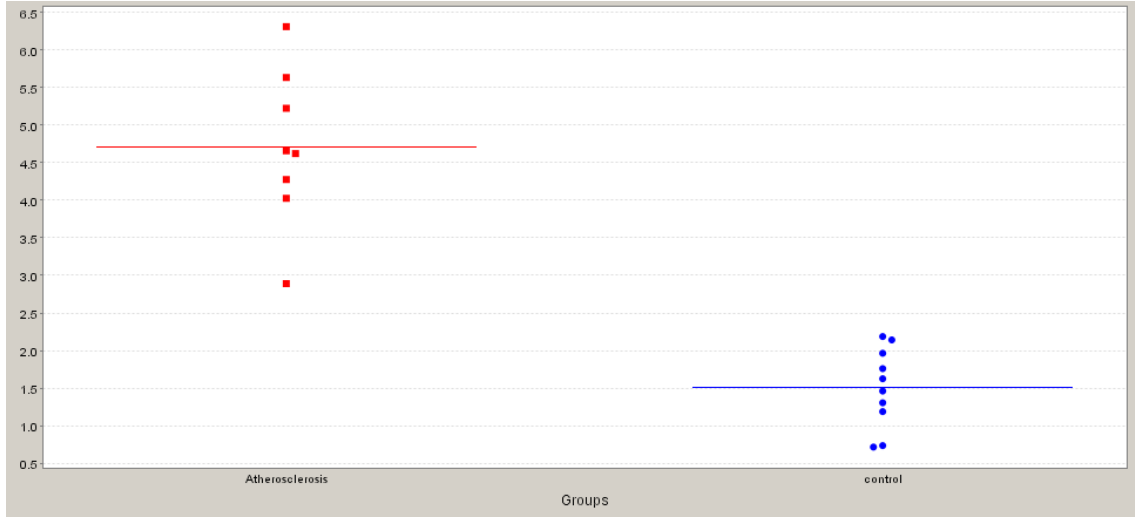
Ateroskleroz ve kontrol grubunda istatistiksel olarak farklı olan bazı peptid/proteinlerin kümeleme görüntüsü Şekil 4.4.6, Şekil 4.4.7 ve Şekil 4.4.8'de verilmektedir.



**Şekil 4.4.6.** CM10 chipinde Fraksiyon 4'den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 27925 dalton m/z değerine sahip bir proteinin kümeleme görüntüsü. Bu proteinin yoğunluğu ateroskleroz grubunda kontrol grubuna göre düşüktü (downregüle).



**Şekil 4.4.7.** H50 chipinde Fraksiyon 5/6'den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 12739 dalton m/z değerine sahip bir proteinin kümeleme görüntüsü. Bu proteinin yoğunluğu ateroskleroz grubunda kontrol grubuna göre düşüktü (downregüle).



**Şekil 4.4.8.** IMAC30 chipinde Fraksiyon 5/6'den elde edilen, ateroskleroz ve kontrol grubunda farklı yoğunluk gösteren 21550 dalton m/z değerine sahip bir proteinin kümeleme görüntüsü. Bu proteinin yoğunluğu ateroskleroz grubunda kontrol grubuna göre yüksekti (upregüle).

#### **4.4.2. Darbepoetin- $\alpha$ Tedavisi Alan ve Almayan Ateroskleroz gruplarının SELDI-TOF-MS Analiz Verileri**

Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan ateroskleroz gruplarından elde edilen 4 farklı serum fraksiyonunun, 3 farklı chipte (CM10, H50, IMAC30) toplam 12 farklı analizinin, düşük ve yüksek lazer enerjisi ile okunup, değerlendirilmesi sonucunda, molekül ağırlığı >5 kDa olan toplam 145 tane kümelenmiş protein/peptid pikinde sinyal yoğunluklarının (protein ekspresyon göstergesi), anlamlı olarak farklı olduğu tespit edildi ( $p < 0.05$ ). Tablo 4.4.2'de, düşük ve yüksek lazer enerjisi ile okunan 3 farklı chipte istatistiksel olarak anlamlı yoğunluk (ekspresyon) farklılığı gösteren 145 protein/peptidin, kütle/iyon oranı (m/z) değerleri, elde edildikleri serum fraksiyonları, darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplardaki pik yoğunlukları ve istatistiksel anlamlılık değerleri gösterilmektedir.

145 protein/peptid pikinden 74'unun sinyal yoğunlukları, darbepoetin- $\alpha$  ile tedavi edilen ateroskleroz grubunda tedavi edilmeyen ateroskleroz grubu ile karşılaştırıldığında yüksek (upregüle), 71 pikin sinyal yoğunlukları ise darbepoetin- $\alpha$  ile tedavi edilen ateroskleroz grubunda tedavi edilmeyen ateroskleroz grubuna göre düşüktü (downregüle).

**Tablo 4.4.2.** Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplarda sinyal yoğunlukları istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren peptid/proteinler

|                         | m/z<br>(Ort $\pm$ SS) | Fraksiyon | p-değeri | Yoğunluk   |   |
|-------------------------|-----------------------|-----------|----------|--|---|
|                         |                       |           |          | Darbepoetin- $\alpha$<br>almayan<br>aterosklerotik<br>grup | Darbepoetin- $\alpha$<br>alan<br>aterosklerotik<br>grup |
| CM10 Düşük Lazer Enerji | 7849.98 $\pm$ 6.99    | 1/2       | 0.003    | 11.56 $\pm$ 1.91   | 4.92 $\pm$ 1.42   |
|                         | 7878.79 $\pm$ 3.03    | 1/2       | 0.003    | 11.59 $\pm$ 2.76   | 3.23 $\pm$ 1.00   |
|                         | 7899.17 $\pm$ 2.75    | 1/2       | 0.003    | 12.02 $\pm$ 3.07   | 2.54 $\pm$ 0.45   |
|                         | 7931.39 $\pm$ 7.52    | 1/2       | 0.003    | 12.34 $\pm$ 2.86   | 3.76 $\pm$ 0.99   |
|                         | 11687.76 $\pm$ 47.11  | 1/2       | 0.003    | 0.73 $\pm$ 0.29  | 3.86 $\pm$ 1.33   |
|                         | 15791.43 $\pm$ 8.51   | 1/2       | 0.012    | 7.51 $\pm$ 2.06  | 3.73 $\pm$ 1.66   |
|                         | 15868.38 $\pm$ 13.40  | 1/2       | 0.019    | 7.17 $\pm$ 1.88  | 4.44 $\pm$ 1.79   |
|                         | 16376.30 $\pm$ 36.86  | 1/2       | 0.013    | 3.96 $\pm$ 1.36  | 1.55 $\pm$ 0.49   |
|                         | 19380.00 $\pm$ 18.12  | 1/2       | 0.003    | 0.53 $\pm$ 0.26  | 0.05 $\pm$ 0.02   |
|                         | 13767.02 $\pm$ 13.77  | 3         | 0.012    | 2.12 $\pm$ 0.36  | 2.94 $\pm$ 0.95   |
|                         | 16981.16 $\pm$ 9.39   | 3         | 0.001    | 0.22 $\pm$ 0.06  | 0.48 $\pm$ 0.08   |
|                         | 21407.61 $\pm$ 62.016 | 3         | 0.001    | 0.36 $\pm$ 0.06  | 0.17 $\pm$ 0.04   |
|                         | 22012.00 $\pm$ 83.38  | 3         | 0.001    | 0.82 $\pm$ 0.17  | 0.24 $\pm$ 0.02   |
|                         | 25802.22 $\pm$ 60.33  | 3         | 0.001    | 0.49 $\pm$ 0.10  | 0.08 $\pm$ 0.02   |
|                         | 5129.99 $\pm$ 8.99    | 4         | 0.001    | 2.34 $\pm$ 0.58  | 0.58 $\pm$ 0.21   |
|                         | 16551.98 $\pm$ 9.24   | 4         | 0.001    | 0.89 $\pm$ 0.14  | 0.11 $\pm$ 0.04   |
|                         | 22273.14 $\pm$ 85.15  | 4         | 0.001    | 1.04 $\pm$ 0.16  | 0.19 $\pm$ 0.03   |
|                         | 25930.59 $\pm$ 30.91  | 4         | 0.001    | 0.29 $\pm$ 0.03  | 0.11 $\pm$ 0.04   |
|                         | 5156.17 $\pm$ 8.77    | 5/6       | 0.001    | 2.33 $\pm$ 0.76  | 1.26 $\pm$ 0.24   |
|                         | 8725.11 $\pm$ 0.86    | 5/6       | 0.001    | 4.35 $\pm$ 1.65  | 17.57 $\pm$ 7.76  |
|                         | 8743.19 $\pm$ 2.12    | 5/6       | 0.001    | 3.11 $\pm$ 1.00  | 12.94 $\pm$ 4.91  |
|                         | 9350.90 $\pm$ 9.75    | 5/6       | 0.001    | 3.22 $\pm$ 0.43  | 0.32 $\pm$ 0.13   |
|                         | 12159.79 $\pm$ 10.19  | 5/6       | 0.002    | 0.41 $\pm$ 0.11  | 1.15 $\pm$ 0.49   |
|                         | 13987.15 $\pm$ 15.45  | 5/6       | 0.001    | 2.09 $\pm$ 0.43  | 0.45 $\pm$ 0.16   |
|                         | 18819.94 $\pm$ 52.28  | 5/6       | 0.002    | 0.52 $\pm$ 0.17  | 0.21 $\pm$ 0.09   |
|                         | 21500.59 $\pm$ 12.49  | 5/6       | 0.001    | 0.45 $\pm$ 0.14  | 0.07 $\pm$ 0.03   |
|                         | 22026.36 $\pm$ 18.04  | 5/6       | 0.001    | 0.33 $\pm$ 0.07  | 0.06 $\pm$ 0.02   |
|                         | 28030.50 $\pm$ 28.17  | 5/6       | 0.006    | 0.58 $\pm$ 0.17  | 0.28 $\pm$ 0.16   |
|                         | 28893.28 $\pm$ 67.20  | 5/6       | 0.004    | 0.39 $\pm$ 0.12  | 0.18 $\pm$ 0.08   |

|                          | m/z<br>(Ort±SS)   | Fraksiyon | p-değeri  | Yoğunluk   |   |
|--------------------------|-------------------|-----------|-----------|--|---|
|                          |                   |           |           | Darbepoetin- $\alpha$<br>almayan<br>aterosklerotik<br>grup | Darbepoetin- $\alpha$<br>alan<br>aterosklerotik<br>grup |
| CM10 Yüksek Lazer Enerji | 29849.33±64.60    | 1/2       | 0.004     | 0.78±0.38  | 1.75±0.67   |
|                          | 38760.16±46.16    | 1/2       | 0.006     | 2.30±0.82  | 0.85±0.32   |
|                          | 54192.02±1248.09  | 1/2       | 0.001     | 0.12±0.02  | 0.30±0.09   |
|                          | 33058.47±159.92   | 3         | 0.002     | 2.18±0.29  | 0.56±0.14   |
|                          | 38882.28±341.99   | 3         | 0.002     | 1.99±0.34  | 1.18±0.28   |
|                          | 49898.82±484.51   | 3         | 0.003     | 0.08±0.01  | 0.19±0.08   |
|                          | 71937.13±339.28   | 3         | 0.009     | 0.69±0.07  | 0.39±0.19   |
|                          | 77372.73±984.69   | 3         | 0.006     | 2.75±0.42  | 5.61±1.66   |
|                          | 98809.36±818.95   | 3         | 0.020     | 0.05±0.02  | 0.08±0.02   |
|                          | 105026.62±1366.39 | 3         | 0.002     | 0.03±0.01  | 0.13±0.03   |
|                          | 156094.49±1976.30 | 3         | 0.006     | 0.14±0.06  | 0.50±0.16   |
|                          | 33298.99±89.83    | 4         | 0.002     | 3.53±0.32  | 1.89±0.18   |
|                          | 38428.97±49.17    | 4         | 0.006     | 0.13±0.05  | 0.07±0.02   |
|                          | 44233.03±69.18    | 4         | 0.002     | 1.02±0.10  | 0.44±0.06   |
|                          | 49697.86±122.80   | 4         | 0.002     | 0.62±0.08  | 0.29±0.03   |
|                          | 51762.41±39.06    | 4         | 0.002     | 0.99±0.09  | 0.61±0.10   |
|                          | 65941.71±27.79    | 4         | 0.002     | 6.43±0.60  | 10.44±1.35  |
|                          | 80854.22±573.36   | 4         | 0.003     | 0.09±0.04  | 0.26±0.07   |
|                          | 88304.16±42.52    | 4         | 0.006     | 0.29±0.05  | 0.21±0.02   |
|                          | 109879.96±160.10  | 4         | 0.002     | 0.04±0.01  | 0.12±0.03   |
|                          | 116249.33±1150.44 | 4         | 0.002     | 0.06±0.01  | 0.13±0.01   |
|                          | 132101.09±127.76  | 4         | 0.002     | 1.22±0.10  | 1.88±0.10   |
|                          | 198040.34±204.79  | 4         | 0.002     | 0.19±0.02  | 0.44±0.05   |
|                          | 33189.34±45.97    | 5/6       | 0.003     | 1.06±0.19  | 0.52±0.07   |
|                          | 34007.35±15.71    | 5/6       | 0.012     | 0.44±0.07  | 0.30±0.07   |
|                          | 43122.35±346.87   | 5/6       | 0.012     | 0.78±0.22  | 0.26±0.09   |
|                          | 45201.99±551.71   | 5/6       | 0.012     | 0.43±0.04  | 0.16±0.03   |
|                          | 66119.47±53.53    | 5/6       | 0.012     | 1.64±0.24  | 2.28±0.56   |
|                          | 75411.01±380.33   | 5/6       | 0.003     | 0.14±0.03  | 0.24±0.03   |
|                          | 81848.22±614.69   | 5/6       | 0.003     | 0.05±0.01  | 0.15±0.04   |
|                          | 115303.48±619.67  | 5/6       | 0.003     | 0.02±0.00  | 0.05±0.01   |
|                          | 132519.71±415.73  | 5/6       | 0.003     | 0.23±0.03  | 0.33±0.09   |
|                          | 149615.34±1268.07 | 5/6       | 0.012     | 0.03±0.01  | 0.07±0.02   |
| 162726.05±2392.79        | 5/6               | 0.003     | 0.01±0.00 | 0.04±0.01  |   |

|                        | m/z<br>(Ort±SS) | Fraksiyon | p-değeri | Yoğunluk   |   |
|------------------------|-----------------|-----------|----------|--|---|
|                        |                 |           |          | Darbepoetin- $\alpha$<br>almayan<br>aterosklerotik<br>grup | Darbepoetin- $\alpha$<br>alan<br>aterosklerotik<br>grup |
| H50 Düşük Lazer Enerji | 15064.49±42.71  | 1/2       | 0.003    | 0.98±0.39  | 9.50±3.56   |
|                        | 15692.54±15.52  | 1/2       | 0.003    | 18.74±5.62   | 94.62±27.33   |
|                        | 15755.32±11.69  | 1/2       | 0.003    | 19.65±4.23   | 88.59±38.08   |
|                        | 15862.59±14.34  | 1/2       | 0.003    | 18.42±3.59   | 59.17±9.15  |
|                        | 15935.71±27.89  | 1/2       | 0.003    | 15.65±2.68   | 46.65±16.48   |
|                        | 14626.78±7.59   | 3         | 0.033    | 3.48±1.42  | 0.93±0.04   |
|                        | 21455.49±21.33  | 3         | 0.033    | 1.05±0.31  | 4.80±1.37   |
|                        | 8918.48±20.00   | 4         | 0.003    | 12.67±4.32   | 41.62±16.21   |
|                        | 9278.54±14.26   | 4         | 0.033    | 4.29±1.74  | 11.09±4.73  |
|                        | 14087.03±26.56  | 4         | 0.001    | 7.61±2.41  | 2.17±0.97   |
|                        | 21556.38±92.49  | 4         | 0.001    | 1.68±0.62  | 0.59±0.14   |
|                        | 22440.50±240.04 | 4         | 0.003    | 1.11±0.22  | 0.58±0.16   |
|                        | 25981.01±82.49  | 4         | 0.006    | 1.62±0.59  | 0.86±0.24   |
|                        | 28871.28±75.36  | 4         | 0.045    | 1.75±0.48  | 1.27±0.36   |
|                        | 5018.93±1.26    | 5/6       | 0.001    | 2.09±0.96  | 26.17±12.42   |
|                        | 6025.74±3.28    | 5/6       | 0.001    | 2.46±1.06  | 12.25±5.67  |
|                        | 7015.95±7.82    | 5/6       | 0.001    | 15.83±2.64   | 6.17±2.83   |
|                        | 8360.91±24.6    | 5/6       | 0.001    | 6.23±2.31  | 16.88±8.06  |
|                        | 8852.71±20.02   | 5/6       | 0.009    | 43.18±9.36   | 76.24±29.41   |
|                        | 8929.46±5.48    | 5/6       | 0.009    | 18.68±5.72   | 33.52±13.16   |
|                        | 9352.49±28.87   | 5/6       | 0.001    | 28.92±4.88   | 5.03±1.95   |
|                        | 9649.55±5.39    | 5/6       | 0.001    | 14.90±2.03   | 1.44±0.36   |
|                        | 9928.53±13.02   | 5/6       | 0.034    | 6.41±1.59  | 4.62±2.05   |
|                        | 13975.53±5.88   | 5/6       | 0.001    | 4.91±0.91  | 2.30±1.02   |
|                        | 14053.49±16.62  | 5/6       | 0.001    | 16.88±4.28   | 1.09±0.47   |
|                        | 14481.21±14.90  | 5/6       | 0.001    | 10.96±2.34   | 0.60±0.22   |
|                        | 14986.46±110.88 | 5/6       | 0.001    | 5.76±2.46  | 0.47±0.17   |
|                        | 15732.14±17.95  | 5/6       | 0.001    | 3.05±0.74  | 1.47±0.68   |
|                        | 15845.78±45.02  | 5/6       | 0.001    | 3.45±1.52  | 1.01±0.47   |
|                        | 21556.34±66.83  | 5/6       | 0.001    | 1.46±0.43  | 0.15±0.05   |
|                        | 28169.71±17.11  | 5/6       | 0.001    | 4.23±1.03  | 1.32±0.51   |

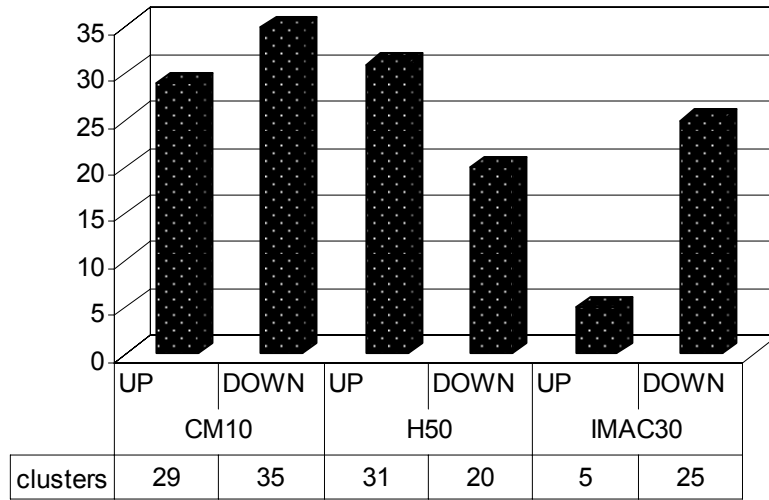


|                         | m/z<br>(Ort±SS)   | Fraksiyon | p-değeri | Yoğunluk   |   |
|-------------------------|-------------------|-----------|----------|--|---|
|                         |                   |           |          | Darbepoetin-α<br>almayan<br>aterosklerotik<br>grup | Darbepoetin-α<br>alan<br>aterosklerotik<br>grup |
| H50 Yüksek Lazer Enerji | 92021.45±1016.31  | 1/2       | 0.002    | 0.02±0.00  | 0.06±0.02                                       |
|                         | 43716.60±62.70    | 3         | 0.008    | 1.92±0.52  | 0.66±0.19                                       |
|                         | 51857.56±76.71    | 3         | 0.023    | 0.31±0.14  | 0.12±0.03                                       |
|                         | 66398.97±269.26   | 3         | 0.008    | 1.25±0.29  | 3.28±0.61                                       |
|                         | 106226.50±1887.33 | 3         | 0.008    | 0.03±0.00  | 0.06±0.01                                       |
|                         | 135723.69±1252.35 | 3         | 0.023    | 0.05±0.02  | 0.13±0.05                                       |
|                         | 152507.02±2374.62 | 3         | 0.023    | 0.02±0.00  | 0.03±0.00                                       |
|                         | 190266.58±4130.12 | 3         | 0.008    | 0.01±0.00  | 0.03±0.01                                       |
|                         | 51819.95±106.85   | 4         | 0.006    | 2.44±0.63  | 5.35±0.76                                       |
|                         | 60494.80±316.42   | 4         | 0.006    | 0.12±0.05  | 0.54±0.15                                       |
|                         | 66378.68±315.48   | 4         | 0.006    | 1.36±0.14  | 4.81±0.79                                       |
|                         | 74642.69±341.13   | 4         | 0.006    | 0.14±0.01  | 0.57±0.14                                       |
|                         | 82172.69±584.70   | 4         | 0.006    | 0.09±0.03  | 0.28±0.06                                       |
|                         | 94380.44±221.93   | 4         | 0.006    | 0.03±0.01  | 0.08±0.03                                       |
|                         | 117863.77±581.16  | 4         | 0.006    | 0.04±0.01  | 0.11±0.04                                       |
|                         | 133403.37±1521.37 | 4         | 0.006    | 0.17±0.03  | 0.42±0.10                                       |
|                         | 197517.34±2371.93 | 4         | 0.006    | 0.01±0.00  | 0.04±0.01                                       |
|                         | 51852.21±281.28   | 5/6       | 0.001    | 0.06±0.03  | 0.19±0.04                                       |
|                         | 89129.07±1029.62  | 5/6       | 0.020    | 0.03±0.00  | 0.04±0.01                                       |
|                         | 177556.44±3569.38 | 5/6       | 0.015    | 0.01±0.00  | 0.02±0.01                                       |

|                    | m/z<br>(Ort±SS) | Fraksiyon | p-değeri | Yoğunluk   |  |
|--------------------|-----------------|-----------|----------|--|--|
|                    |                 |           |          | Darbepoetin-α<br>almayan<br>aterosklerotik<br>grup | Darbepoetin-α<br>alan aterosklerotik<br>grup |
| IMAC30 Düşük Lazer | 21094.72±36.67  | 5/6       | 0.001    | 1.16±0.36  | 0.43±0.15                                    |
|                    | 21550.59±31.94  | 5/6       | 0.001    | 4.71±1.04  | 0.23±0.10                                    |
|                    | 22000.55±33.88  | 5/6       | 0.001    | 4.50±0.56  | 0.42±0.13                                    |
|                    | 27915.29±31.80  | 5/6       | 0.001    | 8.06±1.66  | 2.88±1.25                                    |
|                    | 28818.55±22.41  | 5/6       | 0.001    | 4.69±0.99  | 1.52±0.57                                    |

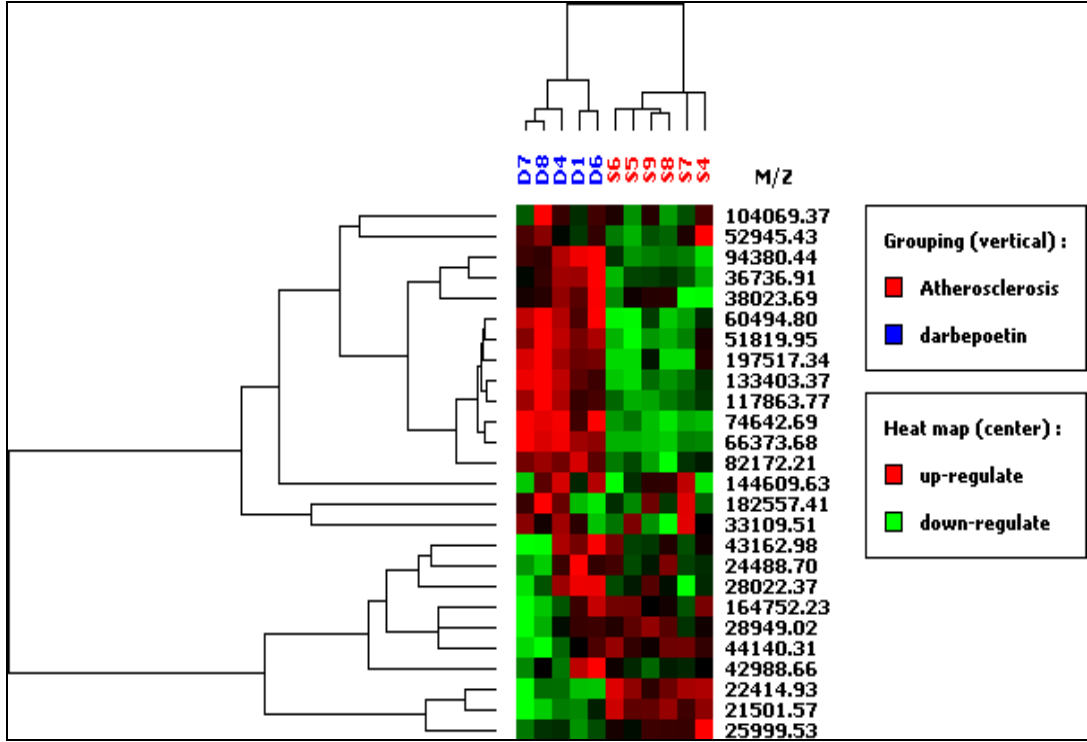
|                            |                   |           |           | Yoğunluk   |  |
|----------------------------|-------------------|-----------|-----------|--|--|
|                            | m/z<br>(Ort±SS)   | Fraksiyon | p-değeri  | Darbepoetin-α<br>almayan<br>aterosklerotik<br>grup | Darbepoetin-α<br>alan aterosklerotik<br>grup |
| IMAC30 Yüksek Lazer Enerji | 33126.69±11.18    | 4         | 0.001     | 5.76±0.49  | 2.83±0.53                                    |
|                            | 41222.42±939.92   | 4         | 0.001     | 0.27±0.10  | 0.78±0.13                                    |
|                            | 44165.76±180.88   | 4         | 0.001     | 1.27±0.15  | 0.71±0.15                                    |
|                            | 47728.80±446.79   | 4         | 0.001     | 0.81±0.16  | 0.28±0.05                                    |
|                            | 66060.59±136.10   | 4         | 0.015     | 11.64±0.82   | 17.91±4.50                                   |
|                            | 81444.08±242.64   | 4         | 0.008     | 0.45±0.14  | 1.09±0.44                                    |
|                            | 88597.77±187.27   | 4         | 0.027     | 0.21±0.07  | 0.12±0.05                                    |
|                            | 98954.84±60.36    | 4         | 0.008     | 0.61±0.14  | 0.36±0.10                                    |
|                            | 109258.25±688.12  | 4         | 0.001     | 0.05±0.01  | 0.21±0.03                                    |
|                            | 115119.84±565.38  | 4         | 0.002     | 0.06±0.02  | 0.13±0.02                                    |
|                            | 164711.07±919.77  | 4         | 0.005     | 0.03±0.01  | 0.05±0.02                                    |
|                            | 177546.23±2002.33 | 4         | 0.001     | 0.01±0.00  | 0.05±0.01                                    |
|                            | 33192.75±30.48    | 5/6       | 0.002     | 2.38±0.36  | 1.12±0.27                                    |
|                            | 43220.10±104.34   | 5/6       | 0.002     | 1.05±0.26  | 0.36±0.05                                    |
|                            | 45161.38±279.29   | 5/6       | 0.002     | 0.76±0.05  | 0.34±0.06                                    |
|                            | 49730.15±186.56   | 5/6       | 0.004     | 0.28±0.07  | 0.18±0.03                                    |
|                            | 66152.79±228.74   | 5/6       | 0.035     | 3.88±0.41  | 6.13±1.61                                    |
|                            | 66792.12±43.04    | 5/6       | 0.006     | 3.06±0.55  | 4.78±1.13                                    |
|                            | 81807.60±369.31   | 5/6       | 0.002     | 0.12±0.03  | 0.38±0.07                                    |
|                            | 112186.95±895.56  | 5/6       | 0.002     | 0.02±0.01  | 0.06±0.02                                    |
| 116031.98±518.78           | 5/6               | 0.002     | 0.02±0.00 | 0.06±0.01  |  |
| 131167.74±1293.45          | 5/6               | 0.035     | 0.55±0.09 | 0.86±0.25  |  |
| 147772.31±1436.37          | 5/6               | 0.002     | 0.06±0.01 | 0.14±0.02  |  |
| 162535.33±1116.16          | 5/6               | 0.002     | 0.01±0.00 | 0.02±0.00  |  |
| 177887.93±1269.09          | 5/6               | 0.002     | 0.01±0.00 | 0.02±0.00  |  |

Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ateroskleroz grubunda, darbepoetin- $\alpha$  tedavisi almayan ateroskleroz grubuna göre sinyal yoğunluğu belirgin olarak yüksek (up) ya da düşük (down) protein/peptidlerin sayısı farklı chiplere göre Şekil 4.4.9'te gösterilmektedir. Yapılan analiz ve istatistiksel değerlendirmelere göre yüksek ve düşük sinyal yoğunluğu gösteren piklerin sayısı en fazla CM10 (64), en az pik sayısı da IMAC30 (30) chipinde bulundu. Ön çalışmalarımıza göre yapılan değerlendirmeler sonucunda IMAC 30 chipinde fraksiyon 1/2 ve fraksiyon 3'te çok az sayıda pik elde edildiğinden, IMAC 30 chipinde sadece fraksiyon 4 ve fraksiyon 5/6 verilerinde değerlendirme yapılmıştır.



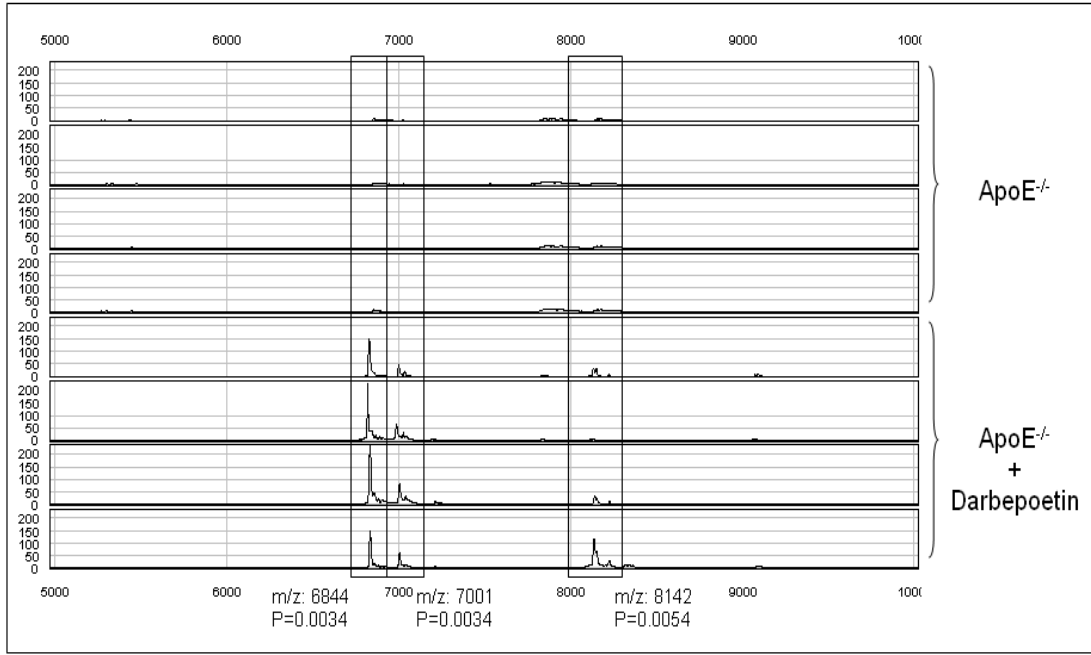
**Şekil 4.4.9.** Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan ateroskleroz gruplarında sinyal yoğunluğu istatistiksel olarak anlamlı peptid/proteinlerin farklı chiplerdeki sayısı. Yüksek (Up) ya da düşük (down) olarak eksprese edilen pik gruplarının toplam sayısı gösterilmiştir.

Tablo 4.4.2'de yer alan Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan ateroskleroz gruplarında istatistiksel olarak anlamlı 145 peptid/protein piklerinden bazıları aşağıda farklı şekillerde de gösterildi. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan ateroskleroz gruplarından elde edilen 4. fraksiyonun H50 chipinde yüksek lazer enerjisi ile okunmasından elde edilen pik yoğunlukları Şekil 4.4.10'da ısı haritası olarak gösterilmektedir.

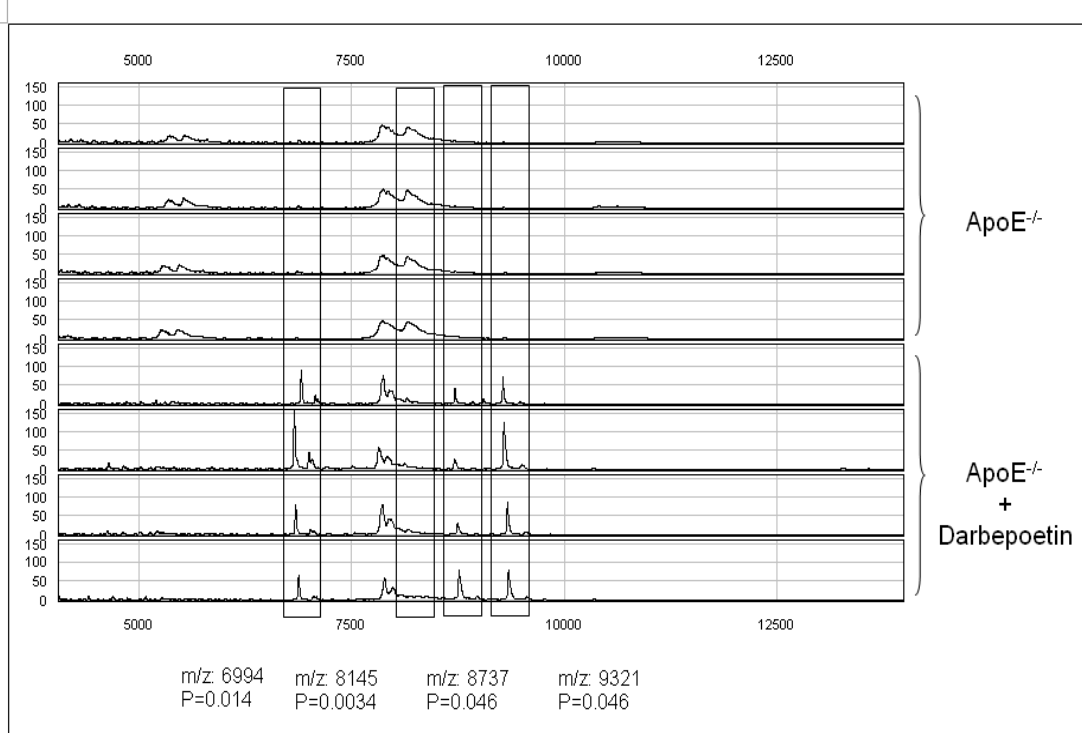


**Şekil 4.4.10.** Fraksiyon 4'den elde edilen örneklerin protein yoğunluklarının H50 chipinde yüksek lazer enerjisi kullanılarak elde edilen ısı haritası. Harita içerisindeki kırmızı bölgeler sinyal yoğunluğu yüksek (upregüle), yeşil bölgeler sinyal yoğunluğu düşük (downregüle) protein/peptidleri göstermektedir. Gruplar mavi (darbepoetin- $\alpha$  tedavisi almayan ateroskleroz grubu) ve kırmızı (darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ateroskleroz grubu) ile haritanın üst kısmında gösterilmiştir. Isı haritasının sağ tarafındaki sayısal değerler bu chipte elde edilen istatistiksel olarak anlamlı protein/peptidlerin kütle/iyon oranı (m/z, dalton) değerlerini göstermektedir.

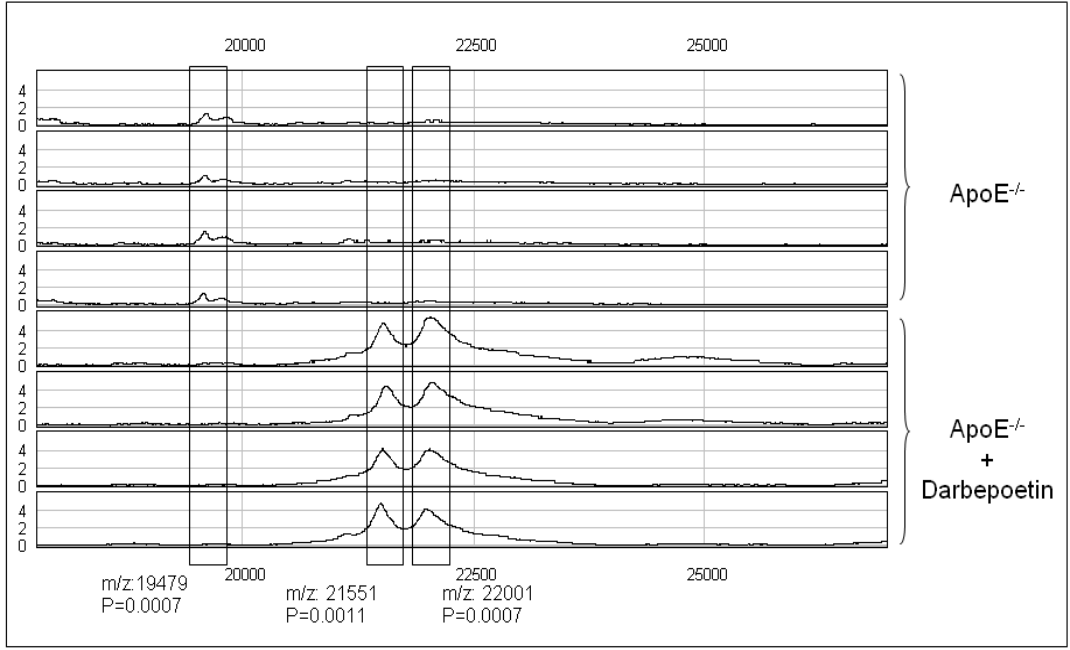
Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan ateroskleroz gruplarında istatistiksel olarak farklı olan bazı peptid/proteinlerin pik görüntüsü Şekil 4.4.11, Şekil 4.4.12 ve Şekil 4.4.13'de verilmektedir.



**Şekil 4.4.11.** CM10 chipinde Fraksiyon 1/2'den elde edilen, Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplarda farklı sinyal yoğunluğu gösteren 6844, 7001, 8142 dalton m/z değerlerine sahip bazı proteinlerin pik görüntüsü. Bu proteinlerin yoğunluğu, darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ateroskleroz grubunda darbepoetin- $\alpha$  tedavisi almayan ateroskleroz grubuna göre yüksekti (upregüle).

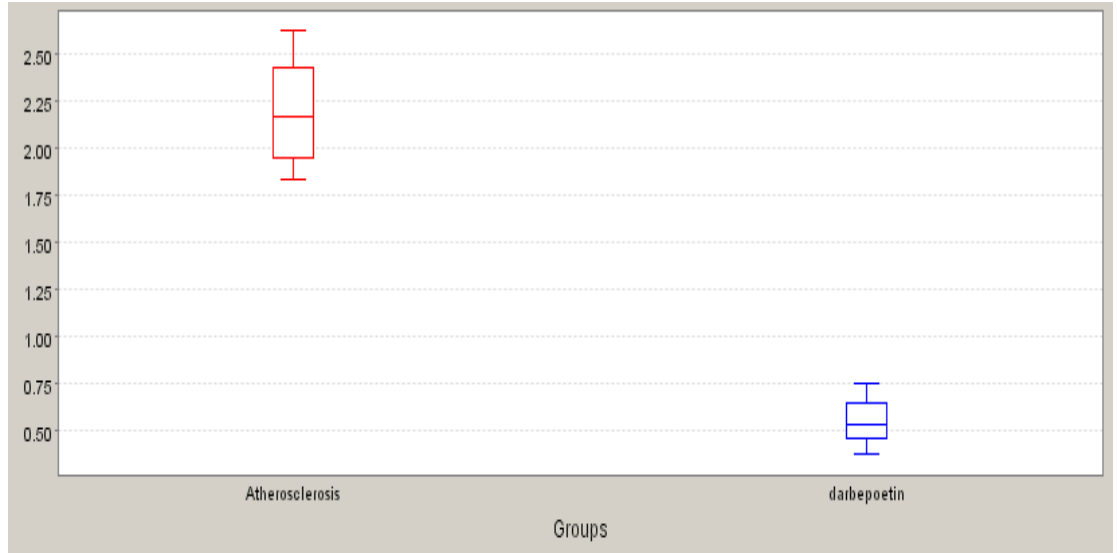


**Şekil 4.4.12.** H50 chipinde Fraksiyon 1/2'den elde edilen, Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplarda farklı sinyal yoğunluğu gösteren 6994, 8145, 8737, 9321 dalton m/z değerlerine sahip bazı proteinlerin pik görüntüsü.

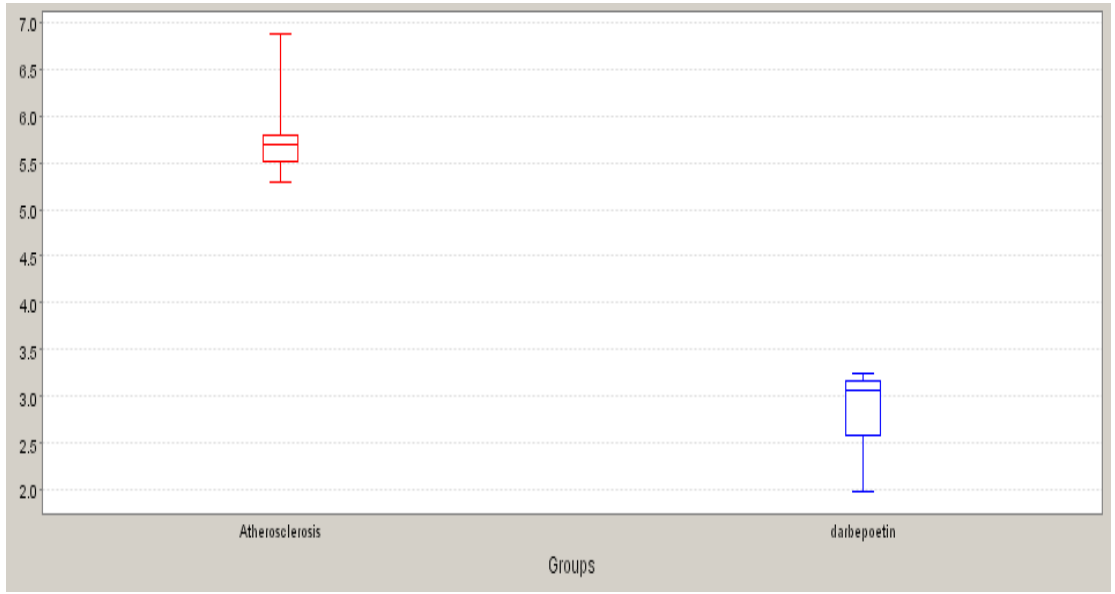


**Şekil 4.4.13.** IMAC30 chipinde Fraksiyon 5/6'den elde edilen, Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplarda farklı sinyal yoğunluğu gösteren 19479, 21551, 22001 dalton m/z değerlerine sahip bazı proteinlerin pik görüntüsü.

Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan aterosklerotik gruplarda istatistiksel olarak farklı olan bazı peptid/proteinlerin kümeleme görüntüsü Şekil 4.4.14 ve Şekil 4.4.15'da verilmektedir.



**Şekil 4.4.14.** CM10 chipinde Fraksiyon 3'den elde edilen, Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan ateroskleroz gruplarında farklı sinyal yoğunluğu gösteren 33058 dalton m/z değerine sahip bir proteinin kümeleme görüntüsü. Bu proteinin yoğunluğu darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ateroskleroz grubunda darbepoetin- $\alpha$  tedavisi almayan ateroskleroz grubuna göre düştü (downregüle).



**Şekil 4.4.15.** IMAC30 chipinde Fraksiyon 4'den elde edilen, Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan ateroskleroz gruplarında farklı sinyal yoğunluğu gösteren 33127 dalton m/z değerine sahip bir proteinin kümeleme görüntüsü. Bu proteinin yoğunluğu, darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ateroskleroz grubunda darbepoetin- $\alpha$  tedavisi almayan ateroskleroz grubuna göre düşüktü (downregüle).

## TARTIŞMA

Ateroskleroz ve aterosklerozla ilişkili koroner arter hastalığı, inme, üremi gibi komplikasyonlar halen tüm dünyada hastalığa bağlı hasarların ve ölümün başta gelen nedenleri arasında yer alır ve endüstrileşmiş dünyanın önde gelen sağlık sorunlarından biridir. Kronik kalp yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği gibi hastalıklara eşlik eden aneminin tedavisinde, eritropoietin ve türevi ilaçlar kullanılmaktadır. Yaptığımız literatür taraması sonucunda eritropoietin ile kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişkilerin incelendiği çalışma sonuçlarının tutarsız olduğu görülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda birinci basamak olarak, eritropoietin türevi olan darbepoetin'in aterosklerozla ilişkili inflamasyon, endotelial disfonksiyon ve oksidatif stres üzerine etkileri, ApoE<sup>-/-</sup> fare modeli kullanılarak incelenmiştir.

Ateroskleroz gelişimi ve ilerlemesinde patojenik basamakların ve sebeplerinin araştırılmasında, hayvan çalışmaları öne çıkmaktadır. İnsan aterosklerotik lezyonlarının incelenmesinde, insanlarda gelişen lezyonlara çok benzer lezyonlar geliştiren ve hücre tipleri açısından benzerlik gösteren ApoE<sup>-/-</sup> fareler son yıllarda en çok kullanılan hayvan modelidir. [18, 49, 70].

Standart diyetle spontan ateroskleroz geliştirebilen tek fare modeli olan ApoE<sup>-/-</sup> fareler dünyada yaygın olarak kullanılmakla birlikte, Türkiye'de yapılan çalışmalar arasında bu modelle yapılmış ateroskleroz çalışmasına rastlanmamıştır ve bu sebepten dolayı yaptığımız çalışma ülkemizde şu ana kadar yapılan ilk çalışmadır.

Çalışmamızda, yurtdışından ithal ettiğimiz ApoE<sup>-/-</sup> farelerde yüksek kolesterol ve trigliserid düzeyleri ile aterosklerozun zamana bağlı gelişimi ve ilerlemesi histolojik olarak gösterildi. Hiperkolesterolemi gelişen 8 haftalık ApoE<sup>-/-</sup> farede, damarın enine kesitinin ışık mikroskobu ile incelenmesi sonucu, belirgin intima media kalınlaşması belirlenemedi. 12 haftalık iken feda edilen bir ApoE<sup>-/-</sup> farede, intima media kalınlaşması belirgin olarak gösterildi. 20 haftalık bir farede lezyon gelişimi lipid çekirdek ve fibröz kapsül oluşumu ile ateroskleroz oluşumu gösterildi. Çalışmaya dahil edilen ApoE<sup>-/-</sup> farelerin ateroskleroz gelişim periodları literatürle uyumludur [18].

Jawien et al., 5-6 haftalık ApoE<sup>-/-</sup> farelerde, monositlerin endotele adezyonlarının ve benzer yaş döneminde transendotelial monosit göçünün, elektron mikroskopisi ile gösterilebildiğini ve 6-10. haftalarda köpük hücre oluşumu ile karakterize yağlı çizgilenmelerin gelişebileceğini belirtmiştir [18].



Çalışmamızda, standart fare yemi ile beslenen tüm ApoE<sup>-/-</sup> fareler ile sağlıklı C57BL/6J farelerin vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık bulunmadı. Bu bulgumuz Jawien et al.'ın bulguları ile uyumludur [18]. Ayrıca ApoE<sup>-/-</sup> fareler C57BL/6J farelerle karşılaştırıldığında, genel görünüm, aktivite ve davranışlarında da göze çarpan bir farklılık saptanmadı.

Çalışmamızda, ApoE<sup>-/-</sup> farelerde ve sağlıklı C57BL/6J farelerde, total kolesterol ve trigliserid düzeyleri ölçüldü. Kolesterol düzeyleri erken aterosklerotik dönemde kontrol grubuna kıyasla 5-6 kat artarken, ilerleyen aterosklerozla birlikte aradaki fark 7 kat arttığı saptandı. Trigliserid düzeylerinin ise, erken aterosklerotik grupta kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 2 kat arttığı gözlemlendi. İki grup arasındaki fark, ileri aterosklerotik gruplarda daha da yükselmiş olarak bulundu.

Zadelaar et al., ApoE<sup>-/-</sup> farelerde kolesterol düzeylerinin C57BL/6J farelere göre 4 kat arttığını ve bunun ApoE proteinin olmaması ile alakalı olduğunu vurgulamıştır [70]. Jawien et al. ise sağlıklı kontrol fareler ile ApoE<sup>-/-</sup> fareler arasında kolesterol düzeylerinde 5 katlık artış olduğunu ve bu artışın yaş ya da cinsiyetten etkilenmediğini belirtmiştir. Yine aynı çalışmada trigliserid düzeylerinin %68 arttığı belirtilmiştir [18]. Trigliserid ve kolesterol düzeylerini içeren bulgularımız, literatürle benzerlik göstermektedir.

Yaptığımız bu çalışmada, aterosklerotik ve sağlıklı farelerde, eritropoietin türevi olan darbepoetin- $\alpha$ 'nın erken ve ilerlemiş ateroskleroz üzerine etkileri incelendi. Literatürde eritropoietinin ve darbepoetin- $\alpha$ 'nın ApoE<sup>-/-</sup> farelerde lipid profiline olan etkilerini inceleyen bir yayın bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız, insanlarda eritropoietinin lipid profili üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalarla karşılaştırıldı.

Eritropoiezi stimüle eden bir protein olan eritropoietinin lipid profiline olan etkileri, en fazla aneminin çok görüldüğü son dönem böbrek yetmezlikli, özellikle de hemodiyaliz tedavisi alan hastalarda incelenmiştir. Kronik böbrek yetmezliğinde, kardiyovasküler hastalıkla ilişkili morbidite ve mortalite riski çok yüksek olduğundan, bu alanda eritropoietinin etkilerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça fazladır. Literatürde eritropoietinin kardiyovasküler hastalık insidansına etkilerinin incelendiği yayınlarda, çok çelişkili sonuçlar bulunmaktadır.

Yaptığımız bu çalışmada, uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin total kolesterol üzerine etkisinin sonuçları, Allegra et al., ile Prata et al.'ın sonuçları ile uyumludur. Hem erken hem de ilerlemiş ateroskleroz dönemlerinde darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin, kolesterol düzeylerini değiştirmedeği gözlemlendi. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin erken ateroskleroz periodunda trigliserid sonuçlarında artışa sebep olduğu, ancak ileri ateroskleroz döneminde trigliserid düzeyleri üzerine etkisinin olmadığı saptandı. Allegra et al. çalışmalarında trigliserid düzeylerindeki artışın fazla kalori alınımı ile alakalı olabileceğini vurgulamışlardır, fakat bizim çalışmamızda tüm fareler aynı yem ile beslendiğinden, bu artışın diyetdeki kalori artışı ile alakalı olmadığını düşünmekteyiz. Özetle, darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin ateroskleroz oluşumunda önemli risk faktörlerinden biri olan hiperkolesterolemiye olumlu ya da

olumsuz bir etkisi yoktur denebilir. Bu sonuçlarımız, Kes et al.'un insanlarda yaptığı araştırma sonuçları ile çelişmektedir.

Kes et al., rekombinant insan eritropoietin (rHuEpo)'in insan lipid profiline etkisini araştırdıkları klinik bir çalışmada, lipid profilini oluşturan total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserid düzeylerini değerlendirmişlerdir. Uzun dönem eritropoietin tedavisinin, total kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı azalışa ve HDL-kolesterol düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğunu bulmuşlardır. Araştırmacılar, bu bulgularına göre, uzun dönem rHuEpo tedavisinin lipid profilinde iyileşmeye sebep olduğunu öne sürmüşler ve rHuEpo tedavisinin kardiyovasküler hastalık insidansını azaltabileceğini vurgulamışlardır [101].

Allegra et al., uzun dönem eritropoietin tedavisinin hemodiyaliz hastalarında kan lipid profiline etkilerini incelemiştir. Yaptıkları bu çalışmada, 33 hemodiyaliz hastasına diyaliz seansının sonunda, haftada 3 kere eritropoietin enjekte edilmiştir. Eritropoietin tedavisi almayan 17 hemodiyaliz hastası, kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm hastalar, diyetsel faktörleri araştırmak için enerji alımı fazla ve normal olan iki gruba ayrılmıştır. Bir yıl süren tedavi boyunca total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol ve trigliserid düzeyleri 2 aylık periodlarla ölçülmüştür. Sonuçta araştırmacılar, total kolesterol düzeylerinin çalışma süresince değişmediğini, trigliserid düzeylerinin ise 4. ayda artmaya başladığını bulmuşlardır. Trigliseriddeki artışın diyetdeki kalori miktarıyla ilişkili olabileceğini söylemişlerdir [102]

Prata et al., hemodiyaliz hastalarında uzun dönem rHuEpo tedavisinin, kan lipid profili üzerine olan etkilerini incelemiştir. 102 hemodiyaliz hastasına 2 yıl boyunca iv. rHuEpo tedavisi uygulanmıştır. rHuEpo tedavisi almayan 20 hemodiyaliz hastası kontrol grubunu oluşturmuştur. Çalışmada, total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserid, Apo A1, Apo B ve Lp(a) düzeyleri tedaviye başlanmadan, tedavinin ilk yılında ve ikinci yılın sonunda ölçülmüştür. Tüm gruplarda Apo A1 düzeyleri artarken, diğer lipid parametrelerinde bir değişiklik olmamıştır. Sonuçta uzun dönem rHuEpo tedavisinin, total kolesterol, LDL-kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserid, Apo B ve Lp(a) düzeylerine etki etmediğini bulmuşlardır [103].

Çalışmamızda, oksidatif statüyü belirlemek için protein karbonil grupları ve 8-isoprostan düzeyleri ölçüldü. Sonuçlarımıza göre, kontrol grubundaki C57BL/6 farelere kıyasla, aterosklerotik gruptaki ApoE<sup>-/-</sup> farelerde protein karbonil grupları ve 8-isoprostan düzeyleri daha yüksek olduğu bulundu. Bulgularımız literatürdeki ateroskleroz gelişiminde artmış oksidatif stresin rolünün vurgulandığı çalışmalar ile örtüşmektedir [3, 35, 40, 50, 104]

Çalışmamızda, uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin tüm aterosklerotik grupların karbonil düzeylerinde azalmaya sebep olduğu gösterildi. Erken aterosklerotik dönemdeki %30'luk azalma, istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bunun yanında, ileri aterosklerotik dönemde azalma (%45) istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin 8- isoprostan düzeyleri üzerine etkisinin karbonil gruplarındaki etkiye benzer olduğu gözlemlendi. Uzun

dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin tüm aterosklerotik grupların 8- isoprostan düzeylerinde azalmaya sebep olduğu gösterildi. Erken aterosklerotik dönemdeki %44'lük azalma ve ileri aterosklerotik dönemdeki %16'luk azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sonuçta, uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin oksidatif stres parametrelerinde iyileşmeye sebep olduğu gösterildi. Oksidatif stresteki iyileşmenin aterosklerozla ilişkili inflamasyon ve endotel disfonksiyonu etkileyebileceği düşüncesindeyiz. Bu bulgularımız, Monostori ve Parissis'in araştırma sonuçları ile uyumludur.

Monostori et al., hemodiyaliz hastalarında eritropoezi stimüle eden ajanların (ESA) oksidatif stresi etkileyebileceğini öne sürerek, hemodiyaliz hastalarına 14 günlük anemi tedavisi kesintisinin ardından, 11 gün boyunca epoetin beta ve 10 hastaya darbepoetin alfa tedavisi uygulamışlardır. Hastaların okside ve redükte glutasyon (GSSG, GSH), eritrosit malondialdehit (MDA) düzeyleri, eritrosit süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) aktiviteleri tedavi öncesinde ve tedavinin belli periodlarında ölçülmüştür. Sonuçta araştırmacılar, hemodiyaliz hastalarında kısa dönem ESA yoksunluğunun oksidatif strete artışa sebep olduğunu, darbepoetin alfa ve epoetin beta tedavisinin oksidatif stresi azalttığını vurgulamışlardır [105].

Parissis et al., iskemik ya da idiopatik dilate kardiyomiopatiye sekonder olarak gelişen kronik kalp yetmezlikli hastalarda darbepoetin oksidatif stres parametreleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. 30 kronik kalp yetmezlikli hasta iki gruba ayrılmış ve bir gruba 1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  darbepoetin diğer gruba salin subkutan olarak enjekte edilmiştir. Tüm hastalar demir desteği de almıştır. 3 aylık tedavinin başında ve sonunda, oksidatif stres markırı olarak MDA, karbonil gruplarını ve glutasyon düzeyleri ölçülmüştür. Darbepoetin tedavisinin ardından, MDA ve karbonil grupları düzeylerinin istatistiksel olarak azaldığını, glutasyon düzeylerinin arttığını vurgulamışlardır. Bu parametreler plasebo grubunda değişmemiştir. Karbonil gruplarındaki azalmanın çalışmada ölçülen diğer kardiyolojik parametrelerdeki değişimle korele olduğunu belirtmiştir. Sonuç olarak, darbepoetin tedavisinin anemik kronik kalp yetmezlikli bireylerde oksidatif stresin ve kardiyovasküler sistemle ilişkili kötü etkilerini azalttığını belirtmişlerdir [106].

Çalışmamızda, ApoE<sup>-/-</sup> farelerin inflamasyon belirteci olan IL-6 düzeylerinin, kontrol grubunu oluşturan C57BL/6 farelerin IL-6 düzeylerinden 5-6 kat yüksek olduğunu tespit ettik. Bulgularımız Sukovich et al.'ın bulguları ile örtüşmektedir.

Sukovich et al., ApoE<sup>-/-</sup> farelerin aterosklerotik lezyonlarında IL-6 ekspresyonunu incelemişlerdir. 20-24 haftalık ApoE<sup>-/-</sup> fareleri ile aterosklerotik ve C57BL/6 fareleri ile kontrol grupları oluşturularak, aortik ark bölgelerinde ve thorasik aortalarında IL-6 mRNA ekspresyonlarını araştırmışlardır. RT-PCR yöntemi ile, ApoE<sup>-/-</sup> farelerin aortik ark kısmında IL-6 mRNA'sını belirlenirken, kontrol farelerin ve yine ApoE<sup>-/-</sup> farelerin thorasik aortalarında IL-6 mRNA'sına rastlamamışlardır. Bu yaş grubunda deneye alınan farelerin thorasik aortalarında, ya ateroskleroz gelişmediğini ya da çok hafif lezyonlar görüldüğünü belirtmişlerdir. RT-PCR sonuçlarını desteklemek için, ApoE<sup>-/-</sup> farelerin izole aortlarını kullanarak organ banyolarında, IL-6 protein sekresyonunu ölçmüşlerdir. Sistemde aortun medyum ortamına saldığı IL-6 düzeyi, ELISA yöntemi ile ölçülmüştür. Deney sonucunda

ApoE<sup>-/-</sup> farelerin aortlarından yaş uyumlu kontrol farelerine kıyasla 10 kat fazla IL-6 sekresyonu olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen IL-6 protein düzeylerinin aterosklerotik lezyon alanı ile korele olduğunda gösterildiği bu çalışmada, araştırmacılar, ApoE<sup>-/-</sup> farelerin, IL-6 düzeylerinin çalışılması için iyi bir model olduğunu ve IL-6 mRNA ekspresyonunun ve protein düzeylerinin, insan aterosklerotik lezyonlarında, bu sitokinin patofizyolojik ekspresyonunu yansıttığını belirtmişlerdir [107].

Yaptığımız çalışmada, uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin IL-6 düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yaklaşık % 10-13 oranında azalttığı belirlendi. Literatürde darbepoetin ya da eritropoietin tedavisinin, IL-6 düzeyleri üzerine etkilerini gösteren ApoE<sup>-/-</sup> farelerle yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız, literatürdeki Kourea et al.'ın yaptığı çalışmada belirtilen, azalan inflamatuvar belirteç (IL-6, CRP) düzeyleri ile uyumludur.

Kourea et al., kronik kalp yetmezliği olan anemik bireylerde, darbepoetin alfa'nın plazma pro-inflamatuvar sitokinleri, anti-inflamatuvar sitokin IL-10, ve Fas/Fas ligand sistemine etkilerini incelemiştir. 41 kalp yetmezliği olan bireyler iki gruba ayrılmış ve bir gruba 1,5  $\mu$ g/kg darbepoetin, diğer gruba salin subkutan olarak enjekte edilmiştir. Tüm hastalar, demir desteği almıştır. 3 aylık tedavi sonunda, LV sistolik fonksiyonlar (LVEF), plazma B-tip natriüretik peptid (BNP), inflamatuvar belirteçler (TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP), anti-inflamatuvar sitokin IL-10, endotel adezyon molekülleri (ICAM-1 ve VCAM-1), apoptoz mediatörleri (Fas, Fas ligand) ve 6 dakikalık yürüyüş mesafesi (6DYM) ölçülmüştür. 3 aylık darbepoetin tedavisi sonunda LVEF, 6DYM, ve BNP düzeylerinde iyileşme görülmüştür. IL-6 ve Fas ligand düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş belirlenmiştir. Darbepoetin tedavisi, sICAM-1 ve CRP (belirgin azalma) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gösterilmiştir [94].

Çalışmamızda, serum CRP düzeyleri, tüm ateroskleroz gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Aterosklerozun ilerlemesine paralel olarak CRP düzeylerindeki artışında devam ettiği tespit edildi. Artan CRP düzeylerinin ateroskleroz gelişimi ve ilgili komplikasyonlarda bir risk faktörü olduğu, birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir [108-110]. Ridker ve arkadaşları, CRP'nin kardiyovasküler olaylarda LDL'den daha iyi bir belirteç olduğunu vurgulamıştır [111].

Wilund et al., ApoE<sup>-/-</sup> farelerde sinir sistemi ile ateroskleroz arasındaki bağlantıyı araştırdıkları çalışmalarında, ApoE<sup>-/-</sup> farelerde, kontrol grubu olarak kullanılan C57BL/6 farelerine göre CRP ve IL-6 düzeylerinde hafif ve istatistiksel olarak anlamlı olmayan olmayan artış belirlemişlerdir [104].

Çalışmamızda, darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin serum CRP düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmediği tespit edildi. CRP sonuçlarımız, Pawlak et al.'ın hemodiyaliz hastalarında uzun dönem eritropoietin tedavisinin etkilerini inceledikleri araştırma [112] ile uyumludur. 20 stabil hemodiyaliz hastası ve 15 sağlıklı birey ile yapılan çalışmalarında, metalloproteinazlar ve inhibitörleri, oksidatif stres (malondialdehit) ve inflamasyon (CRP) belirteçleri araştırılmıştır. 12

aylık eritropoietin tedavisi sonunda, eritropoietin tedavisinin, metalloproteinazlar, oksidatif stres ve inflamatuvar belirteçlerini etkilemediğini bulmuşlardır [112].

Histaminin inflamatuvar olaylarda rolü olduğunu belirten yapılan çalışma sayısı yetersizdir. Bu nedenle çalışmamızda darbepoetin- $\alpha$ 'nın yeni bir inflamatuvar markır olabilecek histamin düzeylerine nasıl etki ettiğini araştırdık. Aterosklerotik ApoE<sup>-/-</sup> farelerde, serum histamin düzeylerini sağlıklı C57BL/6 farelerinin histamin düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulduk. Sonuçlarımız, Huang et al. ve Clejand et al.'un yaptıkları çalışmaların bulguları ile uyumludur.

Huang et al., ApoE<sup>-/-</sup> farelerde, akut stresin, kardiyak mast hücre aktivasyonu ve histamin salınımına etkilerini araştırmışlardır. Çalışmalarında, 8-14 haftalık erkek ApoE<sup>-/-</sup> fareler ve C57BL/6 soyundan fareleri kullanmışlardır. Tüm farelerin kalp ve serum numunelerinde histamin düzeyleri radioimmünassay yöntemi ile ölçülmüştür. ApoE<sup>-/-</sup> farelerdeki serum örneklerinde stres sonucu, hem kolesterol hem de serum histamin düzeyleri artmıştır. Strese maruz bırakılmamış ApoE<sup>-/-</sup> farelerin bazal histamin düzeylerinin kontrol farelerine göre yüksek olduğu bildirilmiştir. Çalışmalarında, serum ve plazma histamin düzeylerinin farklı olmadığı da bildirilmiştir [113].

Clejan et al., kan histamin düzeylerinin ateroskleroz, inflamasyon, kardiyak olaylar ve koroner arter hastalıkları ile ilişkisini araştırmışlardır. 50 akut koroner sendromlu, 50 stabil koroner hastalığı olan 100 hastada ölçülen histamin düzeyleri, yaş ve cinsiyet uyumlu 50 sağlıklı bireyin histamin düzeyleri ile karşılaştırılmıştır. Sonuçta, akut koroner sendrom ve stabil koroner hastalığı olan hastalarda histamin düzeylerinin yüksek olduğunu belirtmişler ve sadece kan histamin düzeyinin koroner olaylar için iyi bir belirteç olabileceğini ve lipid indeksleri ile beraber değerlendirildiğinde CRP'den daha iyi tanısal bir belirteç olabileceğini vurgulamışlardır [114].

Çalışmamızda uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisi, histamin düzeylerini hafifçe azaltmakla birlikte, istatistiksel olarak anlamlı bir etki saptanamadı. Yapılan literatür taramasında, uzun dönem darbepoetin ya da eritropoietin tedavisinin histamin düzeylerine etkilerinin araştırıldığı herhangi başka bir çalışma bulunamamıştır.

Ateroskleroz gelişiminde endotel disfonksiyonu ve inflamasyonun rolü bilinmektedir. Lökositlerin endotele tutulumundan sorumlu olduğu bilinen E-Selektin, VCAM-1 ve ICAM-1'in çözünebilir formları kanda bulunur ve inflamasyon ve endotel disfonksiyonun göstergesi olarak ölçülebilir. Güray vd, stabil ya da anstabil anjinası olan ve kalp krizi geçiren hastalarda ICAM-1 ve VCAM-1'in düzeylerinin arttığını aynı hasta grubunda e-selektin düzeylerinde artış olmadığını belirtmişleridir [115].

Iiyama et al., normal ve hiperkolesterolemik tavşan ve 12 hafta boyunca yüksek yağlı diyetle beslenen LDLR<sup>-/-</sup> farelerde ve normal diyet alan 34 haftalık ApoE<sup>-/-</sup> farelerde adezyon molekül ekspresyonunu northern blot analizi kullanarak araştırmışlardır. ApoE<sup>-/-</sup> ve LDLR<sup>-/-</sup> farelerde ICAM-1 mRNA düzeylerinin 2-3 kat

arttığını, E-Selektin düzeylerinin değişmediğini ve benzer sonuçların hiperkolesterolemik tavşanlarda da izlendiğini tespit etmişlerdir [116].

Rubio-Guerra et al., endotel disfonksiyonun tip 2 diabetik hastalarda yaygın bir özellik olduğunu ve bu durumun artmış inflamasyon, artmış adezyon molekülü ve aterosklerozla ilişkili olduğunu belirtmişler ve dolaşımdaki adezyon molekül düzeyleri ile ateroskleroz arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. 30 normotansif tip 2 diabetik hastalarda ICAM-1 ve e-Selektin düzeylerini ELISA yöntemi ile ölçmüşlerdir. Elde edilen değerlerin, aynı hastalarda, karotis arterlerinden B mode ultrasonografi ile ölçülen intima media kalınlığı (IMT) ile korelasyonu araştırılmıştır. Sonuçta, artmış ICAM-1 değerlerinin IMT ile korele olduğunu, fakat e-Selektin ile IMT değerleri arasında anlamlı bir korelasyon olmadığını belirtmişler ve normotansif tip 2 diabetik hastalarda, ICAM-1 düzeylerinin aterosklerozla ilişkili bir markır olduğunu vurgulamışlardır [117]. Bunun aksine, Kourea et al., kronik kalp yetmezliği olan anemik bireylerde 3 ay süresince, 1.5 µg/kg.darbepoetin alfa tedavisinin sICAM-1 düzeylerine etki etmediğini belirtmiştir [94].

Çalışmamızda, aterosklerotik grupta (erken aterosklerotik dönemde) sağlıklı kontrol grubuna göre, e-Selektin ve sICAM-1 düzeylerinin, istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edildi. İlerlemiş aterosklerotik dönemde erken aterosklerotik döneme kıyasla e-Selektin düzeylerinde anlamlı artış saptanmadı. Diğer taraftan ilerleyen aterosklerozla birlikte sICAM-1 düzeylerinin daha da arttığı belirlendi. Sonuçta aterosklerotik lezyonlardaki ilerlemeye paralel olarak sICAM-1 düzeylerinin de artış gösterdiği tespit edildi. Bu bulgumuz, Iiyama et al. and Rubio-Guerra et al.'ın araştırmaları ile uyumludur. [116, 117]. Darbepoetin-α'nın, e-selektin ve ICAM-1 düzeyleri üzerine etkileri benzerdir. Uzun dönem darbepoetin-α tedavisi, adezyon moleküllerinin düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır. Bu bulgumuz Kourea et al.'nın çalışması ile uyumludur.

Ateroskleroz tanı ve takibinde önemli olan birçok molekül biyomarkır adayı olarak incelenmesine rağmen, biomarkır olarak kabul edilebilecek peptid/protein ya da peptidler/proteinler henüz tam olarak belirlenememiştir. Bu nedenle çalışmamızın ikinci basamağında, yeni bir teknoloji olan SELDI-TOF-MS protein biochipleri kullanarak aterosklerotik ApoE<sup>-/-</sup> fare serum örneklerinde protein profilleri belirlendi ve sağlıklı C57BL/6 farelerin protein profili ile karşılaştırıldı. ApoE<sup>-/-</sup> ve C57BL/6 farelerden elde edilen serum örnekleri ile yapılan proteomik deneyler, analizler ve istatistiksel değerlendirmeler sonucunda, ateroskleroz (ApoE<sup>-/-</sup>) ve kontrol (C57BL/6) grupları arasında farklı sinyal yoğunluğu gösteren 742 tane peptid/protein piki belirlendi. 742 peptid/protein pikinden 107'sinin sinyal yoğunluğundaki farklılık, aterosklerotik serum örneklerinde kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Belirlenen bu peptid/proteinlerden bazılarının ateroskleroz gelişimi ve ilerlemesi ile ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızdaki örnekleme sayısı bu proteinlerin validasyonunu kısıtlamaktadır. Aterosklerotik farelerden elde edilen bu protein profili, aterosklerozun tanı ve takibinde kullanılabilecek hızlı, yüksek kalitede sonuç veren klinik deneylerin geliştirilmesinde ve aterosklerotik gelişim periodunda uygulanan değişik tedavilerin etkinliğinin araştırılmasında kullanılabilir niteliktedir. Bu çalışmada darbepoetin-α tedavisinin proteomik profiline etkileri de incelendi. Darbepoetin-α verilen ve verilmeyen fare grupları arasında, 145

peptid/protein pikinin sinyal yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık tespit edildi. Tespit edilen proteinlerin bazı özellikleri (pH değerleri, molekül ağırlıkları) de çalışmalarımız sonucunda belirlendi. Bu proteinlerin bazılarının, ateroskleroz gelişimi ve ilerlemede rol alan proteinler olabileceği düşüncesindeyiz. Ateroskleroz konusunda daha önce yapılan proteomik çalışmalar arasında, ApoE<sup>-/-</sup> farelerin serum numunelerinde SELDI-TOF-MS gibi yeni bir teknoloji ile protein profil taramasının yapıldığı bir yayın bulunmamaktadır. Darbepoetin- $\alpha$ 'nın kardiyovasküler hastalıklarda protein profili üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Tabibiazar et al., aterosklerotik ApoE<sup>-/-</sup> ve sağlıklı C57BL/6 farelerin serum örneklerinde protein mikroarray yöntemi ile sadece inflamatuvar markırları çalışmışlardır [10]. Bu konudaki diğer yayınlar hücre kültürü, ya da hastalardan elde edilmiş damar ya da doku çalışmalarını içermektedir. *In vitro* hücre kültürü çalışmaları, *in vivo* durumu tam olarak yansıtmamaktadır [118]. Diğer taraftan doku biyopsisi ile elde edilen düz kas hücresi ya da endotel hücrelerin kullanılması erken tanı için çok uygun olmayan invaziv yöntemlerdir. Michielsen et al., karotis endarterektomisi ve femoral arterden elde edilen numunelerde SELDI-TOF-MS yöntemi ile aterosklerotik plak rüptürü ve plak stabilitesindeki protein değişikliklerini incelemişlerdir [119]. Ancak bu çalışmalar ilerlemiş aterosklerozdaki protein değişikliklerini göstermektedir. Hastalığın erken dönemlerinde belirteç taraması çalışmaları henüz yapılmamıştır. Bizim çalışmamız ise ateroskleroz gelişiminin erken evrelerinde meydana gelen protein farklılıklarını ortaya koymaktadır.

## SONUÇLAR

Bulduğumuz deneysel verilere göre sonuçlarımızı şu şekilde özetleyebiliriz.

1. Yüksek serum kolesterol ve trigliserid düzeyleri ile ApoE<sup>-/-</sup> farelerde hiperkolesterolemi gösterildi.
2. Aortun histolojik incelenmesi ile ApoE<sup>-/-</sup> farelerde ateroskleroz gelişimi ve ilerlemesi gösterildi.
3. ApoE<sup>-/-</sup> farelerde yüksek protein karbonil grupları ve 8-isoprostan düzeyleri ile oksidatif stresteki artış belirlendi.
4. ApoE<sup>-/-</sup> farelerde uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin oksidatif stres düzeylerinde iyileşmeye sebep olduğu gösterildi.
5. ApoE<sup>-/-</sup> farelerde IL-6, CRP ve histamin düzeylerindeki artış ile aterosklerozla inflamasyon arasındaki ilişki vurgulandı.
6. ApoE<sup>-/-</sup> farelerde, uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin ölçülen inflamasyon beliteçlerine anlamlı etki etmediği belirlendi.
7. ApoE<sup>-/-</sup> farelerde ICAM-1 ve e-selektin düzeyleri ile belirlenen endotel disfonksiyonun aterosklerozun erken evrelerinde başladığı ve aterosklerozdaki ilerlemeye paralel olarak arttığı saptandı.
8. ApoE<sup>-/-</sup> farelerde, uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisinin ölçülen endotel disfonksiyon beliteçlerine anlamlı etki etmediği belirlendi.
9. SELDI-TOF-MS yöntemi ile yapılan proteomik çalışmaları sonucunda aterosklerotik ApoE<sup>-/-</sup> fareler ile sağlıklı C57BL/6 fareler arasında 107 peptid/proteinlerde farklı ekspresyon düzeyleri belirlendi.
10. Darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan aterosklerotik ApoE<sup>-/-</sup> fareler arasındaki serum protein değişiklikleri SELDI-TOF-MS yöntemi ile belirlendi.
11. SELDI-TOF-MS yöntemi ile yapılan proteomik çalışmaları sonucunda darbepoetin- $\alpha$  tedavisi alan ve almayan aterosklerotik ApoE<sup>-/-</sup> fareler arasında 145 peptid/proteinde anlamlı farklılık belirlendi.



Sonuç olarak, aterosklerotik süreçte uzun dönem darbepoetin- $\alpha$  tedavisi oksidatif hasarı istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaltırken lipid profili, endotel disfonksiyon ve inflamasyon belirteçlerine anlamlı etki etmediği belirlendi. Bu değişikliklerin açık ve kesin olarak ortaya konulması, ateroskleroz ve aterosklerozla ilişkili komplikasyonların önlenmesinde ve bu amaçla oluşturulacak stratejilerin belirlenmesinde temel oluşturacaktır. Ayrıca, aterosklerotik süreçte değişiklik gösterdiği belirlenen protein paternlerinin tanımlanması biyomarkır keşfine ışık tutacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Fach EM, Garulacan LA, Gao J, Xiao Q, Storm SM, Dubaquié YP, Hefta SA, Opitck GJ, In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 2004. 3(12): 1200-1210.
2. Oh J, Wunsch R, Turzer M, Bahner M, Raggi P, Querfeld U, Mehls O, Schaefer F, Advanced coronary and carotid arteriopathy in young adults with childhood-onset chronic renal failure. *Circulation*, 2002. 106(1): 100-105.
3. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C, The role of oxidative stress in atherosclerosis. *Hellenic J Cardiol*, 2009. 50(5): 402-409.
4. Mullenix PS, Andersen CA, Starnes BW, Atherosclerosis as inflammation. *Ann Vasc Surg*, 2005. 19(1): 130-138.
5. Aguilera A, Selgas R, Effect of recombinant human erythropoietin on inflammatory status in dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*, 2004. 19 Suppl 5: V46-53.
6. Desai A, Zhao Y, Lankford HA, Warren JS, Nitric oxide suppresses EPO-induced monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells: implications for atherogenesis in chronic renal disease. *Lab Invest*, 2006. 86(4): 369-379.
7. Sekiguchi N, Inoguchi T, Kobayashi K, Sonoda N, Nawata H, Erythropoietin attenuated high glucose-induced apoptosis in cultured human aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. 334(1): 218-222.
8. Dejanova B, Filipce V, Dejanov P, Sikole A, Grozdanovski R, Maleska V, Atherosclerosis risk factors related to hemodialysis duration and erythropoietin therapy. *Clin Chem Lab Med*, 2001. 39(6): 484-486.
9. Bahlmann FH, Song R, Boehm SM, Mengel M, von Wasielewski R, Lindschau C, Kirsch T, de Groot K, Laudeley R, Niemczyk E, Guler F, Menne J, Haller H, Fliser D, Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure. *Circulation*, 2004. 110(8): 1006-1012.

10. Tabibiazar R, Wagner RA, Deng A, Tsao PS, Quertermous T, Proteomic profiles of serum inflammatory markers accurately predict atherosclerosis in mice. *Physiol Genomics*, 2006. 25(2): 194-202.
11. Mayr M, Zhang J, Greene AS, Gutterman D, Perloff J, Ping P, Proteomics-based development of biomarkers in cardiovascular disease: mechanistic, clinical, and therapeutic insights. *Mol Cell Proteomics*, 2006. 5(10): 1853-1864.
12. Aebersold R, Mann M, Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*, 2003. 422(6928): 198-207.
13. Petricoin EF, Liotta LA, Mass spectrometry-based diagnostics: the upcoming revolution in disease detection. *Clin Chem*, 2003. 49(4): 533-534.
14. Kolovou G, Anagnostopoulou K, Mikhailidis DP, Cokkinos DV, Apolipoprotein E knockout models. *Curr Pharm Des*, 2008. 14(4): 338-351.
15. Meir KS, Leitersdorf E, Atherosclerosis in the apolipoprotein-E-deficient mouse: a decade of progress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(6): 1006-1014.
16. Hayek T, Fuhrman B, Vaya J, Rosenblat M, Belinky P, Coleman R, Elis A, Aviram M, Reduced progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and aggregation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(11): 2744-2752.
17. Fuhrman B, Volkova N, Coleman R, Aviram M, Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient (E0) mice and reduce macrophage atherogenicity. *J Nutr*, 2005. 135(4): 722-728.
18. Jawien J, Nastalek P, Korbut R, Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*, 2004. 55(3): 503-517.
19. Afek A, George J, Gilburd B, Rauova L, Goldberg I, Kopolovic J, Harats D, Shoenfeld Y, Immunization of low-density lipoprotein receptor deficient (LDL-RD) mice with heat shock protein 65 (HSP-65) promotes early atherosclerosis. *J Autoimmun*, 2000. 14(2): 115-121.
20. Mandal K, Jahangiri M, Xu Q, Autoimmunity to heat shock proteins in atherosclerosis. *Autoimmun Rev*, 2004. 3(2): 31-37.

21. Falk E, Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 47(8 Suppl): C7-12.
22. Matsuura E, Atherosclerosis and Autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2008.
23. Gök H, Klinik Kardiyoloji. 2. baskı. 2002, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti.
24. Shishehbor MH, Bhatt DL, Inflammation and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 2004. 6(2): 131-139.
25. <http://herkules.oulu.fi/isbn951426973X/html/x840.html>.
26. Siekmeier R, Grammer T, Marz W, Roles of oxidants, nitric oxide, and asymmetric dimethylarginine in endothelial function. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2008. 13(4): 279-297.
27. Brevetti G, Schiano V, Chiariello M, Endothelial dysfunction: a key to the pathophysiology and natural history of peripheral arterial disease? *Atherosclerosis*, 2008. 197(1): 1-11.
28. Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P, The endothelial surface layer. *Pflügers Arch*, 2000. 440(5): 653-666.
29. Sumpio BE, Riley JT, Dardik A, Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002. 34(12): 1508-1512.
30. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A, Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. 23(2): 168-175.
31. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Jr., Vita JA, The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*, 2003. 42(7): 1149-1160.
32. Steinberg D, Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol*, 1995. 369: 39-48.
33. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y, Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*, 2009. 73(3): 411-418.
34. Singh U, Jialal I, Oxidative stress and atherosclerosis. *Pathophysiology*, 2006. 13(3): 129-142.

35. Dursun B, Dursun E, Suleymanlar G, Ozben B, Capraz I, Apaydin A, Ozben T, Carotid artery intima-media thickness correlates with oxidative stress in chronic haemodialysis patients with accelerated atherosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*, 2008. 23(5): 1697-1703.
36. Dursun B, Dursun E, Suleymanlar G, Ozben B, Capraz I, Apaydin A, Ozben T, The effect of hemodialysis on accelerated atherosclerosis in diabetic patients: correlation of carotid artery intima-media thickness with oxidative stress. *J Diabetes Complications*, 2009. 23(4): 257-264.
37. Amom Z, Zakaria Z, Mohamed J, Azlan A, Bahari H, Taufik Hidayat Baharuldin M, Aris Moklas M, Osman K, Asmawi Z, Kamal Nik Hassan M, Lipid lowering effect of antioxidant alpha-lipoic Acid in experimental atherosclerosis. *J Clin Biochem Nutr*, 2008. 43(2): 88-94.
38. Zhou C, Huang Y, Przedborski S, Oxidative stress in Parkinson's disease: a mechanism of pathogenic and therapeutic significance. *Ann N Y Acad Sci*, 2008. 1147: 93-104.
39. Dursun E, Dursun B, Suleymanlar G, Ozben T, Effect of haemodialysis on the oxidative stress and antioxidants in diabetes mellitus. *Acta Diabetol*, 2005. 42(3): 123-128.
40. Dursun B, Dursun E, Capraz I, Ozben T, Apaydin A, Suleymanlar G, Are uremia, diabetes, and atherosclerosis linked with impaired antioxidant mechanisms? *J Investig Med*, 2008. 56(2): 545-552.
41. Dursun E, Timur M, Dursun B, Suleymanlar G, Ozben T, Protein oxidation in Type 2 diabetic patients on hemodialysis. *J Diabetes Complications*, 2005. 19(3): 142-146.
42. Dursun E, Dursun B, Suleymanlar G, Ozben T, Carbonyl stress in chronic renal failure: the effect of haemodialysis. *Ann Clin Biochem*, 2005. 42(Pt 1): 64-66.
43. Dursun E, Ozben T, Suleymanlar G, Dursun B, Yakupoglu G, Effect of hemodialysis on the oxidative stress and antioxidants. *Clin Chem Lab Med*, 2002. 40(10): 1009-1013.
44. Custodis F, Baumhake M, Schlimmer N, List F, Gensch C, Bohm M, Laufs U, Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*, 2008. 117(18): 2377-2387.

45. Liu J, Qu W, Kadiiska MB, Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. 238(3): 209-214.
46. Dai Q, Gao YT, Shu XO, Yang G, Milne G, Cai Q, Wen W, Rothman N, Cai H, Li H, Xiang Y, Chow WH, Zheng W, Oxidative stress, obesity, and breast cancer risk: results from the Shanghai Women's Health Study. *J Clin Oncol*, 2009. 27(15): 2482-2488.
47. Stocker R, Keaney JF, Jr., Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*, 2004. 84(4): 1381-1478.
48. Keaney JF, Jr., Oxidative stress and the vascular wall: NADPH oxidases take center stage. *Circulation*, 2005. 112(17): 2585-2588.
49. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS, Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(1): 29-38.
50. Mashima R, Witting PK, Stocker R, Oxidants and antioxidants in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, 2001. 12(4): 411-418.
51. Maor I, Hayek T, Coleman R, Aviram M, Plasma LDL oxidation leads to its aggregation in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997. 17(11): 2995-3005.
52. Rubanyi GM, Vanhoutte PM, Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol*, 1986. 250(5 Pt 2): H822-827.
53. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007. 39(1): 44-84.
54. Tomasian D, Keaney JF, Vita JA, Antioxidants and the bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res*, 2000. 47(3): 426-435.
55. Yura T, Fukunaga M, Khan R, Nassar GN, Badr KF, Montero A, Free-radical-generated F2-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int*, 1999. 56(2): 471-478.
56. Loscalzo J, Nitric oxide and vascular disease. *N Engl J Med*, 1995. 333(4): 251-253.
57. Walford G, Loscalzo J, Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost*, 2003. 1(10): 2112-2118.

58. Lubos E, Handy DE, Loscalzo J, Role of oxidative stress and nitric oxide in atherothrombosis. *Front Biosci*, 2008. 13: 5323-5344.
59. Cai H, Harrison DG, Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, 2000. 87(10): 840-844.
60. Libby P, Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002. 420(6917): 868-874.
61. Murohara T, Buerke M, Lefer AM, Polymorphonuclear leukocyte-induced vasoconstriction and endothelial dysfunction. Role of selectins. *Arterioscler Thromb*, 1994. 14(9): 1509-1519.
62. Aral H, Türkmen, S., , Oksidatif stres ve hastalıklarla ilişkisi. *Folia* 2002. 4: 1-5.
63. Zhang C, The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol*, 2008. 103(5): 398-406.
64. Libby P, Ridker PM, Maseri A, Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 2002. 105(9): 1135-1143.
65. Shaw CA, Taylor EL, Megson IL, Rossi AG, Nitric oxide and the resolution of inflammation: implications for atherosclerosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005. 100 Suppl 1: 67-71.
66. Ross R, Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999. 340(2): 115-126.
67. Lucas AD, Greaves DR, Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med*, 2001. 3(25): 1-18.
68. Bissoendial RJ, Kastelein JJ, Stoes ES, C-reactive protein and atherogenesis: from fatty streak to clinical event. *Atherosclerosis*, 2007. 195(2): e10-18.
69. Cullen P, Rauterberg J, Lorkowski S, The pathogenesis of atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*, 2005(170): 3-70.
70. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T, Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. 27(8): 1706-1721.

71. Ohashi R, Mu H, Yao Q, Chen C, Cellular and molecular mechanisms of atherosclerosis with mouse models. *Trends Cardiovasc Med*, 2004. 14(5): 187-190.
72. Escola-Gil JC, Calpe-Berdiel L, Ribas V, Blanco-Vaca F, Moderate beer consumption does not change early or mature atherosclerosis in mice. *Nutr J*, 2004. 3: 1.
73. Xu Q, Mouse models of arteriosclerosis: from arterial injuries to vascular grafts. *Am J Pathol*, 2004. 165(1): 1-10.
74. Cho WC, Proteomics technologies and challenges. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 2007. 5(2): 77-85.
75. Hoehn GT, Suffredini AF, Proteomics. *Crit Care Med*, 2005. 33(12 Suppl): S444-448.
76. Scobioala S, Klocke R, Michel G, Kuhlmann M, Nikol S, Proteomics: state of the art and its application in cardiovascular research. *Curr Med Chem*, 2004. 11(24): 3203-3218.
77. Mayr M, Mayr U, Chung YL, Yin X, Griffiths JR, Xu Q, Vascular proteomics: linking proteomic and metabolomic changes. *Proteomics*, 2004. 4(12): 3751-3761.
78. O'Farrell PH, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, 1975. 250(10): 4007-4021.
79. Klose J, Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, 1975. 26(3): 231-243.
80. Ahram M, Petricoin EF, Proteomics Discovery of Disease Biomarkers. *Biomark Insights*, 2008. 3: 325-333.
81. Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP, Felschow D, The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002. 292(3): 587-592.
82. Caputo E, Moharram R, Martin BM, Methods for on-chip protein analysis. *Anal Biochem*, 2003. 321(1): 116-124.
83. Merchant M, Weinberger SR, Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2000. 21(6): 1164-1177.



84. Tang N, Tornatore P, Weinberger SR, Current developments in SELDI affinity technology. *Mass Spectrom Rev*, 2004. 23(1): 34-44.
85. Issaq HJ, Conrads TP, Prieto DA, Tirumalai R, Veenstra TD, SELDI-TOF MS for diagnostic proteomics. *Anal Chem*, 2003. 75(7): 148A-155A.
86. Steel LF, Haab BB, Hanash SM, Methods of comparative proteomic profiling for disease diagnostics. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005. 815(1-2): 275-284.
87. Xiao Z, Prieto D, Conrads TP, Veenstra TD, Issaq HJ, Proteomic patterns: their potential for disease diagnosis. *Mol Cell Endocrinol*, 2005. 230(1-2): 95-106.
88. Huang GS, Yang SM, Hong MY, Yang PC, Liu YC, Differential gene expression of livers from ApoE deficient mice. *Life Sci*, 2000. 68(1): 19-28.
89. Smith JD, Peng DQ, Dansky HM, Settle M, Baglione J, Le Goff W, Chakrabarti E, Xu Y, Peng X, Transcriptome profile of macrophages from atherosclerosis-sensitive and atherosclerosis-resistant mice. *Mamm Genome*, 2006. 17(3): 220-229.
90. Mayr M, Chung YL, Mayr U, Yin X, Ly L, Troy H, Fredericks S, Hu Y, Griffiths JR, Xu Q, Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(10): 2135-2142.
91. Lam L, Lind J, Semsarian C, Application of proteomics in cardiovascular medicine. *Int J Cardiol*, 2006. 108(1): 12-19.
92. Vivanco F, Martin-Ventura JL, Duran MC, Barderas MG, Blanco-Colio L, Darde VM, Mas S, Meilhac O, Michel JB, Tunon J, Egido J, Quest for novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis. *J Proteome Res*, 2005. 4(4): 1181-1191.
93. Carrera F, Oliveira L, Maia P, Mendes T, Ferreira C, The efficacy of intravenous darbepoetin alfa administered once every 2 weeks in chronic kidney disease patients on haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*, 2006. 21(10): 2846-2850.
94. Kourea K, Parissis JT, Farmakis D, Panou F, Paraskevidis I, Venetsanou K, Filippatos G, Kremastinos DT, Effects of darbepoetin-alpha on plasma pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokine interleukin-10 and

soluble Fas/Fas ligand system in anemic patients with chronic heart failure. *Atherosclerosis*, 2008. 199(1): 215-221.

95. Engert A, Recombinant human erythropoietin in oncology: current status and further developments. *Ann Oncol*, 2005. 16(10): 1584-1595.
96. Agoram B, Sutjandra L, Sullivan JT, Population pharmacokinetics of darbepoetin alfa in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*, 2007. 63(1): 41-52.
97. Egrie JC, Dwyer E, Browne JK, Hitz A, Lykos MA, Darbepoetin alfa has a longer circulating half-life and greater in vivo potency than recombinant human erythropoietin. *Exp Hematol*, 2003. 31(4): 290-299.
98. Powell J, Gurk-Turner C, Darbepoetin alfa (Aranesp). *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 2002. 15(3): 332-335.
99. van der Meer P, Voors AA, Lipsic E, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ, Erythropoietin in cardiovascular diseases. *Eur Heart J*, 2004. 25(4): 285-291.
100. Maiese K, Li F, Chong ZZ, New avenues of exploration for erythropoietin. *Jama*, 2005. 293(1): 90-95.
101. Kes P, Bobic I, Reiner Z, Ratkovic-Gusic I, [Effect of erythropoietin therapy on serum lipoprotein levels in patients on hemodialysis]. *Lijec Vjesn*, 2002. 124(5): 146-150.
102. Allegra V, Martimbianco L, Vasile A, Lipid and apolipoprotein patterns during erythropoietin therapy: roles of erythropoietin, route of administration, and diet. *Nephrol Dial Transplant*, 1997. 12(5): 924-932.
103. Prata MM, Madeira C, Vicente O, Miguel MJ, Lipid profile in haemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. *Nephrol Dial Transplant*, 1998. 13(9): 2345-2347.
104. Wilund KR, Rosenblat M, Chung HR, Volkova N, Kaplan M, Woods JA, Aviram M, Macrophages from alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor knockout mice demonstrate increased cholesterol accumulation and decreased cellular paraoxonase expression: a possible link between the nervous system and atherosclerosis development. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009. 390(1): 148-154.
105. Monostori P, Hracsko Z, Karg E, Varga IS, Kiss Z, Boros T, Kiss E, Haszon I, Papp F, Sumegi V, Bereczki C, Turi S, Erythropoiesis-stimulating agent withdrawal and oxidative stress in hemodialysis. *Clin Nephrol*, 2009. 71(5): 521-526.

106. Parissis JT, Kourea K, Andreadou I, Ikonomidis I, Markantonis S, Ioannidis K, Paraskevaidis I, Iliodromitis E, Filippatos G, Kremastinos DT, Effects of Darbepoetin Alfa on plasma mediators of oxidative and nitrosative stress in anemic patients with chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*, 2009. 103(8): 1134-1138.
107. Sukovich DA, Kauser K, Shirley FD, DelVecchio V, Halks-Miller M, Rubanyi GM, Expression of interleukin-6 in atherosclerotic lesions of male ApoE-knockout mice: inhibition by 17beta-estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998. 18(9): 1498-1505.
108. Michowitz Y, Arbel Y, Wexler D, Sheps D, Rogowski O, Shapira I, Berliner S, Keren G, George J, Roth A, Predictive value of high sensitivity CRP in patients with diastolic heart failure. *Int J Cardiol*, 2008. 125(3): 347-351.
109. Ishikawa C, Tsutomoto T, Fujii M, Sakai H, Tanaka T, Horie M, Prediction of mortality by high-sensitivity C-reactive protein and brain natriuretic peptide in patients with dilated cardiomyopathy. *Circ J*, 2006. 70(7): 857-863.
110. Xue C, Feng Y, Wo J, Li Y, Prognostic value of high-sensitivity C-reactive protein in patients with chronic heart failure. *N Z Med J*, 2006. 119(1245): U2314.
111. Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N, C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation*, 2003. 107(3): 391-397.
112. Pawlak K, Pawlak D, Mysliwiec M, Long-term erythropoietin therapy does not affect metalloproteinases and their inhibitor levels, oxidative stress and inflammation in hemodialyzed patients. *Am J Nephrol*, 2007. 27(3): 221-225.
113. Huang M, Pang X, Letourneau R, Boucher W, Theoharides TC, Acute stress induces cardiac mast cell activation and histamine release, effects that are increased in Apolipoprotein E knockout mice. *Cardiovasc Res*, 2002. 55(1): 150-160.
114. Clejan S, Japa S, Clemetson C, Hasabnis SS, David O, Talano JV, Blood histamine is associated with coronary artery disease, cardiac events and severity of inflammation and atherosclerosis. *J Cell Mol Med*, 2002. 6(4): 583-592.
115. Guray U, Erbay AR, Guray Y, Yilmaz MB, Boyaci AA, Sasmaz H, Korkmaz S, Kutuk E, Levels of soluble adhesion molecules in various clinical presentations of coronary atherosclerosis. *Int J Cardiol*, 2004. 96(2): 235-240.

116. Iiyama K, Hajra L, Iiyama M, Li H, DiChiara M, Medoff BD, Cybulsky MI, Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circ Res*, 1999. 85(2): 199-207.
117. Rubio-Guerra AF, Vargas-Robles H, Lozano Nuevo JJ, Escalante-Acosta BA, Correlation between circulating adhesion molecule levels and albuminuria in Type-2 diabetic hypertensive patients. *Kidney Blood Press Res*, 2009. 32(2): 106-109.
118. Jang WG, Kim HS, Park KG, Park YB, Yoon KH, Han SW, Hur SH, Park KS, Lee IK, Analysis of proteome and transcriptome of tumor necrosis factor alpha stimulated vascular smooth muscle cells with or without alpha lipoic acid. *Proteomics*, 2004. 4(11): 3383-3393.
119. Michielsen ECHJ. DM, Daemen MJAP., Wodzig KWH., Heeneman S., Dieijen-Visser MP, SELDI-TOF proteomic profiles to predict atherosclerotic plaque rupture. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*, 2005. 30: 294-295.

## ÖZGEÇMİŞ

Evrin DURSUN, 12.05.1977 yılında Burdur'da doğdu. İlkokul öğrenimini 1989 yılında Adıyaman Cumhuriyet İlkokulu'nda, orta öğrenimini 1992 yılında Çanakkale Anadolu Lisesi'nde, lise öğrenimini 1995 yılında Antalya Anadolu Lisesi'nde, yüksek öğrenimini 1999 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde tamamladı. 2003 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimini tamamlayarak aynı yıl doktora eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir. Evlidir.

# **EKLER**



## Proteomic profiling during atherosclerosis progression using SELDI-TOF-MS: Effect of darbepoetin treatment

Evrin Dursun<sup>a</sup>, Emanuela Monari<sup>b</sup>, Aurora Cuoghi<sup>b</sup>, Stefania Bergamini<sup>b</sup>, Beste Ozben<sup>c</sup>, Gultekin Suleymanlar<sup>d</sup>, Aldo Tomasi<sup>b</sup>, Tomris Ozben<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Akdeniz University, Medical Faculty, Department of Biochemistry, 07070 Antalya, Turkey

<sup>b</sup>University of Modena, Medical Faculty, Department of Laboratory Medicine, Modena and Reggio Emilia, Italy

<sup>c</sup>Marmara University, Medical Faculty, Department of Cardiology, Istanbul, Turkey

<sup>d</sup>Akdeniz University, Medical Faculty, Department of Internal Medicine, Antalya, Turkey

Received 11 March 2009; received in revised form 19 March 2009; accepted 4 April 2009

### KEYWORDS

Atherosclerosis;  
Apolipoprotein  
E-deficient mice;  
Proteomics;  
Darbepoetin;  
SELDI-TOF-MS

### Summary

Narrowing of the arteries due to atherosclerosis may lead to congestive heart failure (CHF). It is advantageous to perform atherosclerosis studies in apolipoprotein E-deficient (Apo E<sup>-/-</sup>) mice models, which develop atherosclerosis very rapidly in comparison to humans. Darbepoetin is a synthetic erythropoietin analogue and stimulates erythropoiesis. The aim of this study was to explore the effect of 16 weeks of darbepoetin treatment on serum protein profiles in Apo E<sup>-/-</sup> mice during atherosclerosis progression. Serum proteomic analyses were performed using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS) in the darbepoetin-treated and non-treated (control) Apo E<sup>-/-</sup> mice groups. The protein profiles obtained using three different chips, CM-10 (weak cation exchange), H50 (reversed-phase) and IMAC-30 (immobilized metal affinity capture), were statistically analyzed using the ProteinChip data manager 3.0 program. At the end of 16 weeks of darbepoetin treatment, there was no significant difference in the size and degree of atherosclerotic lesions between the darbepoetin and control mice groups. In contrast, 145 protein/peptide-clustering peaks, >5kDa, had statistically significant differences in their peak intensities between the darbepoetin and control mice groups ( $p < 0.05$ ). That the proteomic profiles of darbepoetin-treated Apo E<sup>-/-</sup> mice were found to differ from those of the control group indicates a

\*Corresponding author at: Akdeniz University, Medical Faculty, Department of Biochemistry, 07070 Antalya, Turkey.  
Tel.: +90 242 2496895; fax: +90 242 2274495.

E-mail address: [ozben@akdeniz.edu.tr](mailto:ozben@akdeniz.edu.tr) (T. Ozben).

potential beneficial role of darbepoetin in atherosclerosis. Our study contributes to understanding the effects of darbepoetin on protein/peptide expressions during atherosclerosis development.

© 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## Introduction

Atherosclerosis and its complications are one of the main causes of death in humans. It is characterized by a long period of disease progression, allowing potentially early diagnosis and therapeutic intervention (Almofiti et al., 2006). Narrowing of the arteries due to atherosclerosis may lead to congestive heart failure (CHF). Many patients with congestive heart failure are anaemic. The presence of anaemia is associated with more severe CHF and a higher incidence of mortality, hospitalisation and morbidity (Silverberg et al., 2008; Cleland et al., 2005a, b; Katz et al., 2004; Palazzuoli et al., 2007). In several studies, correction of anaemia has been shown to be associated with an improvement in hospitalisation and morbidity (Silverberg et al., 2008, 2009). To date, most studies of anaemia correction in CHF have used erythropoiesis-stimulating agents (ESAs) (Cleland et al., 2005a, b; Kim et al., 2005; Murphy and McMurray, 2008). Treatment of anaemia with ESAs in patients with CHF seems attractive, and has been explored in a few relatively small studies (van Veldhuisen et al., 2007). Although several clinical trials have established the safety and efficacy of ESAs in correcting anaemia in patients with CHF, the balance of benefit and risk of anaemia correction in CHF is uncertain, may vary according to the severity of anaemia and needs to be properly evaluated (Faraz et al., 2008; Murphy and McMurray, 2008). Recombinant erythropoietin (Epo) forms (epoetin- $\alpha$ , epoetin- $\beta$  and the long-acting analogue darbepoetin- $\alpha$ ) have been widely used for treatment of anaemia in CHF, chronic kidney disease and chemotherapy-induced anaemia in cancer patients (Arcasoy, 2008). Darbepoetin- $\alpha$  (Aranesp<sup>®</sup>), which stimulates erythropoiesis in a manner similar to endogenous erythropoietin, has an approximately 3-fold longer serum half-life and greater *in vivo* biological activity, allowing for extended dosing intervals compared with recombinant human erythropoietin.

The generation and study of apolipoprotein E-deficient (Apo E<sup>-/-</sup>) mice have revealed important insights into atherosclerosis. The stages of atherosclerosis development can be studied in

these animals and the beneficial effects of drugs in reducing atherosclerosis progression can be tested (Coleman, 2006; Coleman et al., 2006; Napoli et al., 2000; Rosenblat et al., 2006, 2007, 2008; Tabibiazar et al., 2006; Wuttge et al., 2001; Aviram et al., 2008; Fuhrman et al., 2005; Hayek et al., 2005; Mayr et al., 2004, 2005; Fabrizio Rodella et al., 2007; Dursun et al., 2009).

Proteomics has the potential to uncover new therapeutic targets for the treatment and prevention of cardiovascular disease, as well as new diagnostic biomarkers for early disease detection (Arrell et al., 2001; Blanco-Colio et al., 2006; Lam et al., 2006). Non-physiological changes in protein expression levels often reflect the presence of disease, and such proteins can provide excellent markers for diagnostic, prognostic and therapeutic purposes (Mayr et al., 2005, 2007; Blanco-Colio et al., 2006). The effects of darbepoetin on serum protein profiles during atherosclerosis progression have not yet been studied. The aim of this study was to explore the effects of 16 weeks of darbepoetin treatment on serum protein profiles in atherosclerotic Apo E<sup>-/-</sup> mice by serum proteomic analysis using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF-MS).

## Materials and methods

### Laboratory animals

In this study, genetically modified homozygous Apo E<sup>-/-</sup> mice were used to examine the effects of darbepoetin on proteomic profiling in atherosclerosis. Each group consisted of five mice. Male homozygous Apo E<sup>-/-</sup> mice were obtained from Taconic Laboratories (Ejby, Denmark) at 3–4 weeks of age. They were maintained in filtered cages in the specific area allocated for them in the Animal Laboratory, in a light- and temperature-controlled environment (temperature: 22 ± 2 °C, humidity: 50 ± 5%, and 12 h light–dark cycle) and had free access to water and standard laboratory chow. The study was approved by the Ethics Committee for Maintenance and Use of Laboratory Animals,



Faculty of Medicine, Akdeniz University. The investigation conforms to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication no. 85-23, revised 1996) and "Principle of Laboratory Animal Care" (NIH publication no.86-23, revised 1985).

### Drug treatment

Darbepoetin- $\alpha$  (Aranesp, Amgen, Thousand Oaks, CA) was kindly provided by Prof. Dr Gultekin Suleymanlar, Department of Internal Medicine, Medical Faculty, Akdeniz University, Antalya, Turkey. It was administered to the mice in the darbepoetin group intraperitoneally at the dose of 0.5  $\mu$ g/kg/week for 16 weeks, starting from 7 weeks of age until the end of 23 weeks. Darbepoetin solution was freshly prepared on every injection day and the administered dose was based on the body weight of each mouse that increased progressively throughout the 16 week treatment period.

### Sample collection and handling

At the end of 23 weeks of age, blood samples were collected from the abdominal aorta of darbepoetin-treated and non-treated control mice under ether anesthesia, and centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Serum samples were separated and stored in aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$  with addition of the protease inhibitor cocktail (S8820, SigmaFAST<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Tablets, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to avoid protein degradation during the preparation of the samples.

### SELDI-TOF-MS analyses

Proteomic analyses in darbepoetin and control mice were performed using SELDI-TOF-MS in the Laboratories of Department of Pathological Anatomy and Legal Medicine, Medical Faculty, University of Modena and Reggio Emilia, Italy. Each serum sample from darbepoetin and control groups was analysed to determine the proteomic profile differences between the darbepoetin and control mice. In order to reduce sample complexity, increase peak numbers and improve detection of low-abundance proteins, all samples were pre-fractionated using strong anion-exchange chromatography, as described below, prior to SELDI-TOF MS analyses. All steps were automated using robotics (Biomek 3000 Laboratory Automation Workstation

from Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) in order to improve reproducibility and throughput.

Serum samples were thawed, randomized, and duplicate 20  $\mu$ L aliquots were placed into 96-well plates. Serum samples in each well were denatured and diluted with 30  $\mu$ L ProteinChip U9 buffer (ProteinChip<sup>®</sup> Serum Fractionation Kit, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA, contains 9 M urea, 2% CHAPS, 50 mM Tris-HCl, pH 9) by shaking and incubating at  $+2-8^{\circ}\text{C}$  for 20 min. Serum samples were then transferred to 96-well filter plates containing rehydrated Q Ceramic HyperD<sup>®</sup> F resin (ProteinChip<sup>®</sup> Serum Fractionation Kit) and incubated with shaking at  $+2-8^{\circ}\text{C}$  for 30 min. Unbound material was removed on a vacuum manifold as fraction 1 (F1), and proteins were eluted in a stepwise fashion by decreasing the pH (F2: pH 7; F3: pH 5; F4: pH 4; and F5: pH 3) with a final organic solvent elution (F6). Based on our previous results, serum fraction 1 was combined with fraction 2; and serum fraction 5 was combined with fraction 6. The final four different serum fractions (F1/2, F3, F4, F5/6) were applied to CM10 (weak cation exchange), H50 (reverse phase) and IMAC30-Cu<sup>2+</sup> (immobilized metal affinity capture) chip arrays in 96-sample bioprocessors (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Chip preparation, sample and matrix application were performed according to the manufacturer's instructions with slight modifications using the Biomek 3000 Laboratory Automation Workstation (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) as follows. One hundred microliter per spot of samples, diluted 1:10 with binding buffers, were loaded on CM10, H50 and IMAC30-Cu ProteinChip arrays and incubated for 45 min at room temperature. The unbound proteins were removed by washing with 200  $\mu$ L of the same buffers three times, rinsed quickly with pure water and left to dry. One microliter of 50% saturated solution of sinapinic acid in 0.5% trifluoroacetic acid/50% acetonitrile (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was applied to each spot twice and then spot adsorbed protein patterns were analyzed on a ProteinChip Reader (Series 4000, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Spectra were obtained using two different acquisition protocols for low (2.5–20 kDa) and high (20–200 kDa) molecular weight, respectively. External mass calibration was performed with ProteinChip All-in-One Protein Standard II (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Peak annotation was performed after baseline subtraction, noise calculation, alignment, and normalization by total ion current (TIC), and peak detection with ProteinChip Data Manager software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

## Statistical analyses

Statistical analyses were performed using ProteinChip Data Manager 3.0 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). All the spectra were compiled, and qualified mass peaks (signal-to-noise ratio > 5) with mass-to-charge ratios ( $m/z$ ) between 5000 and 200,000 Da (Dalton) were autodetected. Peak clusters were completed using second-pass peak selection (signal-to-noise ratio > 2, within 0.1% mass window), and estimated peaks were added. The peak intensities were normalized to the TIC of  $m/z$  between 1500 and 200,000 Da.  $p$ -Values were determined using mean peak intensities from duplicate samples. A  $p$  value less than 0.05 was accepted as statistically significant. The differences were also examined by principal components analyses (PCA) and hierarchical clustering.

## Results

### Animal data

Mean body weights were not significantly different between the groups ( $37.5 \pm 1.4$  g in the darbepoetin-treated Apo  $E^{-/-}$  mice group and  $36.8 \pm 3.0$  g in the control group,  $p = 0.421$ ) at the end of the study. We did not observe any difference in animal activity or behavior in the darbepoetin-treated Apo  $E^{-/-}$  mice compared with their controls.

### SELDI-TOF-MS analyses

Serum protein profiles of darbepoetin-treated and non-treated atherosclerotic Apo  $E^{-/-}$  mice were compared to determine the proteomic differences in both groups and clarify the effect of darbepoetin on protein profile in atherosclerosis.

Table 1 shows that 145 protein/peptide-clustering peaks, of molecular weight > 5 kDa, had statistically significant differences in their peak intensities detected using 12 different conditions (analysis of four serum fractions on three different chips) and reading with high- and low-intensity laser energy in the darbepoetin-treated atherosclerotic group in comparison to the control group ( $p < 0.05$ ). The distribution of 145 significantly different protein/peptide peaks among the three chips is shown in Table 1 as 29 protein/peptides on chip CM10 read with low-intensity laser energy and 35 protein/peptides on chip CM10 read with high-intensity laser energy; 31 protein/peptides on chip H50 read with low-intensity laser energy and 20

protein/peptides on chip H50 read with high-intensity laser energy; and 5 protein/peptides on chip IMAC30 read with low-intensity laser energy and 25 protein/peptides on chip IMAC30 read with high-intensity laser energy. The highest number of protein/peptide clusters having statistically significant differences in their peak intensities between the darbepoetin-treated and control groups was achieved with the CM10 chip array (64 protein/peptides on chip CM10 versus 51 protein/peptides on chip H50 and 30 protein/peptides on chip IMAC read with both high- and low-intensity laser energy).

Figure 1 demonstrates the number of statistically significant up-regulated (high signal intensity) and down-regulated (low signal intensity) protein/peptides on each chip surface as separate columns in the darbepoetin-treated atherosclerotic mice compared with the control mice. The total number of up-regulated (high signal intensity) protein/peptides read with both high- and low-intensity laser energy was 27 on chip CM10, 31 on chip H50 and 16 on chip IMAC30 in the darbepoetin-treated group compared with the control group. The number of down-regulated (low signal intensity) protein/peptides read with both high- and low-intensity laser energy was 37 on chip CM10, 20 on chip H50 and 14 on chip IMAC30 in the darbepoetin-treated mice group compared with the control mice group. Seventy-four of 145 statistically significant clustering protein/peptide peaks read with both high- and low-intensity laser energy on three chips had higher signal intensity and 71 had lower signal intensity in the darbepoetin-treated atherosclerotic mice group compared with the control group. The highest number of statistically significant protein/peptide clusters was achieved with the CM10 chip array.

Figure 2 demonstrates the heat map of up-regulated and down-regulated protein/peptides obtained from fraction F5/6 in the darbepoetin-treated and control mice groups using CM10 chip and reading with high laser energy. Areas of red represent up-regulated proteins, while green areas represent down-regulated proteins. Hierarchical clustering separates control mice from darbepoetin-treated mice. Mass/ion ( $m/z$ ) ratio of proteins in Da is indicated on the right of Figure 2.

Figure 3 shows the gel view of three protein/peptides obtained from fraction 3 of both mice groups on chip H50 surface and reading with high laser energy. The intensities of these three proteins were significantly different ( $m/z$ :  $43,716 \pm 62.70$  Da,  $51,857 \pm 76.71$  Da,  $66,398 \pm 269.26$  Da) between the control and darbepoetin-treated atherosclerotic groups.

**Table 1.** Protein/peptide clusters having statistically significant differences in their peak intensities between the darbepoetin-treated and control groups.

|                               | F (fraction) | p-Value | Intensity (mean $\pm$ SD) |                  |
|-------------------------------|--------------|---------|---------------------------|------------------|
|                               |              |         | Control                   | Darbepoetin      |
| <i>CM10 low laser energy</i>  |              |         |                           |                  |
| 7849.98 $\pm$ 6.99            | 1/2          | 0.003   | 11.56 $\pm$ 1.91          | 4.92 $\pm$ 1.42  |
| 7878.79 $\pm$ 3.03            | 1/2          | 0.003   | 11.59 $\pm$ 2.76          | 3.23 $\pm$ 1.00  |
| 7899.17 $\pm$ 2.75            | 1/2          | 0.003   | 12.02 $\pm$ 3.07          | 2.54 $\pm$ 0.45  |
| 7931.39 $\pm$ 7.52            | 1/2          | 0.003   | 12.34 $\pm$ 2.86          | 3.76 $\pm$ 0.99  |
| 11687.76 $\pm$ 47.11          | 1/2          | 0.003   | 0.73 $\pm$ 0.29           | 3.86 $\pm$ 1.33  |
| 15791.43 $\pm$ 8.51           | 1/2          | 0.012   | 7.51 $\pm$ 2.06           | 3.73 $\pm$ 1.66  |
| 15868.38 $\pm$ 13.40          | 1/2          | 0.019   | 7.17 $\pm$ 1.88           | 4.44 $\pm$ 1.79  |
| 16376.30 $\pm$ 36.86          | 1/2          | 0.013   | 3.96 $\pm$ 1.36           | 1.55 $\pm$ 0.49  |
| 19380.00 $\pm$ 18.12          | 1/2          | 0.003   | 0.53 $\pm$ 0.26           | 0.05 $\pm$ 0.02  |
| 13767.02 $\pm$ 13.77          | 3            | 0.012   | 2.12 $\pm$ 0.36           | 2.94 $\pm$ 0.95  |
| 16981.16 $\pm$ 9.39           | 3            | 0.001   | 0.22 $\pm$ 0.06           | 0.48 $\pm$ 0.08  |
| 21407.61 $\pm$ 62.016         | 3            | 0.001   | 0.36 $\pm$ 0.06           | 0.17 $\pm$ 0.04  |
| 22012.00 $\pm$ 83.38          | 3            | 0.001   | 0.82 $\pm$ 0.17           | 0.24 $\pm$ 0.02  |
| 25802.22 $\pm$ 60.33          | 3            | 0.001   | 0.49 $\pm$ 0.10           | 0.08 $\pm$ 0.02  |
| 5129.99 $\pm$ 8.99            | 4            | 0.001   | 2.34 $\pm$ 0.58           | 0.58 $\pm$ 0.21  |
| 16551.98 $\pm$ 9.24           | 4            | 0.001   | 0.89 $\pm$ 0.14           | 0.11 $\pm$ 0.04  |
| 22273.14 $\pm$ 85.15          | 4            | 0.001   | 1.04 $\pm$ 0.16           | 0.19 $\pm$ 0.03  |
| 25930.59 $\pm$ 30.91          | 4            | 0.001   | 0.29 $\pm$ 0.03           | 0.11 $\pm$ 0.04  |
| 5156.17 $\pm$ 8.77            | 5/6          | 0.001   | 2.33 $\pm$ 0.76           | 1.26 $\pm$ 0.24  |
| 8725.11 $\pm$ 0.86            | 5/6          | 0.001   | 4.35 $\pm$ 1.65           | 17.57 $\pm$ 7.76 |
| 8743.19 $\pm$ 2.12            | 5/6          | 0.001   | 3.11 $\pm$ 1.00           | 12.94 $\pm$ 4.91 |
| 9350.90 $\pm$ 9.75            | 5/6          | 0.001   | 3.22 $\pm$ 0.43           | 0.32 $\pm$ 0.13  |
| 12159.79 $\pm$ 10.19          | 5/6          | 0.002   | 0.41 $\pm$ 0.11           | 1.15 $\pm$ 0.49  |
| 13987.15 $\pm$ 15.45          | 5/6          | 0.001   | 2.09 $\pm$ 0.43           | 0.45 $\pm$ 0.16  |
| 18819.94 $\pm$ 52.28          | 5/6          | 0.002   | 0.52 $\pm$ 0.17           | 0.21 $\pm$ 0.09  |
| 21500.59 $\pm$ 12.49          | 5/6          | 0.001   | 0.45 $\pm$ 0.14           | 0.07 $\pm$ 0.03  |
| 22026.36 $\pm$ 18.04          | 5/6          | 0.001   | 0.33 $\pm$ 0.07           | 0.06 $\pm$ 0.02  |
| 28030.50 $\pm$ 28.17          | 5/6          | 0.006   | 0.58 $\pm$ 0.17           | 0.28 $\pm$ 0.16  |
| 28893.28 $\pm$ 67.20          | 5/6          | 0.004   | 0.39 $\pm$ 0.12           | 0.18 $\pm$ 0.08  |
| <i>CM10 high laser energy</i> |              |         |                           |                  |
| 29849.333 $\pm$ 64.60         | 1/2          | 0.004   | 0.78 $\pm$ 0.38           | 1.75 $\pm$ 0.67  |
| 38760.16 $\pm$ 46.16          | 1/2          | 0.006   | 2.30 $\pm$ 0.82           | 0.85 $\pm$ 0.32  |
| 54192.02 $\pm$ 1248.09        | 1/2          | 0.001   | 0.12 $\pm$ 0.02           | 0.30 $\pm$ 0.09  |
| 33058.47 $\pm$ 159.92         | 3            | 0.002   | 2.18 $\pm$ 0.29           | 0.56 $\pm$ 0.14  |
| 38882.28 $\pm$ 341.99         | 3            | 0.002   | 1.99 $\pm$ 0.34           | 1.18 $\pm$ 0.28  |
| 49898.82 $\pm$ 484.51         | 3            | 0.003   | 0.08 $\pm$ 0.01           | 0.19 $\pm$ 0.08  |
| 71937.13 $\pm$ 339.28         | 3            | 0.009   | 0.69 $\pm$ 0.07           | 0.39 $\pm$ 0.19  |
| 77372.73 $\pm$ 984.69         | 3            | 0.006   | 2.75 $\pm$ 0.42           | 5.61 $\pm$ 1.66  |
| 98809.36 $\pm$ 818.95         | 3            | 0.020   | 0.05 $\pm$ 0.02           | 0.08 $\pm$ 0.02  |
| 105026.62 $\pm$ 1366.39       | 3            | 0.002   | 0.03 $\pm$ 0.01           | 0.13 $\pm$ 0.03  |
| 156094.49 $\pm$ 1976.30       | 3            | 0.006   | 0.14 $\pm$ 0.06           | 0.50 $\pm$ 0.16  |
| 33298.99 $\pm$ 89.83          | 4            | 0.002   | 3.53 $\pm$ 0.32           | 1.89 $\pm$ 0.18  |
| 38428.97 $\pm$ 49.17          | 4            | 0.006   | 0.13 $\pm$ 0.05           | 0.07 $\pm$ 0.02  |
| 44233.03 $\pm$ 69.18          | 4            | 0.002   | 1.02 $\pm$ 0.10           | 0.44 $\pm$ 0.06  |
| 49697.86 $\pm$ 122.80         | 4            | 0.002   | 0.62 $\pm$ 0.08           | 0.29 $\pm$ 0.03  |
| 51762.41 $\pm$ 39.06          | 4            | 0.002   | 0.99 $\pm$ 0.09           | 0.61 $\pm$ 0.10  |
| 65941.71 $\pm$ 27.79          | 4            | 0.002   | 6.43 $\pm$ 0.60           | 10.44 $\pm$ 1.35 |
| 80854.22 $\pm$ 573.36         | 4            | 0.003   | 0.09 $\pm$ 0.04           | 0.26 $\pm$ 0.07  |
| 88304.16 $\pm$ 42.52          | 4            | 0.006   | 0.29 $\pm$ 0.05           | 0.21 $\pm$ 0.02  |
| 109879.96 $\pm$ 160.10        | 4            | 0.002   | 0.04 $\pm$ 0.01           | 0.12 $\pm$ 0.03  |
| 116249.33 $\pm$ 1150.44       | 4            | 0.002   | 0.06 $\pm$ 0.01           | 0.13 $\pm$ 0.01  |
| 132101.09 $\pm$ 127.76        | 4            | 0.002   | 1.22 $\pm$ 0.10           | 1.88 $\pm$ 0.10  |
| 198040.34 $\pm$ 204.79        | 4            | 0.002   | 0.19 $\pm$ 0.02           | 0.44 $\pm$ 0.05  |

Table 1. (continued)

|                              | F (fraction) | p-Value | Intensity (mean $\pm$ SD) |                   |
|------------------------------|--------------|---------|---------------------------|-------------------|
|                              |              |         | Control                   | Darbepoetin       |
| 33189.34 $\pm$ 45.97         | 5/6          | 0.003   | 1.06 $\pm$ 0.19           | 0.52 $\pm$ 0.07   |
| 34007.35 $\pm$ 15.71         | 5/6          | 0.012   | 0.44 $\pm$ 0.07           | 0.30 $\pm$ 0.07   |
| 43122.35 $\pm$ 346.87        | 5/6          | 0.012   | 0.78 $\pm$ 0.22           | 0.26 $\pm$ 0.09   |
| 45201.99 $\pm$ 551.71        | 5/6          | 0.012   | 0.43 $\pm$ 0.04           | 0.16 $\pm$ 0.03   |
| 66119.47 $\pm$ 53.53         | 5/6          | 0.012   | 1.64 $\pm$ 0.24           | 2.28 $\pm$ 0.56   |
| 75411.01 $\pm$ 380.33        | 5/6          | 0.003   | 0.14 $\pm$ 0.03           | 0.24 $\pm$ 0.03   |
| 81848.22 $\pm$ 614.69        | 5/6          | 0.003   | 0.05 $\pm$ 0.01           | 0.15 $\pm$ 0.04   |
| 115303.48 $\pm$ 619.67       | 5/6          | 0.003   | 0.02 $\pm$ 0.00           | 0.05 $\pm$ 0.01   |
| 132519.71 $\pm$ 415.73       | 5/6          | 0.003   | 0.23 $\pm$ 0.03           | 0.33 $\pm$ 0.09   |
| 149615.34 $\pm$ 1268.07      | 5/6          | 0.012   | 0.03 $\pm$ 0.01           | 0.07 $\pm$ 0.02   |
| 162726.05 $\pm$ 2392.79      | 5/6          | 0.003   | 0.01 $\pm$ 0.00           | 0.04 $\pm$ 0.01   |
| 198979.02 $\pm$ 765.45       | 5/6          | 0.003   | 0.03 $\pm$ 0.01           | 0.05 $\pm$ 0.01   |
| <i>H50 low laser energy</i>  |              |         |                           |                   |
| 15064.49 $\pm$ 42.71         | 1/2          | 0.003   | 0.98 $\pm$ 0.39           | 9.50 $\pm$ 3.56   |
| 15692.54 $\pm$ 15.52         | 1/2          | 0.003   | 18.74 $\pm$ 5.62          | 94.62 $\pm$ 27.33 |
| 15755.32 $\pm$ 11.69         | 1/2          | 0.003   | 19.65 $\pm$ 4.23          | 88.59 $\pm$ 38.08 |
| 15862.59 $\pm$ 14.34         | 1/2          | 0.003   | 18.42 $\pm$ 3.59          | 59.17 $\pm$ 9.15  |
| 15935.71 $\pm$ 27.89         | 1/2          | 0.003   | 15.65 $\pm$ 2.68          | 46.65 $\pm$ 16.48 |
| 14626.78 $\pm$ 7.59          | 3            | 0.033   | 3.48 $\pm$ 1.42           | 0.93 $\pm$ 0.04   |
| 21455.49 $\pm$ 21.33         | 3            | 0.033   | 1.05 $\pm$ 0.31           | 4.80 $\pm$ 1.37   |
| 8918.48 $\pm$ 20.00          | 4            | 0.003   | 12.67 $\pm$ 4.32          | 41.62 $\pm$ 16.21 |
| 9278.54 $\pm$ 14.26          | 4            | 0.033   | 4.29 $\pm$ 1.74           | 11.09 $\pm$ 4.73  |
| 14087.03 $\pm$ 26.56         | 4            | 0.001   | 7.61 $\pm$ 2.41           | 2.17 $\pm$ 0.97   |
| 21556.38 $\pm$ 92.49         | 4            | 0.001   | 1.68 $\pm$ 0.62           | 0.59 $\pm$ 0.14   |
| 22440.50 $\pm$ 240.04        | 4            | 0.003   | 1.11 $\pm$ 0.22           | 0.58 $\pm$ 0.16   |
| 25981.01 $\pm$ 82.49         | 4            | 0.006   | 1.62 $\pm$ 0.59           | 0.86 $\pm$ 0.24   |
| 28871.28 $\pm$ 75.36         | 4            | 0.045   | 1.75 $\pm$ 0.48           | 1.27 $\pm$ 0.36   |
| 5018.93 $\pm$ 1.26           | 5/6          | 0.001   | 2.09 $\pm$ 0.96           | 26.17 $\pm$ 12.42 |
| 6025.74 $\pm$ 3.28           | 5/6          | 0.001   | 2.46 $\pm$ 1.06           | 12.25 $\pm$ 5.67  |
| 7015.95 $\pm$ 7.82           | 5/6          | 0.001   | 15.83 $\pm$ 2.64          | 6.17 $\pm$ 2.83   |
| 8360.91 $\pm$ 24.6           | 5/6          | 0.001   | 6.23 $\pm$ 2.31           | 16.88 $\pm$ 8.06  |
| 8852.71 $\pm$ 20.02          | 5/6          | 0.009   | 43.18 $\pm$ 9.36          | 76.24 $\pm$ 29.41 |
| 8929.46 $\pm$ 5.48           | 5/6          | 0.009   | 18.68 $\pm$ 5.72          | 33.52 $\pm$ 13.16 |
| 9352.49 $\pm$ 28.87          | 5/6          | 0.001   | 28.92 $\pm$ 4.88          | 5.03 $\pm$ 1.95   |
| 9649.55 $\pm$ 5.39           | 5/6          | 0.001   | 14.90 $\pm$ 2.03          | 1.44 $\pm$ 0.36   |
| 9928.53 $\pm$ 13.02          | 5/6          | 0.034   | 6.41 $\pm$ 1.59           | 4.62 $\pm$ 2.05   |
| 13975.53 $\pm$ 5.88          | 5/6          | 0.001   | 4.91 $\pm$ 0.91           | 2.30 $\pm$ 1.02   |
| 14053.49 $\pm$ 16.62         | 5/6          | 0.001   | 16.88 $\pm$ 4.28          | 1.09 $\pm$ 0.47   |
| 14481.21 $\pm$ 14.90         | 5/6          | 0.001   | 10.96 $\pm$ 2.34          | 0.60 $\pm$ 0.22   |
| 14986.46 $\pm$ 110.88        | 5/6          | 0.001   | 5.76 $\pm$ 2.46           | 0.47 $\pm$ 0.17   |
| 15732.14 $\pm$ 17.95         | 5/6          | 0.001   | 3.05 $\pm$ 0.74           | 1.47 $\pm$ 0.68   |
| 15845.78 $\pm$ 45.02         | 5/6          | 0.001   | 3.45 $\pm$ 1.52           | 1.01 $\pm$ 0.47   |
| 21556.34 $\pm$ 66.83         | 5/6          | 0.001   | 1.46 $\pm$ 0.43           | 0.15 $\pm$ 0.05   |
| 28169.71 $\pm$ 17.11         | 5/6          | 0.001   | 4.23 $\pm$ 1.03           | 1.32 $\pm$ 0.51   |
| <i>H50 high laser energy</i> |              |         |                           |                   |
| 92021.45 $\pm$ 1016.31       | 1/2          | 0.001   | 0.02 $\pm$ 0.00           | 0.06 $\pm$ 0.02   |
| 43716.60 $\pm$ 62.70         | 3            | 0.008   | 1.92 $\pm$ 0.52           | 0.66 $\pm$ 0.19   |
| 51857.56 $\pm$ 76.71         | 3            | 0.023   | 0.31 $\pm$ 0.14           | 0.12 $\pm$ 0.03   |
| 66398.97 $\pm$ 269.26        | 3            | 0.008   | 1.25 $\pm$ 0.29           | 3.28 $\pm$ 0.61   |
| 106226.50 $\pm$ 1887.33      | 3            | 0.008   | 0.03 $\pm$ 0.00           | 0.06 $\pm$ 0.01   |
| 135723.69 $\pm$ 1252.35      | 3            | 0.023   | 0.05 $\pm$ 0.02           | 0.13 $\pm$ 0.05   |
| 152507.02 $\pm$ 2374.62      | 3            | 0.023   | 0.02 $\pm$ 0.00           | 0.03 $\pm$ 0.00   |
| 190266.58 $\pm$ 4130.12      | 3            | 0.008   | 0.01 $\pm$ 0.00           | 0.03 $\pm$ 0.01   |
| 51819.95 $\pm$ 106.85        | 4            | 0.006   | 2.44 $\pm$ 0.63           | 5.35 $\pm$ 0.76   |

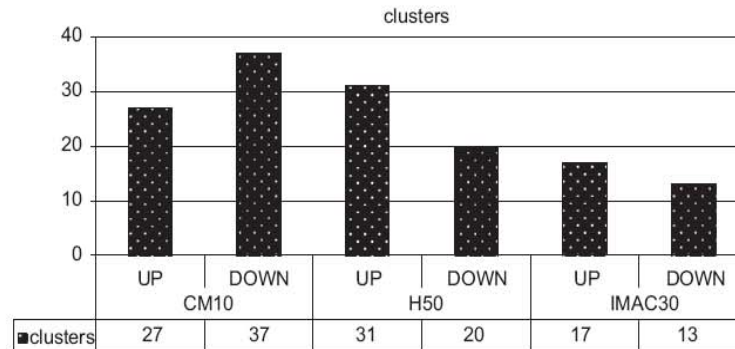
Table 1. (continued)

|                                 | F (fraction) | p-Value | Intensity (mean $\pm$ SD) |                  |
|---------------------------------|--------------|---------|---------------------------|------------------|
|                                 |              |         | Control                   | Darbepoetin      |
| 60494.80 $\pm$ 316.42           | 4            | 0.006   | 0.12 $\pm$ 0.05           | 0.54 $\pm$ 0.15  |
| 66378.68 $\pm$ 315.48           | 4            | 0.006   | 1.36 $\pm$ 0.14           | 4.81 $\pm$ 0.79  |
| 74642.69 $\pm$ 341.13           | 4            | 0.006   | 0.14 $\pm$ 0.01           | 0.57 $\pm$ 0.14  |
| 82172.69 $\pm$ 584.70           | 4            | 0.006   | 0.09 $\pm$ 0.03           | 0.28 $\pm$ 0.06  |
| 94380.44 $\pm$ 221.93           | 4            | 0.006   | 0.03 $\pm$ 0.01           | 0.08 $\pm$ 0.03  |
| 117863.77 $\pm$ 581.16          | 4            | 0.006   | 0.04 $\pm$ 0.01           | 0.11 $\pm$ 0.04  |
| 133403.37 $\pm$ 1521.37         | 4            | 0.006   | 0.17 $\pm$ 0.03           | 0.42 $\pm$ 0.10  |
| 197517.34 $\pm$ 2371.93         | 4            | 0.006   | 0.01 $\pm$ 0.00           | 0.04 $\pm$ 0.01  |
| 51852.21 $\pm$ 281.28           | 5/6          | 0.001   | 0.06 $\pm$ 0.03           | 0.19 $\pm$ 0.04  |
| 89129.07 $\pm$ 1029.62          | 5/6          | 0.020   | 0.03 $\pm$ 0.00           | 0.04 $\pm$ 0.01  |
| 177556.44 $\pm$ 3569.38         | 5/6          | 0.015   | 0.01 $\pm$ 0.00           | 0.02 $\pm$ 0.01  |
| <i>IMAC30 low laser energy</i>  |              |         |                           |                  |
| 21094.72 $\pm$ 36.67            | 5/6          | 0.001   | 1.16 $\pm$ 0.36           | 0.43 $\pm$ 0.15  |
| 21550.59 $\pm$ 31.94            | 5/6          | 0.001   | 4.71 $\pm$ 1.04           | 0.23 $\pm$ 0.10  |
| 22000.55 $\pm$ 33.88            | 5/6          | 0.001   | 4.50 $\pm$ 0.56           | 0.42 $\pm$ 0.13  |
| 27915.29 $\pm$ 31.80            | 5/6          | 0.001   | 8.06 $\pm$ 1.66           | 2.88 $\pm$ 1.25  |
| 28818.55 $\pm$ 22.41            | 5/6          | 0.001   | 4.69 $\pm$ 0.99           | 1.52 $\pm$ 0.57  |
| <i>IMAC30 high laser energy</i> |              |         |                           |                  |
| 33126.69 $\pm$ 11.18            | 4            | 0.001   | 5.76 $\pm$ 0.49           | 2.83 $\pm$ 0.53  |
| 41222.42 $\pm$ 939.92           | 4            | 0.001   | 0.27 $\pm$ 0.10           | 0.78 $\pm$ 0.13  |
| 44165.76 $\pm$ 180.88           | 4            | 0.001   | 1.27 $\pm$ 0.15           | 0.71 $\pm$ 0.15  |
| 47728.80 $\pm$ 446.79           | 4            | 0.001   | 0.81 $\pm$ 0.16           | 0.28 $\pm$ 0.05  |
| 66060.59 $\pm$ 136.10           | 4            | 0.015   | 11.64 $\pm$ 0.82          | 17.91 $\pm$ 4.50 |
| 81444.08 $\pm$ 242.64           | 4            | 0.008   | 0.45 $\pm$ 0.14           | 1.09 $\pm$ 0.44  |
| 88597.77 $\pm$ 187.27           | 4            | 0.027   | 0.21 $\pm$ 0.07           | 0.12 $\pm$ 0.05  |
| 98954.84 $\pm$ 60.36            | 4            | 0.008   | 0.61 $\pm$ 0.14           | 0.36 $\pm$ 0.10  |
| 109258.25 $\pm$ 688.12          | 4            | 0.001   | 0.05 $\pm$ 0.01           | 0.21 $\pm$ 0.03  |
| 115119.84 $\pm$ 565.38          | 4            | 0.002   | 0.06 $\pm$ 0.02           | 0.13 $\pm$ 0.02  |
| 164711.07 $\pm$ 919.77          | 4            | 0.005   | 0.03 $\pm$ 0.01           | 0.05 $\pm$ 0.02  |
| 177546.23 $\pm$ 2002.33         | 4            | 0.001   | 0.01 $\pm$ 0.00           | 0.05 $\pm$ 0.01  |
| 33192.75 $\pm$ 30.48            | 5/6          | 0.002   | 2.38 $\pm$ 0.36           | 1.12 $\pm$ 0.27  |
| 43220.10 $\pm$ 104.34           | 5/6          | 0.002   | 1.05 $\pm$ 0.26           | 0.36 $\pm$ 0.05  |
| 45161.38 $\pm$ 279.29           | 5/6          | 0.002   | 0.76 $\pm$ 0.05           | 0.34 $\pm$ 0.06  |
| 49730.15 $\pm$ 186.56           | 5/6          | 0.004   | 0.28 $\pm$ 0.07           | 0.18 $\pm$ 0.03  |
| 66152.79 $\pm$ 228.74           | 5/6          | 0.035   | 3.88 $\pm$ 0.41           | 6.13 $\pm$ 1.61  |
| 66792.12 $\pm$ 43.04            | 5/6          | 0.006   | 3.06 $\pm$ 0.55           | 4.78 $\pm$ 1.13  |
| 81807.60 $\pm$ 369.31           | 5/6          | 0.002   | 0.12 $\pm$ 0.03           | 0.38 $\pm$ 0.07  |
| 116031.98 $\pm$ 518.78          | 5/6          | 0.002   | 0.02 $\pm$ 0.00           | 0.06 $\pm$ 0.01  |
| 131167.74 $\pm$ 1293.45         | 5/6          | 0.035   | 0.55 $\pm$ 0.09           | 0.86 $\pm$ 0.25  |
| 147772.31 $\pm$ 1436.37         | 5/6          | 0.002   | 0.06 $\pm$ 0.01           | 0.14 $\pm$ 0.02  |
| 162535.33 $\pm$ 1116.16         | 5/6          | 0.002   | 0.01 $\pm$ 0.00           | 0.02 $\pm$ 0.00  |
| 177887.93 $\pm$ 1269.09         | 5/6          | 0.002   | 0.01 $\pm$ 0.00           | 0.02 $\pm$ 0.00  |
| 196437.77 $\pm$ 2774.58         | 5/6          | 0.002   | 0.06 $\pm$ 0.01           | 0.16 $\pm$ 0.05  |

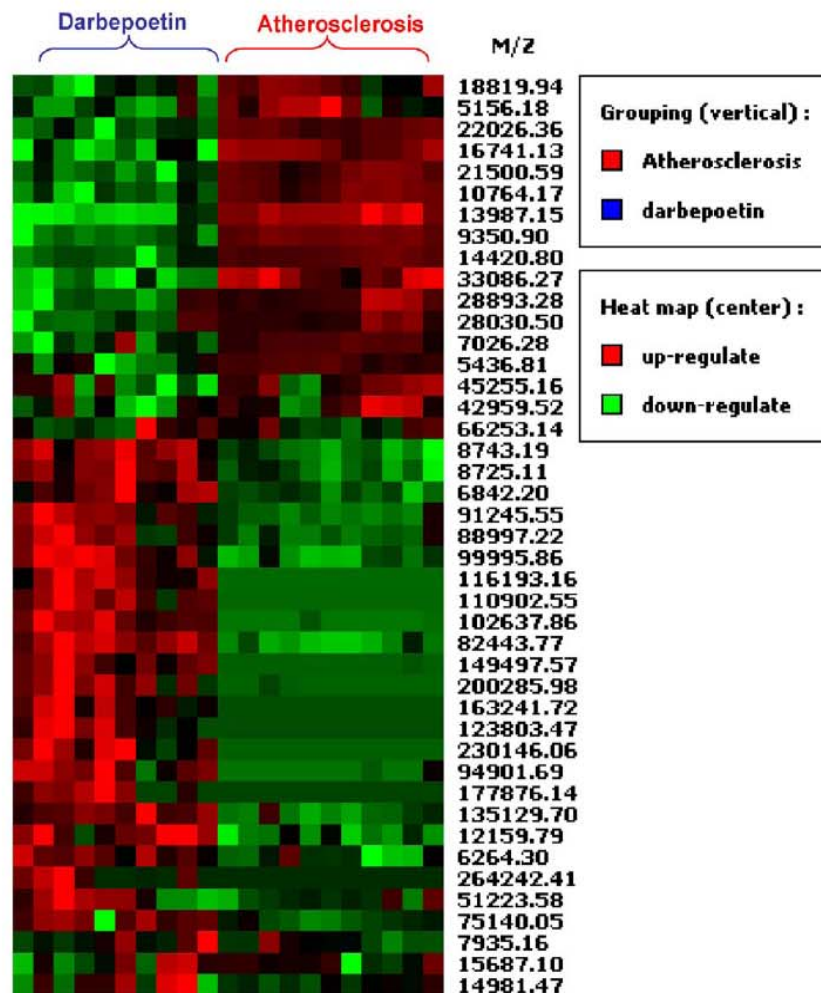
Figure 4 demonstrates peak view and cluster plots of some proteins with intensities significantly different ( $m/z$ : 21,094.72  $\pm$  36.67 Da, 21,550.59  $\pm$  31.94 Da, 22,000.55  $\pm$  33.88 Da, 27,915.29  $\pm$  31.80 Da, 28,818.55  $\pm$  22.41 Da) obtained from fraction 5/6 in both mice groups on chip IMAC30 and reading with low laser energy.

## Discussion

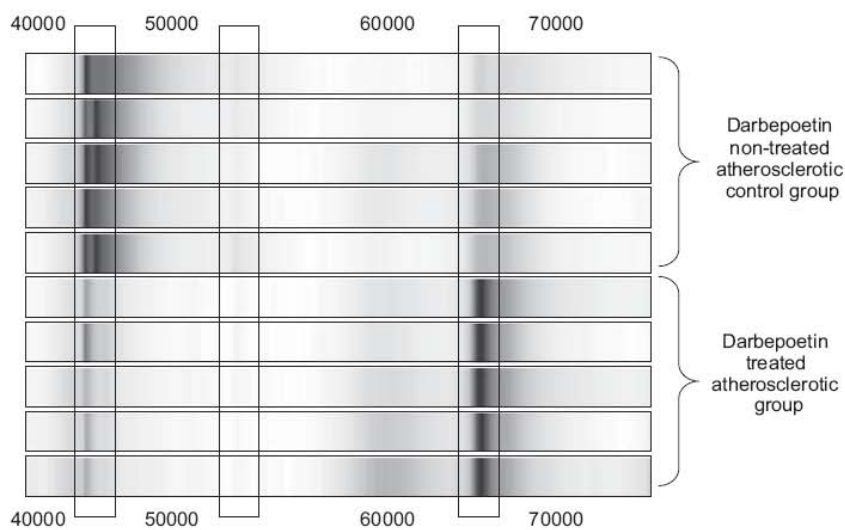
In this study, our aim was to explore the effects of 16 weeks of darbepoetin treatment on serum protein profiles in atherosclerotic Apo E<sup>-/-</sup> mice by serum proteomic analysis. The effect of the novel human recombinant erythropoietin



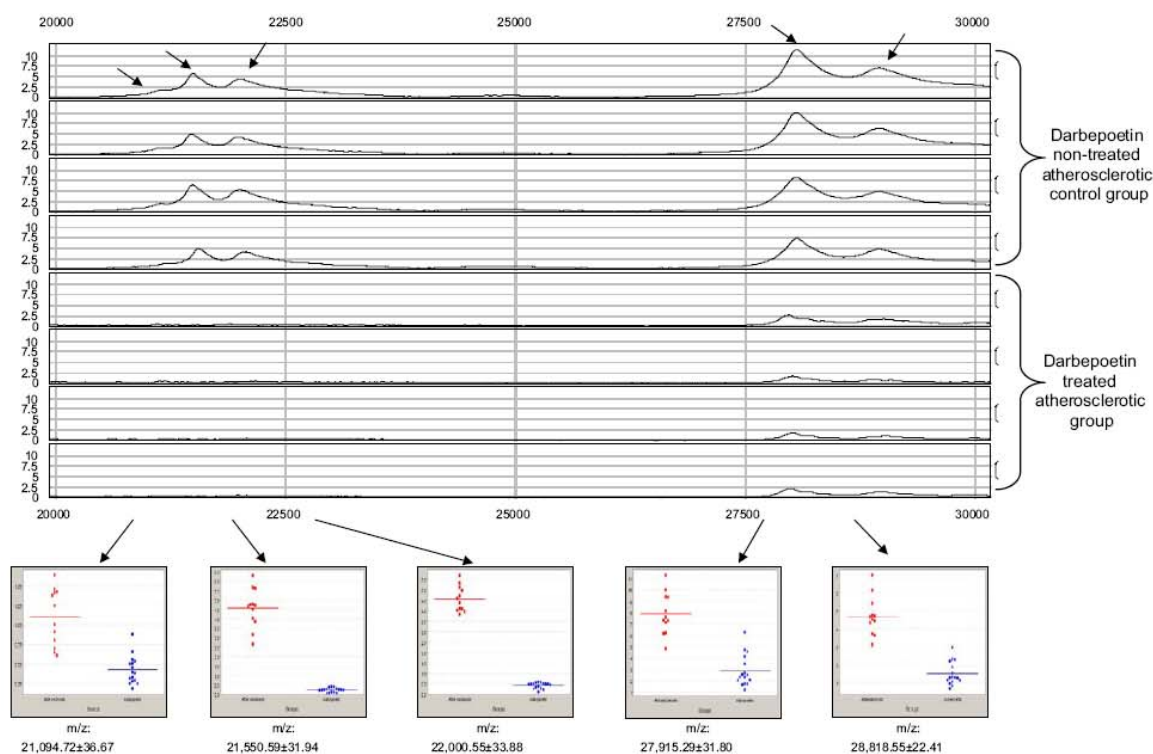
**Figure 1.** The number of statistically significant up-regulated (high signal intensity) and down-regulated (low signal intensity) protein/peptides on each chip surface in the darbepoetin group in comparison to the control group. The numbers of up-regulated and down-regulated protein/peptides on each chip surface are indicated as separate columns.



**Figure 2.** Heat map of up-regulated and down-regulated protein/peptides obtained from fraction 5/6 using CM10 chip and reading with high laser energy in the darbepoetin-treated and control groups. Areas of red represent up-regulated proteins, while green areas represent down-regulated proteins. Hierarchical clustering separates darbepoetin-treated atherosclerotic mice from the control mice. Mass/ion ratio ( $m/z$ ) of proteins in daltons is indicated on the right of the figure. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)



**Figure 3.** Gel view of three proteins present in significantly different amounts ( $m/z$ :  $43,716 \pm 62.70$ ,  $51,857 \pm 76.71$ ,  $66,398 \pm 269.26$ ) in samples from the darbepoetin-treated and control groups. (F3; H50; high laser energy) (F: fraction;  $m/z$ : mass/ion ratio).



**Figure 4.** The peak view of five proteins with  $m/z$  of  $21,094.72 \pm 36.67$  Da,  $21,550.59 \pm 31.94$  Da,  $22,000.55 \pm 33.88$  Da,  $27,915.29 \pm 31.80$  Da and  $28,818.55 \pm 22.41$  Da in the darbepoetin-treated and control groups. The data are obtained from fraction 5/6 applying low laser energy on the IMAC30 chip surface.

analogue darbepoetin- $\alpha$  on proteomic profiling has not yet been studied in CHF. In our study, we used the novel protein biochip SELDI-TOF-MS

technology to search the effect of darbepoetin treatment on protein profile during the progression of atherosclerosis.

In the hematopoietic system, the principal function of erythropoietin (Epo) is the regulation of red blood cell production, mediated by its specific cell surface receptor (EpoR). Following the cloning of the Epo gene (EPO) and characterization of the selective hematopoietic action of Epo in erythroid lineage cells, recombinant Epo forms (epoetin- $\alpha$ , epoetin- $\beta$  and the long-acting analogue darbepoetin- $\alpha$ ) have been widely used for treatment of anaemia in CHF, chronic kidney disease and chemotherapy-induced anaemia in cancer patients (Arcasoy, 2008). Darbepoetin- $\alpha$  (Aranesp<sup>®</sup>), which stimulates erythropoiesis in a manner similar to endogenous erythropoietin, has 2 more *N*-linked carbohydrate sites than the primary sequence of recombinant human erythropoietin, resulting in an approximately 3-fold longer serum half-life and greater *in vivo* biologic activity, allowing for extended dosing intervals compared with recombinant human erythropoietin. Darbepoetin- $\alpha$  is currently approved for the treatment of anaemia secondary to chronic renal failure and anaemia associated with chemotherapy treatment of non-myeloid malignancies in adults. Several studies have shown that darbepoetin- $\alpha$  effectively and safely maintains hemoglobin levels in these patient populations at dosing intervals of once every 4 weeks compared with more frequently administered recombinant human erythropoietin. This extended dosing schedule of darbepoetin- $\alpha$  significantly improves convenience for both patients and healthcare providers while effectively and safely maintaining hemoglobin levels and potentially reducing costs (Cleland et al., 2005a, b).

We compared the serum protein profiles of atherosclerotic Apo E<sup>-/-</sup> mice treated and non-treated with darbepoetin and found that the intensities of 145 protein/peptide clusters were significantly different in the darbepoetin-treated group in comparison to the control group ( $p < 0.05$ ). Administration of darbepoetin to Apo E<sup>-/-</sup> mice significantly decreased the peak intensities of 71 serum proteins, while it increased the peak intensities of 74 protein/peptides. The patterns of detection of proteins revealed that several proteins in serum might be involved in the development and/or progression of atherosclerosis in Apo E<sup>-/-</sup> mice and darbepoetin had an effect on the serum levels of these proteins. Further study is needed to validate and identify serum proteins whose expression patterns are changed by darbepoetin treatment in the atherosclerotic Apo E<sup>-/-</sup> mice.

Protein identification is not always a necessity for certain applications. Monitoring a protein profile is often sufficient to reveal whether experimental conditions induce the same or different protein

changes. Direct comparison of protein profiles or "protein signatures" facilitates rapid screening of differences between various treatments. If a consistent and predictable pattern of protein change or modification associated with the particular event is validated, the identification studies will follow the validated particular protein expression differences and modifications with every particular cellular event or phenotype. Testing of the validity of phenotype consistency will, with time, be achieved through proteomics. Such an approach may also be applied to the comparison of drug-treated versus untreated, mutant versus wild-type, or healthy versus diseased samples (Arrell et al., 2001; Hong et al., 2005).

The limited number of specimens analyzed in this study may, to some degree, limit the validity of the results. Yet, our study is the first study demonstrating the efficacy of darbepoetin on serum protein profiles in Apo E<sup>-/-</sup> mice during atherosclerosis development and indicates that the use of ProteinChip technology can provide a useful basis for serum protein profiling in atherosclerosis and therapeutic evaluation of darbepoetin.

Our study has shown that the protein biochip-based SELDI-TOF-MS technology used for the characterization of protein profiles has helped elucidate the potential effects of darbepoetin in atherosclerosis. Serum proteomic profiles of darbepoetin-treated Apo E<sup>-/-</sup> mice differed from those in the control group, indicating a potential effect of darbepoetin in atherosclerosis. Our study has contributed towards the better understanding of the effect of darbepoetin on serum protein profile during atherosclerosis development.

## Acknowledgements

This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (TUBITAK), Ankara, Turkey, and by the Akdeniz University Department of Research Funds, Antalya, Turkey.

## References

- Almofti MR, Huang Z, Yang P, Rui Y, Yang P. Proteomic analysis of rat aorta during atherosclerosis induced by high cholesterol diet and injection of vitamin D3. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006;33:305-9.
- Arcasoy MO. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin. *Br J Haematol* 2008;141:14-31.
- Arrell DK, Neverova I, Van Eyk JE. Cardiovascular proteomics: evolution and potential. *Circ Res* 2001;88:763-73.



- Aviram M, Volkova N, Coleman R, Dreher M, Reddy MK, Ferreira D, et al. Pomegranate phenolics from the peels, arils, and flowers are antiatherogenic: studies *in vivo* in atherosclerotic apolipoprotein E-deficient (E0) mice and *in vitro* in cultured macrophages and lipoproteins. *J Agric Food Chem* 2008;56:1148–57.
- Blanco-Colio LM, Martin-Ventura JL, Vivanco F, Michel JB, Meilhac O, Egido J. Biology of atherosclerotic plaques: what we are learning from proteomic analysis. *Cardiovasc Res* 2006;72:18–29.
- Cleland JG, Coletta AP, Clark AL, Velavan P, Ingle L. Clinical trials update from the European Society of Cardiology Heart Failure meeting and the American College of Cardiology: darbepoetin alfa study, ECHOS, and ASCOT-BPLA. *Eur J Heart Fail* 2005;7:937–9.
- Cleland JG, Sullivan JT, Ball S, Horowitz JD, Agoram B, Rosser D, et al. Once-monthly administration of darbepoetin alfa for the treatment of patients with chronic heart failure and anemia: a pharmacokinetic and pharmacodynamic investigation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;46:155–61.
- Coleman LS. Atherosclerosis may be caused by inadequate levels of turbulence and mixing. *World J Surg* 2006;30:638–9.
- Coleman R, Hayek T, Keidar S, Aviram M. A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice. *Acta Histochem* 2006;108:415–24.
- Dursun E, Ozben B, Monari E, Cuoghi A, Tomasi A, Ozben T. Proteomic profiling in apolipoprotein E-deficient mice during atherosclerosis progression. *Acta Histochem*, 2009; Feb 19. doi:10.1016/j.acthis.2008.10.007 [Epub ahead of print].
- Fabrizio Rodella L, Bonomini F, Rezzani R, Tengattini S, Hayek T, Aviram M, et al. Atherosclerosis and the protective role played by different proteins in apolipoprotein E-deficient mice. *Acta Histochem* 2007;109:45–51.
- Faraz HA, Zafar SF, Ghali JK. Anemia and the potential role of erythropoiesis-stimulating agents in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 2008;5:83–90.
- Fuhrman B, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Grape powder polyphenols attenuate atherosclerosis development in apolipoprotein E deficient (E0) mice and reduce macrophage atherogenicity. *J Nutr* 2005;135:722–8.
- Hayek T, Hussein K, Aviram M, Coleman R, Keidar S, Pavoltzky E, et al. Macrophage foam-cell formation in streptozotocin-induced diabetic mice: stimulatory effect of glucose. *Atherosclerosis* 2005;183:25–33.
- Hong H, Dragan Y, Epstein J, Teitel C, Chen B, Xie Q, et al. Quality control and quality assessment of data from surface-enhanced laser desorption/ionization (SELDI) time-of flight (TOF) mass spectrometry (MS). *BMC Bioinformatics* 2005;6(Suppl. 2):S5.
- Katz SD, Mancini D, Androne AS, Hryniewicz K. Treatment of anemia in patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 2004;10:S13–6.
- Kim WH, Choi CH, Kang SK, Kwon CH, Kim YK. Ceramide induces non-apoptotic cell death in human glioma cells. *Neurochem Res* 2005;30:969–79.
- Lam L, Lind J, Semsarian C. Application of proteomics in cardiovascular medicine. *Int J Cardiol* 2006;108:12–9.
- Mayr M, Chung YL, Mayr U, Yin X, Ly L, Troy H, et al. Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2135–42.
- Mayr M, Madhu B, Xu Q. Proteomics and metabolomics combined in cardiovascular research. *Trends Cardiovasc Med* 2007;17:43–8.
- Mayr M, Mayr U, Chung YL, Yin X, Griffiths JR, Xu Q. Vascular proteomics: linking proteomic and metabolomic changes. *Proteomics* 2004;4:3751–61.
- Murphy CL, McMurray JJ. Approaches to the treatment of anaemia in patients with chronic heart failure. *Heart Fail Rev* 2008;13:431–8.
- Napoli C, Palinski W, Di Minno G, D'Armiento FP. Determination of atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000;10:209–15.
- Palazzuoli A, Silverberg DS, Iovine F, Calabro A, Campagna MS, Gallotta M, et al. Effects of beta-erythropoietin treatment on left ventricular remodeling, systolic function, and B-type natriuretic peptide levels in patients with the cardiorenal anemia syndrome. *Am Heart J* 2007;154:645 (e649–615).
- Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Almagor Y, Aviram M. Antiatherogenicity of extra virgin olive oil and its enrichment with green tea polyphenols in the atherosclerotic apolipoprotein-E-deficient mice: enhanced macrophage cholesterol efflux. *J Nutr Biochem* 2008;19:514–23.
- Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Anti-oxidant and anti-atherogenic properties of liposomal glutathione: studies *in vitro*, and in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2007;195:e61–8.
- Rosenblat M, Volkova N, Coleman R, Aviram M. Pomegranate byproduct administration to apolipoprotein E-deficient mice attenuates atherosclerosis development as a result of decreased macrophage oxidative stress and reduced cellular uptake of oxidized low-density lipoprotein. *J Agric Food Chem* 2006;54:1928–35.
- Silverberg DS, Wexler D, Iaina A, Schwartz D. The role of correction of anaemia in patients with congestive heart failure: a short review. *Eur J Heart Fail* 2008a;10:819–23.
- Silverberg DS, Wexler D, Iaina A, Schwartz D. The correction of anemia in patients with the combination of chronic kidney disease and congestive heart failure may prevent progression of both conditions. *Clin Exp Nephrol* 2009b;13(2):101–6.
- Tabibiazar R, Wagner RA, Deng A, Tsao PS, Quertermous T. Proteomic profiles of serum inflammatory markers

- accurately predict atherosclerosis in mice. *Physiol Genomics* 2006;25:194–202.
- Wuttge DM, Sirsjo A, Eriksson P, Stemme S. Gene expression in atherosclerotic lesion of ApoE deficient mice. *Mol Med* 2001;7:383–92.
- van Veldhuisen DJ, Dickstein K, Cohen-Solal A, Lok DJ, Wasserman SM, Baker N, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the effect of two dosing regimens of darbepoetin alfa in patients with heart failure and anaemia. *Eur Heart J* 2007;28:2208–16.