

Araştırma Makalesi

Hüyük Asitler Venöz Azaltmak İçin Trombosit Aktivasyonunu Engeller
Farelerde Tromboembolizm

Hong Tao Lan ^{1,2}, Ya-Ting Zheng, ³ Zhou-Jie Tong, ¹ Kong Zhang, ^{4,5}
Xiao-Yan Cong, ^{4,5} ve Zhi-Hao Wang ²

¹ Kardiyovasküler Yeniden Modelleme ve Fonksiyon Araştırması Ana Laboratuvarı, Çin Eğitim Bakanlığı, Çin Ulusal Sağlık Komisyonu ve Çin Tıp Bilimleri Akademisi, Eyalet ve Shandong Eyaleti Translasyonel Kardiyovasküler Tıp Ortak Anahtar Laboratuvarı, Kardiyoloji Bölümü, Qilu Hastanesi, Cheeloo Tıp Fakültesi, Shandong Üniversitesi, Jinan, Çin

² Shandong Üniversitesi Qilu Hastanesi, Geriatrik Tıp Bölümü,

Shandong Eyaleti Kardiyovasküler Proteomik Ana Laboratuvarı, Shandong Üniversitesi Qilu Hastanesi, Jinan, Çin

³ Hemşirelik ve Rehabilitasyon Okulu, Cheeloo Tıp Fakültesi, Shandong Üniversitesi, Jinan, Çin

⁴ Shandong Asia-Pacific Highvarve Organisms Science and Technology Co., Ltd., Jinan, Çin

⁵ Jinan Kuoda Biyoteknoloji Co., Ltd., Jinan, Çin

Yazışmalar Xiao-Yan Cong; xiaoyanvictory@126.com ve Zhi-Hao Wang; wangzhihaosdu@126.com adreslerine yapılmalıdır.

23 Mart 2022'de alındı; 17 Kasım 2022'de revize edildi; 5 Aralık 2022'de kabul edildi; 21 Aralık 2022 tarihinde yayımlandı

Akademik Editör: Saheed Sabiu

Telif hakkı © 2022 Hong-Tao Lan ve diğerleri. Bu, Creative Commons Atıf Lisansı altında dağıtılan ve orijinal eserden uygun şekilde alıntı yapılması koşuluyla herhangi bir ortamda sergilenmesi için izin verilen açık erişimli bir makaledir.

Amaç. Doğal ürün hüyük asitlerin (HA) farelerde trombosit aktivasyonu ve venöz tromboembolizm (VTE) gelişimi üzerindeki etkilerini araştırma ve ilgili mekanizmayı daha fazla keşfetmeyi amaçladı. **Yöntemler.** Sekiz haftalık C57BL/6 fareleri rastgele üç gruba ayrıldı: sahte operasyon grubu (n = 7), VTE grubu (n = 8) ve VTE + HA grubu (n = 10). Trombüsün trombolizini ve rekanalizasyonunu değerlendirmek için hematoksilen-eozin boyamasında trombüs toplandı. Ek olarak, plazmada aktif trombosit yüzeyinin yüzeyinde glikoprotein IIb/IIIa ve endotelial türevli eksozomlar üzerinde protein disülfid izomerazın ekspresyon seviyelerini saptamak için akış sitometrisi yapıldı. Ayrıca glikoprotein IIb/IIIa'nın trombüsteki protein ekspresyon düzeyi, immünohistokimya ve immünofloresan ile belirlendi. **Sonuçlar.** VTE + HA grubundaki tromboz uzunluğu, VTE grubundan anlamlı olarak daha kısaydı (P = 0.040). VTE + HA grubu ile VTE grubu arasında tromboliz ve rekanalizasyonda anlamlı bir fark gözlenmedi (P > 0.05). Endotelden türetilen eksozomlar tarafından taşınan protein disülfid izomeraz içeriği, VTE grubunda önemli ölçüde artmış (P = 0.008), ancak doğal hüyük asitler tarafından önemli ölçüde azaltılmıştır (P = 0.012). VTE grubu ile karşılaştırıldığında, glikoprotein IIb/IIIa'nın aktive trombosit yüzeyindeki ekspresyonu VTE + HA grubunda önemli ölçüde azaldı (P = 0.002). VTE grubundaki plazmatik P selektin konsantrasyonu, VTE + HA grubundakinden önemli ölçüde daha yüksekti (P < 0.001). **Çözüm.** HA'nın farelerde venöz trombüs oluşumunu azaltan bir farmakolojik özelliğe sahip olduğunu gösterdik. Altta yatan mekanizma, HA'nın, protein disülfid izomeraz taşıyan endotel kaynaklı eksozomları baskılayarak aktive edilmiş trombosit yüzeyinde glikoprotein IIb/IIIa ekspresyonunu inhibe edebilmesi ve böylece trombosit aktivasyonunu bloke edebilmesidir.

1. Giriş

Venöz tromboembolizm (VTE), venöz obstrüktif reflü bozukluğu ve derin ven trombozu (DVT) ve pulmoner emboli (PE) içeren intravenöz tromboza bağlı bir dizi ilgili patofizyolojik değişikliklerle sonuçlanan potansiyel bir patojenik hastalıktır. Yaklaşık, 10

dünyada her yıl 1 milyon vaka meydana gelmektedir [1]. Üçüncü en sık görülen akut kardiyovasküler olay olarak tanımlanan venöz tromboembolizm, bulaşıcı olmayan hastalıkları yüküne önemli ölçüde katkıda bulunmuştur [2]. Yıllık VTE insidansı nın %0,1-0,2 olduğu tahmin edilmektedir ve bu, dünya çapında nüfusun daha uzun yaşam beklentisiyle katlanarak artmaya devam edecektir [3, 4].

Kronik tekrarlayan bir hastalık olarak VTE, ölüm, antikoagülan tedaviye bağlı kanama ve çok yıllı kanama ile ilişkilidir. Tekrarlayan tromboz ve antikoagülasyonla ilişkili kanama dairesinde, hem posttrombotik sendrom hem de kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon, önemli morbiditeye neden olan ve yaşam kalitesini düşüren VTE'nin ciddi komplikasyonları olarak giderek daha fazla tanınmaktadır [5, 6]. Çok sayıda klinik çalışmada, antikoagülasyonun VTE için temel terapötik program olduğunu önermektedir. Doğrudan oral antikoagülan, VTE'li hemen hemen tüm bireyler için ön tedavidir.

Trombozun önlenmesinde ve tedavisinde hızlı başlangıç ve kesin etkinliğin avantajları göz önüne alındığında, American College of Chest tarafından yayınlanan "Guidelines for Antithrombotic Therapy of Venous Thromboembolism" in 10.

baskı sırasında venöz tromboemboli tedavisinde yeni oral antikoagülan önerildi. 2016'da doktorlar. Bununla birlikte, VTE'nin kanama ve tekrarlanma riski çözülmemiş bir sorun olmaya devam ediyor. İlk kez VTE ile başvuran ve en az 3 aylık antikoagülasyon tedavisini tamamlayan hastalarda, tedaviden sonraki ilk yılda %10, ikinci yılda %16, beşinci yılda %25 ve onuncu yılda %36 tekrarlayan VTE riski vardı [7]. Bu durumda, antiplatelet tedavi başka bir kritik yaklaşım haline gelecektir.

Klasik teori, trombositlerin esas olarak arteriyel trombus oluşumunda yer aldığına inanılmaktadır. Venöz trombozda trombositler de bulunmasına rağmen, fibrin ve eritrositler baskındır. Son yıllarda, trombositlerin VTE'deki rolü, trombosit kompleksi sinyal iletimi, hücreler arası etkileşim ve trombositlerdeki ilgili proteinler [8-10] ve ayrıca klinik kognitif trans oluşumu üzerine artan çalışmaları ortaya çıkması nedeniyle atfedilerek, kademeli olarak vurgulanmıştır. VTE'yi önlemek için antiplatelet ilaç aspirin [11].

Arteriyovenöz trombozun patogenezi büyük ölçüde iç içe geçmiştir. VTE tanısı konan bireylerde, daha sonraki arteriyel iskemik olay riskinin yüksek olduğu öne sürülmüştür [12, 13]. Aynı şekilde, aterosklerotik hastalık bireyleri venöz tromboza yatkın hale getirir [14]. Hayvan modellerinde yapılan bazı çalışmaları, trombosit aktivasyonunun VTE'nin patogenezindeki anahtar rolünü doğrulamıştır [15, 16]. Ek olarak, gözlemsel çalışmalardan elde edilen klinik kanıtlar da venöz trombozda trombosit reaktivitesinin önemini desteklemektedir [17]. Ek olarak, son yıllarda VTE'nin önlenmesinde ve tedavisinde antiplatelet ilaçlar kullanılmaktadır [18]. Antiplatelet ve antikoagülasyonun birlikte uygulanması, özellikle bir arteriyel vasküler hastalığı eşlik ettiği bazı VTE hastaları için VTE tedavisi için açığa faydalı olan üst üste bindirilmiş bir iyileştirme etkisine sahiptir. Bununla birlikte, kombinasyon, kanama komplikasyonları insidansında artışa neden olur.

Trombotik hastalıkları önlemek için kullanılan mevcut ilaçların kanama riskinin artması ve tek etki hedefinin toleransa yol açması gibi eksiklikleri göz önüne alındığında, daha az yan etkiye sahip yeni bir antitrombotik ilaç türünün geliştirilmesi zorunludur.

Son yıllarda, tıbbi araştırmalarda hümkik maddeler gibi doğal ürünlerin tıbbi özelliklerine büyük ilgi gösterilmiştir. Farmakolojik özelliklerinden bazıları ve potansiyel etki mekanizmaları

deneylerle ortaya konmuş ve kanı tlanmıştır [19, 20]. Hümkik maddelerle tedavi edilen hastalık yelpazesi, özellikle büyük hastalıklar ve birden fazla hastalık alanlarında, geniş çapta genişlemiştir ve edinilmiş immün yetmezlik sendromu [21] ve kolorektal kanseri [22] kapsamaktadır. Hümkik asit, hayvan ve bitki kalıntıları nın bir dizi karmaşık jeokimyasal reaksiyonla doğal olarak parçalanmasıyla oluşan humus maddesinin bir türüdür. Yüksek miktarda aromatik karbon, fenol ve karbohidrat kalıntıları içeren organik bir asittir. Çalı şmalar, organik asitlerin ve polifenollerin, düşük toksisiteye ve daha az yan etkiye sahip, tromboz tehlikesini önemli ölçüde azaltabilen doğal antitrombotik faktörler olduğunu bulmuştur [23].

Doğal hümkik asit, linyit, yılan pranı ş kömür ve turbadan kimyasal olarak çıkarılan, toksik olmayan, kokusuz, aşı ndı rı cı olmayan ve suda çözünür çok işlevli bir polimer bileşiktir. Antivirüs [24], antitümör [25], anti enflamatuar [26], hemostaz ve yara iyileştirme [27] işlevlerine sahip bir tür Çin bitkisel ilacı olarak sı nı flandı rılan HA, birçok ülkede birden fazla hastalık için bir ilaç olarak uygulanmıştır. binlerce yıldan fazla.

Şimdiye kadar, doğal hümkik asitlerin antitrombotik tedavi için kullanılı p kullanı lamayacağı na dair yayı nlanmı ş bir rapor bulunmamıştır ve HA'nın trombosit aktivasyonu üzerindeki etkisine ilişkin çalışmaları eksiktir. Bu nedenle, şu anda farelerde venöz tromboz oluşumunda doğal hümkik asitlerin etkinliğini ve altta yatan mekanizmayı araştı rdık.

2. Malzemeler ve Yöntemler

2.1. Safılaştırılmış Hümkik Asitlerin Hazı rlanması . Linyit numuneleri Shandong Asia-Pacific Highvarve Organisms Science and Technology Co., Ltd.'den temin edilmiştir. Safılaştırılmış hümkik asitlerin hazı rlanma prosesi referans yöntemlere göre gerçekleştirilmiştir [28, 29]. Kı saca linyit numuneleri 65°C'de 2 saat kurutulduktan sonra distile su ile 3 kez yı kandı ve süzüldü. Süzüntü kalı ntı sı , 40 dakika süreyle %25 nitrik asit (katı - sı vı oranı 1:5) ile işlendi ve ardından tekrar filtrelendi. Süzüntü kalı ntı sı alı ndı ve %2.25 NaOH: Na2CO3 = 1:1'lik bir karışı m çözeltisi içinde 55°C'de 60 dakika (katı - sı vı oranı 1:10), her 10 dakikada bir karışı rı larak çözüldü. 4000 rpm'de 25 dakika santrifüj yapı ldı . Kahverengi-siyah numune kalı ntı sı çökelmek için toplanan süpernatana kuvvetli asit ilave edilerek PH 2 ayarlandı . Süzme işleminden sonra numune tortusu 3-5 kez distile su ile yı kandı . Son olarak çökelti, 65°C'de sabit bir ağı rlı ğa kadar kurutuldu ve daha sonra ezildi, kapatı ldı ve ileride kullanı lmak üzere saklandı .

2.2. Venöz Tromboembolizm Fare Modeli. Sekiz haftalık C57BL/6 fareleri, SPF Biotechnology Co., Ltd'den (Pekin) satı n alı ndı . Tüm fareler kontrollü koşullar altında (22°C, 12/12 saat aydı nlı k-karanlı k döngüsü) büyütüldü ve yeterli su ve yemle beslendi. Tedavi görmeden önce, hayvanlar en az üç günlük ayarlanabilir beslemeden sonra rastgele üç gruba dağı tı ldı : sahte operasyon grubu (n = 7), VTE grubu (n = 8) ve VTE + HA grubu

(n = 10). Ön deneyimize göre, sahte operasyon, VTE ve VTE + HA grupları nda ölüm oranları sırasıyla %16.7, %28.6 ve %40; buna göre her grupta 7, 8 ve 10 fare toplandı. Şam ameliyat grubu ve VTE grubuna herhangi bir ilaç tedavisi verilmedi. Doğal hüyük asitler VTE+HA grubunun içme suları na 40 gün süreyle eklendi (600 mg ekstrakt 1 L içme suyunda eritildi ve tamamen eriyene kadar titreştirildi). Tedavinin uygulanması ndan sonra bir VTE modeli oluşturulmuştur.

Farelere intraperitoneal sodyum pentobarbital (%1, 50 mg/kg) enjeksiyonu ile anestezi uygulandı ve sırtüstü pozisyonda sabitlendi. On, ameliyat bölgesinin ameliyat öncesi cilt sterilizasyonuna başladı. Daha sonra linea alba boyunca karın açıldı. Inferior vena cava (IVC) aortadan hafifçe ayrıldı ve ardından sol renal venin altından bir ayırıcı (30 gauge iğne) üzerinden 7-0 polipropilen sütür ile bağlandı. Daha sonra endoteli bozmadan stenozun %90'ını şekillendirecek şekilde spacer debride edildi. Görünen tüm yan dallar tamamen bağlandı. Son olarak barsak tekrar cavum abdominise yerleştirildi ve periton ve cilt 6-0 dikişlerle dikildi. Bağlamadan 48 saat sonra farelerin karın boşluğunu yeniden açtı, kan damarını bağlama çizgisinin 2 cm altına klempledik ve lumenleri açtıktan sonra trombüs çıkarıldı. Sahte operasyon grubundaki farelerde benzer bir prosedür, ancak IVC ligasyonu gerçekleştirilmedi.

2.3. Histoloji, İmmünohistokimyasal Boyama ve İmmünofloresans. Buradaki metodoloji yayınlanmış literatüre atıfta bulunur [30]. Trombüs ve çevredeki damar duvarlarını içeren dokular feda edildikten sonra çıkarıldı ve %4 formaldehit içinde sabitlendi, bir etanol konsantrasyon gradyanı yoluyla kurutuldu, ksilen içinde şeffaf ve parafna gömüldü. Modelleme sonrası 2. günde hasat edilen kalay doku kesitleri (5 um kalınlığında) hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskobu altında gözlemlendi. İmmünohistokimyasal boyama için, sitrat tamponunda (Beyotime, P0081) mikrodalga işlemi ile antijen geri kazanımı ndan sonra, kesitler, 4°C'de kübasyonda anti-CD41'den (Abcam, ab134131) önce %5 sıvı serum albümini (BioFroxx, 4240GR005) ile bloke edildi bir gecede. Ardından, keçi anti-sığan IgG sekonder antikor (ZGGBT, ZB-2301) 1 saat oda sıcaklığında (RT) uygulandı, ardından leke kesitlerini görselleştirmek için diaminobenzidin substratı kullanıldı.

Görüntüde kahverengi lekelerin varlığı pozitif lekelenme gösterdi. CD62P (Proteintech, 60332) ve CD41'e karşı antikorlar, immünofloresan çift boyama için kullanıldı. Slaytlar, Dylight 488-konjuge keçi anti-sığan IgG sekonder antikorları (Abbkine, A23220) veya Dylight 594-konjuge keçi anti-fare IgG sekonder antikorları (Abbkine, A23410) ile inkübe edildi. Optik mikroskopta x400 büyütme altında görüntülemek için 5 ila 8 rastgele tekrarlanmayan alan seçildi.

2.4. Fare Plateletlerinin İzolasyonu. [31] referansı na göre, farelerden alınan tam kan, sodyum sitrat içeren antikoagülasyon tüplerinde toplandı. Trombositler zengin plazma (PRP)

800 rpm'de 10 dakika oda sıcaklığında santrifüj edilerek elde edildi ve trombositler 2300 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek PRP'den ayrıldı. Süpernatant, sonraki kullanımları için trombosit açısı ndan zengin plazma olarak toplandı. On trombosit, trombosit konsantrasyonu 5×10^8 mL'ye ayarlanarak uygun bir Tyrode tampon hacminde yeniden süspansiyon edildi.

2.5. Akış Sitometrisi. Endotelden türetilen eksozomların (EMP) yüzeyindeki protein disülfid izomeraz (PDI) içeriği, APC-CD144 ve FITC-PDI çift renkli akış sitometrisi (FCM) aracılığıyla belirlendi. APC CD144, endotelial hücrelerden türetilen eksozomlar olarak etiketlenir ve EMP+ PDI+, endotelial hücrelerden türetilen eksozomlar tarafından taşınan PDI'yi temsil eder. Kıvılcak, 10 µL plazma, 3 µL anti-fare APC-CD144 bir tıbbi (eBioscience, 17-1441-82) ve 3 µL anti-fare FITC-PDI antikor (Santa Cruz, 74551) ile birlikte bir BD tüpüne konuldu; daha sonra toplam 100 uL hacim elde etmek için 84 uL fosfat tamponlu salinler (PBS) eklendi. Antikorlar ve numuneler oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi ve ışık korundu. Son olarak 200 µL %4 paraformaldehit eklendi. Numuneler karıştırıldı ve doğrudan FCM analiziyle (BD, FACSArial, ABD) test edildi.

GPIIb/IIIa'nın trombosit yüzeyinde ekspresyon seviyesini test etmek için 20 µL trombosit süspansiyonu (5×10^8 mL) ile birlikte 3 µL FITC-CD41 (Biolegend, 133903), 3 µL PE-CD62p (Biolegend, 148306) ve 2 µL APC-CD61 (Biolegend, 104316), bir BD tüpüne PBS bazlı 100 µL'lik bir sisteme yerleştirildi. On, numune ve antikor karışımı, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle karanlıkta kübe edildi. Son olarak, karıştırılmadan önce trombositleri sabitlemek için 200 uL %4 paraformaldehit eklendi ve numuneler doğrudan FCM analizi (BD, FACS Calibre, ABD) ile test edildi.

2.6. Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi (ELISA). Farelerin apikal kanı pıhtılaşma önleyici tüplere alındı ve 3000 rpm'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edilerek plazma elde edildi. Her bir fare grubunun plazması ndaki çözünür P-selektin seviyeleri, bir Mouse P-Selectin ELISA Kiti (Abcam, Ab200014) ile belirlendi. Plazma numunelerinde von Willebrand faktörünün (vWF) kantitatif tespiti, bir Fare vWF ELISA Kiti (LifeSpan Bioscience, LS-F22891) ile yapıldı. Tüm operasyon kesinlikle kit talimatları ndaki prosedürler izlenerek uygulandı.

2.7. İstatistiksel analiz. Tüm deneysel veriler, ortalama \pm SEM olarak ifade edildi. İstatistiksel veriler SPSS versiyon 26 yazılımında bağimsız örneklem t-testi veya tek yönlü ANOVA kullanılarak işlendi ve istatistiksel grafikler GraphPad Prism 6.0 kullanılarak sunuldu. $P < 0.05$ olduğunda istatistiksel anlamlılık kabul edildi.

3. Sonuçlar

3.1. Trombinin uzunluğu. Modellemeden 2 gün sonra farelerin hayatta kalma durumu ve inferior vena kava trombozu Tablo 1'de gösterilmektedir. VTE grubunda tromboz bulundu

Tablo 1: Ameliyattan 2 gün sonra farelerin hayatta kalma durumu.

Grup adı	Toplam Ölüm	VTE oluşum oranı (%)	VTE
Kontrol	7	0	0
VTE	8	1	6
VTE + HA	10	1	3

ve VTE + HA grubunda, ancak sham operasyon grubunda trombüs bulunmaması, fow restriksiyon modeli cerrahi yönteminin başarılı bir şekilde modellenebileceğini kanıtlamaktadır (Şekil 1(a)). Ayrıca, VTE + HA grubunun trombüs uzunluğu, VTE grubuna göre anlamlı olarak daha kısaydı ($P = 0.040$, Tablo 2, Şekil 1(b)).

3.2. Tromboliz ve Rekanalizasyon. Hümik asitlerle muameleden iki gün sonra, trombüsün trombolizini ve rekanalizasyonunu değerlendirmek için trombüs HE boyamasına toplandı. Sham operasyon grubunda tromboz olmadığı için sadece VTE grubu ile VTE + HA grubunun HE boyama sonuçlarını karşılaştırdık. Trombüs ile venöz duvar arasındaki mesafe açısı arasında iki grup arasındaki farkı gösteren istatistiksel olarak anlamlı kanıt yoktu ($P > 0.05$, Şekil 1(c) ve 1(d)).

3.3. VTE'de Endotelten Kaynaklanan Eksozomlarda PDI Ekspresyonu Hümik Asitler Tarafından Azaltılır. Endotelten türetilen eksozomların yüzeyinde PDI varlığı, CD144-APC ve PDI-FITC'nin dikromatik bir FCM'si aracılığıyla tespit edildi. PDI pozitif ve CD144 pozitif eksozom seviyesi, sahte operasyon grubunun aksine VTE grubunda önemli ölçüde arttı ($P = 0.008$, Şekil 2(a) ve 2(c)) ve PDI'de önemli bir azalma gözlemlendi. VTE + HA grubundaki endotel hücrelerinden elde edilen eksozomlar, VTE grubundan daha fazladır ($P = 0.012$, Şekiller 2(a) ve 2(c)). Plazmada endotel kaynaklı eksozomun yüzeyindeki PDI içeriği, sahte operasyon grubuna kıyasla VTE + HA grubunda azalırken, fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P > 0.05$, Şekil 2(a) ve 2(c)).

3.4. Aktive Trombositlerin Yüzeyinde GPIIb/IIIa'nın Ekspresyonu Hümik Asitlerle Aşağı Düzenlenir. Plazmada aktive edilmiş trombosit yüzeyinde GPIIb/IIIa ifadesi, CD41-FITC ve CD62-PE'nin dikromatik FCM'si ile test edildi. CD62P, trombosit aktivasyonunun bir belirteçidir. Plazmada aktive edilmiş trombosit yüzeyi GPIIb/IIIa ifadesinin VTE + HA grubunda VTE grubuna kıyasla belirgin şekilde azaldığı bulundu ($P = 0.006$, Şekil 2(b) ve 2(d)) VTE grubunda sham operasyon grubundan önemli ölçüde daha yüksek ($P < 0.009$, Şekil 2(b) ve 2(d)). Ayrıca VTE + HA grubu ile sham ameliyat grubu arasında plazmada aktive edilmiş trombositlerin yüzeyindeki GPIIb/IIIa ekspresyonunda anlamlı bir fark yoktu ($P > 0.05$, Şekil 2(b) ve 2(d)).

Ayrıca VTE grubu ve VTE+HA grubundaki farelerin damarlarından çıkarılan trombüs, immünohistokimya ve immünofloresansa tabi tutuldu.

siyası olarak trombüste toplam GPIIb/IIIa düzeyini ve trombüste aktive edilmiş trombosit yüzeyindeki GPIIb/IIIa ekspresyonunu ölçmek için uygulandı. Her iki histopatolojik test de aynı eğilimi gösterdi; yani, ister trombüste ister trombüste aktive edilmiş trombositlerin yüzeyinde GPIIb/IIIa'nın ekspresyon düzeyi, VTE grubu ile karşılaştırıldı. Ayrıca VTE + HA grubunda önemli ölçüde daha düşüktü ($PIHC < 0,001$, $PIF = 0,002$, Şekil 3(a)-3(c)).

3.5. Plazma Pıhtılaşma Faktörü Hümik Asitlerden Etkilenir. Plazma P-selektin ve vWF konsantrasyonları, doğal hümik asitlerin pıhtılaşma üzerindeki etkisini belirlemek için ELISA ile ölçüldü. VTE + HA grubunun P-selektini, VTE grubuyla karşılaştırıldı. Ayrıca önemli ölçüde azaldı ($P < 0.001$, Şekil 4(a)). Bununla birlikte, VTE grubundaki plazmatik P-selektin konsantrasyonu, sahte operasyon grubundan önemli ölçüde yüksek değildi ($P > 0.05$, Şekil 4(a)). Üç grup arasında plazmatik vWF konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P > 0.05$, Şekil 4(b)).

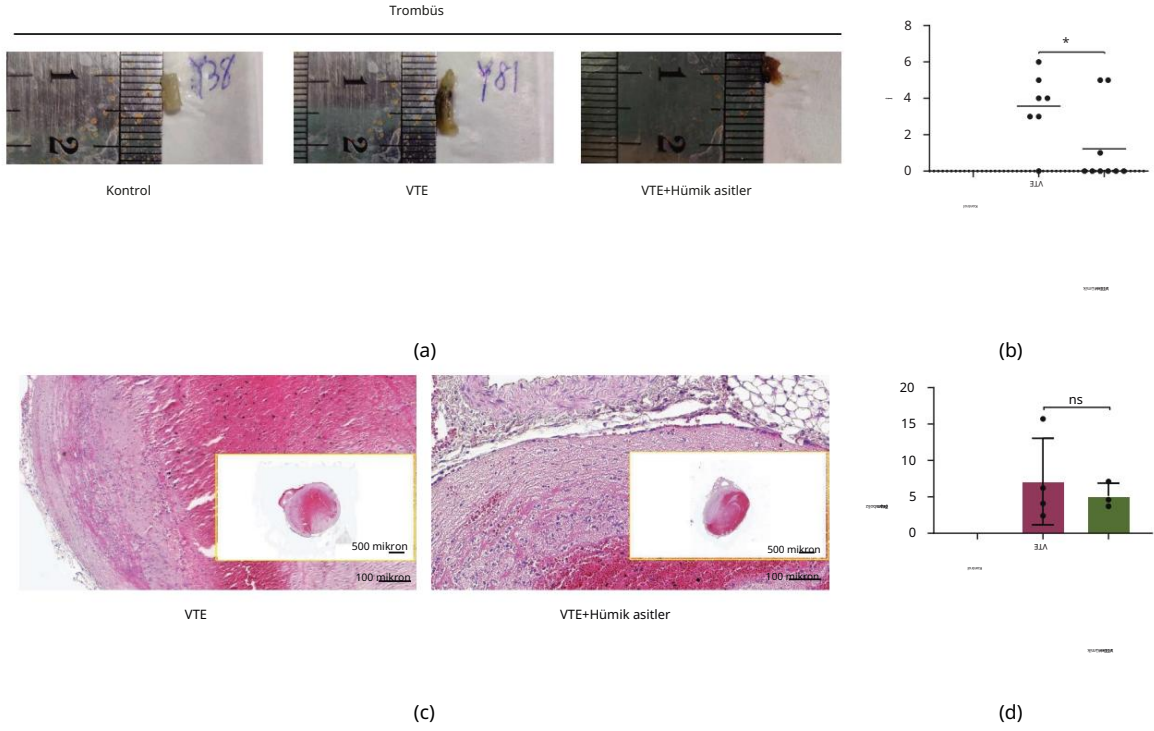
4. Tartışma

Buradaki bulgularımız, doğal hümik asitlerin VTE üzerindeki terapötik potansiyelini göstermektedir. Kuşkusuz, trombosit aktivasyonunun kesin ortak segmenti GPIIb/IIIa'dır. GPIIb/IIIa aktive edildiğinde fibrinojene bağlanabilir ve fibrinogen yoluyla koşu trombositlere bağlanabilir, trombositlerin kümelenmesine ve erken tromboz oluşumuna neden olur. VTE grubundaki aktive edilmiş trombositlerde GPIIb/IIIa'nın önemli ölçüde artan ekspresyonu, trombositlerin VTE durumunda aktive edildiğini ve venöz trombozda önemli bir işlev gerçekleştirdiğini gösterir. Ayrıca, doğal hümik asitlerin trombüs yeniden kanalizasyonundan ziyade trombüs oluşumu üzerinde inhibitör bir etki yaptıkları kanıtlanmıştır ve böyle bir etki kısmen trombosit aktivasyonuna bağlı EMP-PDI ve GPIIb/IIIa sinyal yolunu inhibe ederek elde edilmiştir.

Plazmadaki P-selektin konsantrasyonu HA tarafından önemli ölçüde azaltılmıştır, bu da doğal hümik asitlerin trombosit aktivasyonunu kısmen telafi etmesine sahip olduğunu teyit etmektedir.

Virchow tarafından önerilen klasik bakış açısı, kan akış hızındaki değişikliklerin, kan bileşimindeki değişikliklerin ve damar duvarı hasarını VTE'yi tetikleyen üç ana unsur olduğuna inanmaktadır. Endotel hücrelerinin hasar görmesi ve aktivasyonu, trombüs oluşumunu teşvik eder ve trombüs oluşumunun ilk bağlantısı önemli ölçüde etkiler. Venöz intimanın yaralanması, trombin, ADP ve diğer prokoagülan maddelerin salınması aktive eder ve aynı zamanda kan damarındaki doku faktörleri yoluyla mikropartiküllerin salınmasını destekler. P-selektin glikoprotein ligandı 1, P-selektinin kendi spesifik reseptörlerine bağlanmasıyla indükler [32, 33]. Öte yandan, mikropartiküller, P-selektin ile bağlanarak trombositlerin ve endotel hücrelerinin yüzeyini kolonize etmek, trombosit agregasyonunu aktive etmek ve lokal lif birikimini ve trombüs oluşumunu ve gelişimini desteklemek için doku faktörünü (TF) taşırlar.

GPIIb/IIIa, trombosit agregasyonu için son yol olarak hareket eder ve trombozda etkili bir role sahiptir. Öncesi

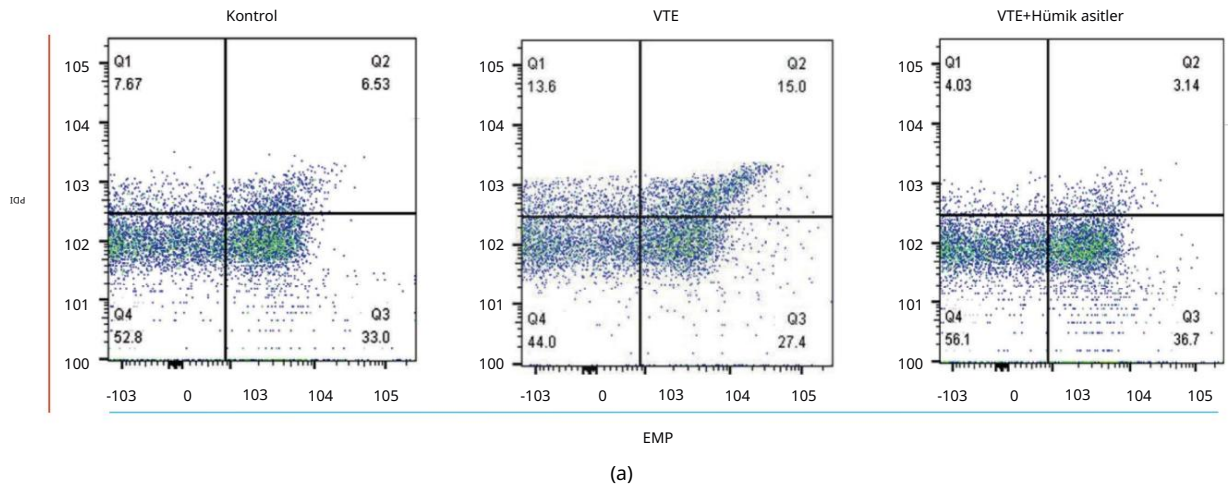


Şekil 1: Trombüsün uzunluğu ve çözünmesi. (a) Trombüsün resmi. (b) Trombüsün uzunluğu. (c) Trombüs çözünmesinin resmi. (d) Tromboliz oranı. İstatistiksel analizler, bağımsız örneklem t-testi kullanılarak yapıldı. Tarih, ortalama \pm SEM'yi temsil eder. $P < 0.05$. HE, hematoxilen eozin boyama. NS, önemi yok.

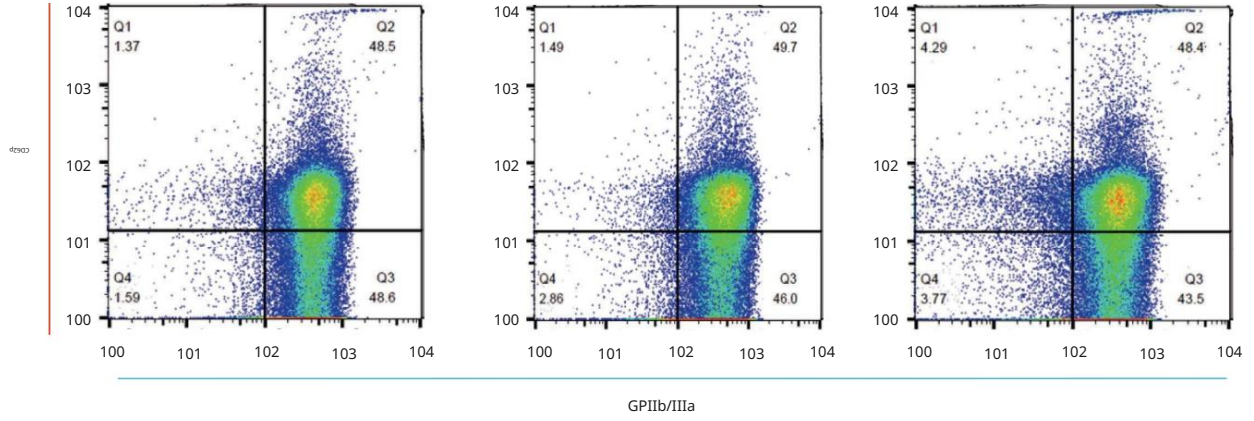
Tablo 2: Her gruptaki trombüsün uzunluğu.

Grup ismi	Uzunluk (cm)
Kontrol	0
VTE	$0,36 \pm 0,190$
VTE + HA	$0,12 \pm 0,217$

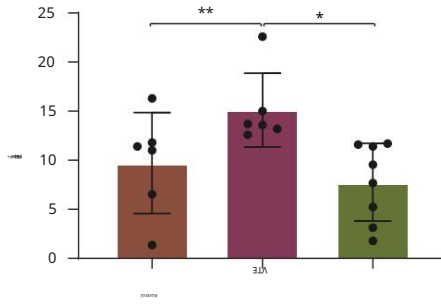
◆ $P < 0.05$ - VTE grubu.



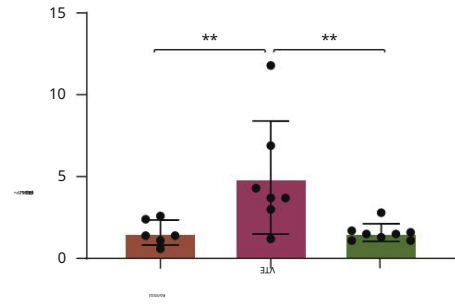
Şekil 2: Devam ediyor.



(b)

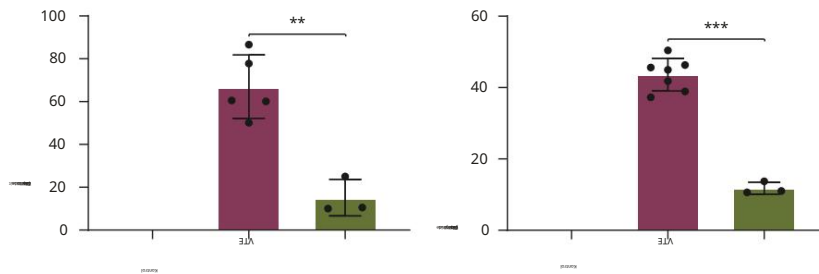


(c)



(d)

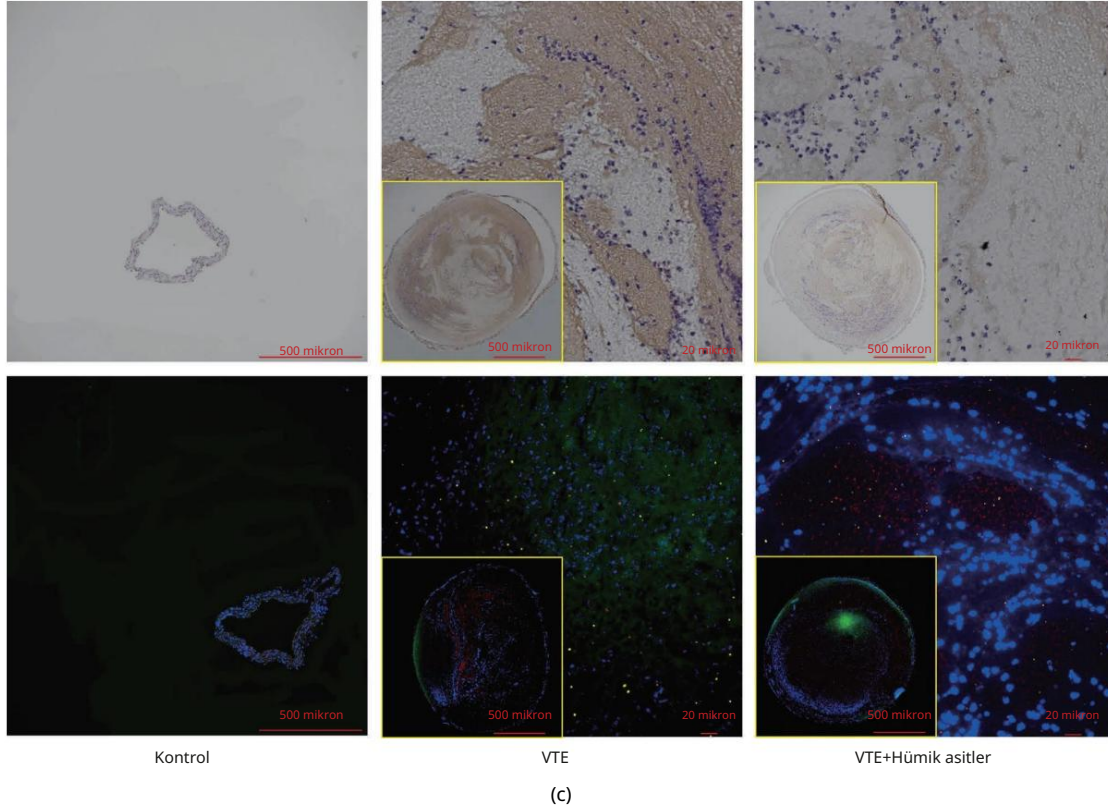
Şekil 2: Endotel türevli eksozomda PDI ifadesi ve aktive edilmiş trombositlerde GPIIb/IIIa ifadesi. (a) CD144-APC ile işaretlenmiş endotel kaynaklı eksozom üzerinde PDI-FITC ifadesinin FCM testi. (b) Farelerde CD41-FITC ve CD62p-PE ile işaretlenmiş trombositin FCM testi. (c) ve (d) FCM deneyi. İstatistiksel analizler, tek yönlü ANOVA kullanılarak yapıldı. Tarih, ortalama \pm SEM'yi temsil eder. $P < 0.05$, $P < 0.01$.



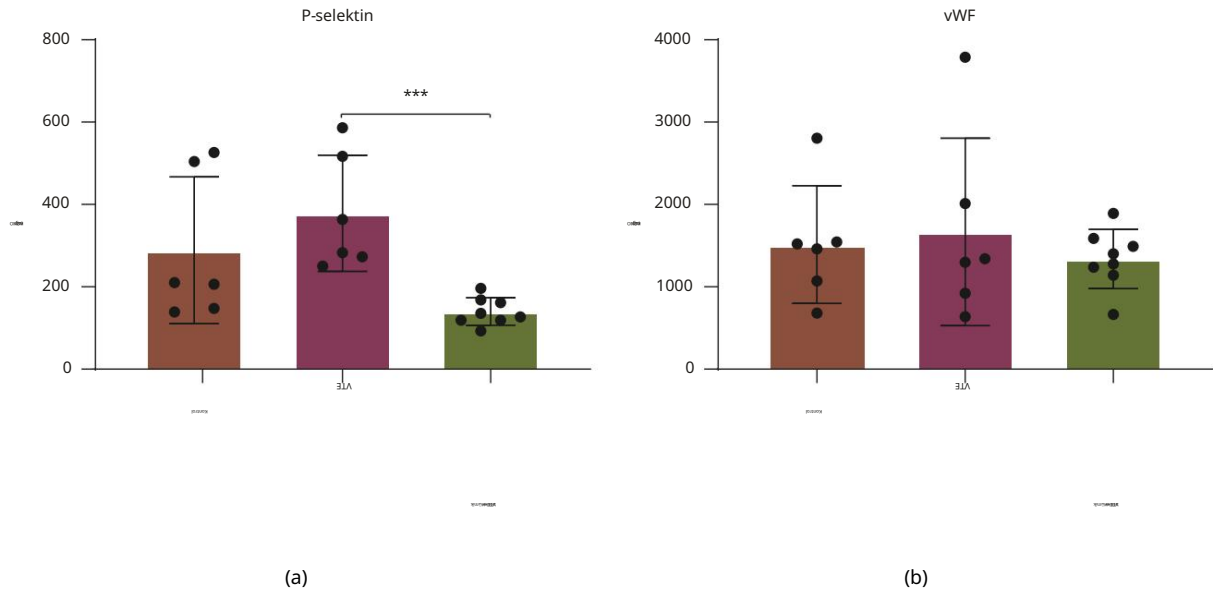
(a)

(b)

Şekil 3: Devam ediyor.



Şekil 3: Trombüste GPIIb/IIIa ifadesi. (a) ve (b) GPIIb/IIIa ekspresyon deneyi. (c) IHC boyaması ile gözlemlenen GPIIb/IIIa ifadesi. IF boyama ile gözlemlenen GPIIb/IIIa ifadesi. İstatistiksel analizler, bağımsız örneklem testi kullanılarak yapıldı. Tarih, ortalama ± SEM'yi temsil eder. $P < 0.01$, $P < 0.001$. IHC, immünohistokimya; IF, immünofloresan.



Şekil 4: Plazmada trombosit aktivasyon indeksi ifadesi. (a) ELISA ile tespit edilen farelerde Plazma P-seçimi seviyesi. (b) ELISA ile tespit edilen farelerde plazma vWF seviyesi. İstatistiksel analizler, tek yönlü ANOVA kullanılarak yapıldı. Tarih, ortalama ± SEM'yi temsil eder. $P < 0.001$. vWF, von Willebrand faktörü.

çalışmalar, trombositlerden ve endotel hücrelerinden türetilen eksozomların PDI taşıdığı doğrulanmıştır [34, 35]. Trombosit yüzeyindeki PDI, GPIIb/IIIa reseptörü disülfür bağlarını izomerizasyonunu düzenleyebilir ve uzamsal değişiklikleri

GPIIb/IIIa reseptörlerinin yapısını, böylece trombositleri aktive eden ve trombozu kolaylaştıran GPIIb/IIIa reseptörünü aktive eder [36]. Vasküler endotel hücreleri hasar gördüğünde, endotel

PDI taşı r. EMP-PDI, trombositlerin yüzeyindeki GPIIb/IIIa reseptörlerine bağlanarak trombositleri aktive eder, PDI taşı yan daha fazla trombosit kaynaklı eksozomları serbest bırakır ve trombosit basamaklı amplifikasyon sinyal iletimini gerçekleştirir.

PDI'nin trombozu düzenlemedeki rolüne dayanarak, insanlar onu yeni bir anti-trombotik hedef olarak görüyorlar. Bununla birlikte, PDI inhibitörleri hala klinik deneylerde ve kanamayla ilişkili terapötik riskler henüz belirlenmemiştir. Çok sayıda Çin bitkisel ilacı nı n antiplatelet aktivitesi ve çoklu etki mekanizmaları son zamanlarda vurgulanmıştır. Geleneksel bir Çin tıbbi olan doğal hümkik asitler, doğal bir antitrombotik faktör olan polifenoller içerir. Nedeniyle bu çalışma şmada dikkatimizi çekmiştir. Bir in vitro deney, polifenollerin trombosit fonksiyonunu modüle edebildiğini ve trombosit aktivasyonu ve agregasyonu ile ilgili birçok yolu baskı layabildiğini göstermiştir [37]. Benzer şekilde, çalışma da doğal hümkik asitlerin trombosit aktivasyonunu inhibe ederek venöz trombus oluşumunu azalttığı nı ve potansiyel mekanizmasını nı n EMP-PDI'yi inhibe ederek aktive edilmiş trombosit yüzeyinde GPIIb/IIIa ekspresyonunu azaltmak olduğunu ortaya koydu.

4.1. Çalışma Sınırlamaları . Şimdiye kadarki çalışma sonuçları mızı n umut verici olduğu kabul edilebilse de, HA'nın klinik güvenliği ve tolere edilebilirliği araştırılmayı beklemektedir. Ayrıca, endotelial hücrelerden türetilen eksozomlar tarafından taşı nan PDI'nin GPIIb/IIIa'nı n yapı sal değişimi üzerindeki etkisini araştırmak için çalışmalar garanti edilir.

5. Sonuçlar

Bir polifenolik bileşik olan HA ile ilgili az sayıda çalışma yapılmamasına rağmen, yayınlanmamış raporlarda tromboz üzerindeki etkisinden bahseden herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışma bazı nda, hümkik asit ilave edilmeyen gruba göre, ilave edilen grupta dikkate değer bir iyileşme ortaya çıkmıştır. Sonuçları mız, HA'nın diyet takviyesinin trombosit aktivasyonunu ve antitrombozu inhibe etmek için önemli bir mod olduğunu göstermektedir. Temel mekanizma, aktif trombosit yüzeyinde GPIIb/IIIa ekspresyonunun endotelial kaynaklı eksozomlar üzerinde bir PDI kırılması ile inhibe edilmesiyle ilgilidir. VTE tedavisi için kullanılabilecek yeni bir antitrombotik yöntem sağlar.

Veri kullanılabilirliği

Bu çalışmanın sonuçları nı destekleyen veriler, makul talep üzerine ilgili yazarlardan temin edilebilir.

Etik Onay

Bu çalışmada gerçekleştirilen tüm deney prosedürleri, Shandong Üniversitesi Qilu Hastanesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır ve Avrupa Parlamentosu'nun bilimsel amaçlarla kullanılan hayvanların korunması na ilişkin 2010/63/EU Direktifi tarafından belirlenen yönergelerle uygundur. .

Kanıta Dayalı Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp

Onay

Tüm katılımcılardan yayın onayı alındı .

İfşa

Hong-Tao Lan ve Ya-Ting Zheng ilk yazarlığı paylaşıyor.

Çıkar çatışmaları

Tüm yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Yazar katkıları

Deneyi ve istatistiksel analizi HL ve YZ yürüttü. Yazı nı n taslağını YZ ve HL yazdı . ZT, hayvan deneyinin yürütülmesine katkıladı . ZT ve CZ, bu araştırmaya fikir verdi ve bazı yapıcı önerilerde bulundu. XC ve ZW projeyi tasarladı ve denetledi. Hong-Tao Lan ve Ya-Ting Zheng bu çalışmaya eşit derecede katkı da bulundular.

teşekkürler

Bu çalışmanın sponsorluğunu Taishan Scholars (No. tsqn202103146), Shandong Üniversitesi Klinik Araştırma Merkezi (No. 2020SDUCRCC027), Çin Ulusal Doğa Bilimleri Vakfı (82070392, 81702194, 81801953) ve Anahtar Araştırma ve Geliştirme Vakfı 'nı n araştırmaya hibeleri üstlenmiştir. Shandong Eyaleti Programı (2019GSF108041).

Tamamlayıcı Malzemeler

Tablo S1: Bu deneyde kullanılan temel kaynaklar. (Ek Tamamlayıcı Malzemeler)

Referanslar

- [1] M. Di Nisio, N. van Es ve HR B"uller, "Deep ven tromboz ve pulmoner embolizm", *Lancet*, cilt. 388, sayı r. 10063, s. 3060-3073, 2016.
- [2] GE Raskob, P. Angchaisuksiri, AN Blanco ve ark. Arteriyoskleroz, Tromboz ve Vasküler Biyoloji, cilt. 34, sayı r. 11, s. 2363-2371, 2014.
- [3] LJJ Scheres, WM Lijfering ve SC Cannegieter, "Venöz trombozun mevcut ve gelecekteki yükü: basitçe öngörülebilir değil," *Res Pract Tromb Haemost*, cilt. 2, sayı r. 2, s. 199-208, 2018.
- [4] JA Heit, "Venöz tromboemboli epidemiyolojisi" *Doğa İncelemeleri Kardiyoloji*, cilt. 12, sayı r. 8, s. 464-474, 2015.
- [5] A. Rabinovich ve SR Kahn, "Post trombotik sendromu nası l tedavi ediyorum" *Blood*, cilt. 131, sayı r. 20, s. 2215-2222, 2018.
- [6] AK Sista ve FA Klok, "Akciğer embolisinin geç sonuçları : PE sonrası sendrom", *Tromboz Araştırması*, cilt. 164, s. 157-162, 2018.
- [7] F. Khan, A. Rahman, M. Carrier ve ark., "İlk sebepsiz antikoagülan tedavinin kesilmesinden sonra uzun vadeli semptomatik tekrarlayan venöz tromboembolizm riski

- venöz tromboembolizm olayı : sistematik inceleme ve meta analiz" BMJ, cilt. 366, Makale Kimliği I4363, 2019.
- [8] J. Yang, X. Zhou, X. Fan ve diğerleri, "mTORC1, farelerde trombosit hacminin yükselmesi ve aktivasyonu yoluyla yaşlanmaya bağlı venöz trombozu teşvik eder", *Blood*, cilt. 128, sayı r. 5, s. 615-624, 2016.
- [9] Z. Elabbadi, F. Adam, E. Berrou ve diğerleri, "Fare trombositlerinin tam aktivasyonu, SERCA3 ATPase'ye bağımlı kalsiyum depoları tarafından düzenlenen ADP salgılanmasını gerektirir" *Blood*, cilt. 128, sayı r. 8, s. 1129-1138, 2016.
- [10] K. Stark, V. Philipp, S. Stockhausen ve ark., "Trombositlerden elde edilen disülfid HMGb1, farelerde venöz trombozu koordine eder," *Blood*, vol. 128, sayı r. 20, s. 2435-2449, 2016.
- [11] C. Kearon, EA Akl, J. Ornelas ve diğerleri, "VTE hastalığı için antitrombotik tedavi: CHEST kılavuzu ve uzman paneli raporu", *Chest*, cilt. 149, sayı r. 2, s. 315-352, 2016.
- [12] O. Madridano, J. del Toro, A. Lorenzo ve diğerleri, *J Vasc Surg Venöz Lenf Bozukluğu*, cilt. 3, sayı r. 2, s. 135-141.e1, 2015.
- [13] C. Lind, LE Flinterman, KF Enga ve ark., "İnvention venöz tromboembolizmin arteriyel trombotik hastalık riski üzerindeki etkisi", *Dolaşım*, cilt. 129, sayı r. 8, s. 855-863, 2014.
- [14] LM Reich, AR Folsom, NS Key ve ark., "Venöz tromboembolizm için bir risk faktörü olarak subklinik aterosklerozun prospektif çalışması", *Journal of Trombosis and Hemostasis*, cilt. 4, sayı r. 9, s. 1909-1913, 2006.
- [15] A. Brill, TA Fuchs, AK Chauhan ve diğerleri, "von Willebrand faktörü aracılı trombosit adezyonu, fare modellerinde derin ven trombozu için kritiktir" *Blood*, cilt. 117, sayı r. 4, s. 1400-1407, 2011.
- [16] M. Heestermans, S. Salloum-Asfar, T. Streef ve ark., "Antikoagülanların susturulması üzerine fare venöz trombozu, FXII veya nötrofillere değil, doku faktörüne ve trombositlere bağlıdır", *Blood*, cilt. 133, sayı r. 19, s. 101-1 2090-2099,
- [17] M. Panova-Noeva, B. Wagner, M. Nagler ve diğerleri, "Kapsamlı trombosit fenotipleme, trombositlerin akut venöz tromboembolizm patogenezi üzerindeki rolünü destekler - klinik gözlem çalışmaları ndan elde edilen sonuçları", *EBioMedicine*, vol. 60, Makale Kimliği 102978, 2020.
- [18] JD Douketis, "Te 2016 American College of Chest Physicians for venous tromboembolizm tedavi yönergeleri: bir gözden geçirme ve kritik değerlendirme," *Intern Emerg Med*, vol. 11, sayı r. 8, s. 1031-1035, 2016.
- [19] MV Belousov, RR Akhmedzhanov, MV Zykova, AM Gur'ev ve MS Yusubov, "Tomsk bölgesinin ova turbası ndan izole edilen doğal hüyük asitlerin hepatoprotektif özellikleri", *Farmasötik Kimya Dergisi*, cilt. 48, sayı r. 4, s. 249-252, 2014.
- [20] NG Smirnova, SG Chefu, AL Kovalenko ve TD Vlasov, *Eksperimental'naya I Kilnicheskaya Farm akologiya*, cilt. 73, sayı r. 9, s. 24-27, 2010.
- [21] ME Botes, J. Dekker ve C. van Rensburg, "HIV ile enfekte hastalarda oral oksihumat ile Faz I denemesi", *Drug Development Research*, cilt. 57, sayı r. 1, s. 34-39, 2002.
- [22] WS Huang, JT Yang, CC Lu ve diğerleri, "Fulvik asit, HCT-116 kolorektal kanser hücrelerinin resistin ile indüklenen adezyonunu zayıflatır endotelial hücrelere," *International Journal of Molecular Sciences*, cilt. 16, sayı r. 12, s. 29370-29382, 2015.
- [23] C. Chen, FQ Yang, Q. Zhang, FQ Wang, YJ Hu ve ZN Xia, "Antitromboz için doğal ürünler", *Kanı ta dayalı Tamamlayıcı ve Alternatif Tıp*, cilt. 2015, Makale Kimliği 876426, 17 sayfa, 2015.
- [24] R. Klocking ve M. Sprossig, "Hüyük asitlerin antiviral özellikleri", *Experientia*, cilt. 28, sayı r. 5, s. 607-608, 1972.
- [25] M. Hou, R. Yang, L. Zhang ve diğerleri, "Lokalize ışıkla çalıştırılan fototermal ablasyon ve kanser kemoterapisi için enjekte edilebilir ve doğal hüyük asit/agaroz hibrit hidrojel", *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 4, sayı r. 12, s. 4266-4277, 2018.
- [26] GK Joo ve CE van Rensburg, "Potasyum humatın anti-enflamatuar özelliklerinin in vitro araştırılması", *Inflammation*, cilt. 28, sayı r. 3, s. 169-174,
- [27] Y. Ji, A. Zhang, X. Chen, X. Che, K. Zhou ve Z. Wang, "Sodyum humat, farelerde TGF- β /Smads sinyal yolunu aktive ederek kutanöz yara iyileşmesini hızlandırır", *Açta Pharmaceutica Sinica B*, cilt. 6, sayı r. 2, s. 132-140, 2016.
- [28] H. Martyniuk ve J. Wieckowska, "Metal iyonlarının linyit kömürlerinden çıkarılan hüyük asitler üzerinde adsorpsiyonu", *Fuel Processing Technology*, cilt. 84, sayı r. 1-3, s. 23-36, 2003.
- [29] L. Doslak, J. Burdikova-Szewieczkova, V. Enev, L. Kalina ve J. Wasserbauer, "Bazı Avrupa linyitlerinden izole edilen hüyük asitlerin spektral karakterizasyonu ve karşılaştırılması", *Yakıt*, hacim 213, s. 123-132, 2018.
- [30] Y. Meng, Q. Yin, Q. Ma ve diğerleri, "FXII, farelerde PI3K/AKT sinyal yolu yoluyla derin ven trombozu oluşumunu düzenler", *International Journal of Molecular Medicine*, cilt. 47, sayı r. 5, 87 sayfa, 2021.
- [31] RR Qin, H. Zhu, F. Wang ve diğerleri, "Diyabetik fare modellerinde trombosit aktivasyonu: vasküler endotel hücrelerinin rolü türetilmiş protein disülfid izomeraz aracılı GP IIB/IIIa reseptör aktivasyonu," *Aging (Albany NY)*, cilt. 11, sayı r. 16, s. 6358-6370, 2019.
- [32] I. Hrachovinová, B. Cambien, A. Hafezi-Moghadam ve diğerleri, "P-selektin ve PSLG-1'in etkileşimi, hemofili A'nın bir fare modelinde hemostazı düzelten mikropartiküller üretir" *Nature Medicine*, cilt 9, sayı r. 8, s. 1020-1025, 2003.
- [33] O. Morel, N. Morel, JM Freyssinet ve F. Toti, "Platelet mikropartikülleri ve vasküler hücre etkileşimleri: hemostatik ve trombotik tepkiler arasında bir kontrol noktası", *Plateletler*, cilt. 19, sayı r. 1, s. 9-23, 2008.
- [34] LM Holbrook, P. Sasikumar, RG Stanley, AD Simmonds, AB Bicknell ve JM Gibbins, "Te trombosit-yüzey tiol izomeraz enzimi ERp57, trombosit fonksiyonunu modüle eder" *Tromboz ve Hemostaz Dergisi*, cilt. 10, sayı r. 2, s. 278-288, 2012.
- [35] A. Raturi, S. Miersch, JW Hudson ve B. Mutus, "Platelet mikropartikül ile ilişkili protein disülfid izomeraz, trombosit agregasyonunu teşvik eder ve insülini etkisiz hale getirir", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, cilt. 1778, sayı r. 12, s. Rev. 2790-2796.
- [36] SJ Shattil, C. Kim ve MH Ginsberg, "İntegrin aktivasyonunun son adımları : oyun sonu," *Nature Review Molecular Cell Biology*, cilt. 11, sayı r. 4, s. 288-300, 2010.
- [37] D. Rein, TG Paglieroni, DA Pearson ve diğerleri, "Kakao ve şarap polifenollerinin trombosit aktivasyonunu ve işlevini modüle eder" *Beslenme Dergisi*, cilt. 130, sayı r. 8, Makale Kimliği 21205, 65 sayfaları, 2000.