



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNTRASELLÜLER ANJİYOTENSİN II'NİN DİYABETİK SIÇAN VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRE PROLİFERASYONUNA ETKİSİ

Dr. Zehra ÇİÇEK

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşe DOĞAN**

ADANA-2018



T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNTRASELLÜLER ANJİYOTENSİN II'NİN DİYABETİK SIÇAN VASKÜLER DÜZ KAS HÜCRE PROLİFERASYONUNA ETKİSİ

Dr. Zehra ÇİÇEK

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ayşe DOĞAN**

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından TTU-2017-8071 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2018

TEŞEKKÜR

Tez sürecinin her aşamasında bana özveriyle yardımcı olan bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Ayşe DOĞAN'a ve Doç. Dr. Kübra AKILLIOĞLU'na, ayrıca bu çalışma için bana laboratuvarlarını açan Prof. Dr. Nurten DİKMEN'e ve Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN'a,

Tez sürecinde yardımlarını ve katkılarını esirgemeyen Prof. Dr. Suzan ZORLUDEMİR, Prof. Dr. Z. Nazan ALPARSLAN, Doç. Dr. Arbil AÇIKALIN, Doç. Dr. Ayper BOĞA PEKMEZEKMEK, Araş. Gör. Zehra Gül YAŞAR, Dr. Özgür GÜNAŞTI ve Araş. Gör. Dr. Osman SAĞLAM'a,

Fizyoloji Anabilim Dalı'nda göreve başladığımız ilk günden itibaren bizleri motive eden, desteğini esirgemeyen ve ufkumuzu açan değerli Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşe DOĞAN başta olmak üzere Prof. Dr. Sanlı Sadi KURDAK, Prof. Dr. Şeref ERDOĞAN, Doç. Dr. Kerem Tuncay ÖZGÜNEN, Doç. Dr. Besim ÖZAYKAN, Doç. Dr. Ayper BOĞA PEKMEZEKMEK, Doç. Dr. Kübra AKILLIOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Çiğdem ÖZDEMİR'e,

Bana sonsuz sabır gösteren, destek veren, sevgi ve şefkatini esirgemeyen aileme özellikle canım anneme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Zehra ÇİÇEK

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
TABLolar LİSTESİ	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vi
KISALTMALAR	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Sistemik Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS)	3
2.1.1. RAS Bileşenleri	5
2.1.1.1. Anjiyotensinojen	5
2.1.1.2. Renin	5
2.1.1.3. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE)	7
2.1.1.4. Anjiyotensin II	7
2.1.1.5. Anjiyotensin II Reseptörleri ve Vasküler Etkileri	8
2.1.2. Anjiyotensin II Reseptör Blokerleri (ARB)	9
2.1.3. Anjiyotensin II'nin Vasküler Etkileri	11
2.2. Lokal Renin Anjiyotensin Sistemi	14
2.3. Diyabetes Mellitus (DM)	17
2.3.1. Tanımı ve Önemi	17
2.3.2. Diyabetes Mellitus'un Vasküler Etkileri	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1. Çalışmada Kullanılan Solüsyon, Kimyasal ve Kitler	25
3.1.1. Enzim Ayırışma Solüsyonunun Hazırlanması (EAS)	28
3.1.2. Transfer Medyumunun Hazırlanması	29
3.1.3. Hücre Medyumunun Hazırlanması	29
3.2. Deneysel Diyabetik Modelin Oluşturulması	29
3.2.1. Kan Glukoz Değerlerinin Ölçümü	30

3.3. Vasküler Düz Kas	31
3.3.1. Düz Kasın Elde Edilmesi	31
3.3.2. Düz Kas Hücre Kültürü.....	32
3.3.3. Hücre Pasajlanması ve Tripsinizasyon.....	34
3.4. VDKH'lerin Boyanması.....	35
3.5. MTT Yöntemi	35
3.6. Hücre ve Medyum Ekstraktının Hazırlanması:.....	38
3.7. Lowry Yöntemi	40
3.8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELİSA) Yöntemi	41
3.8.1. Kitin İçinde Bulunan Solüsyonlar	42
3.8.2. Standartların Hazırlanması.....	43
3.8.3. Deneyin Yapılışı.....	44
3.8.4. Hesaplamalar ve Standart Eğri.....	45
3.9. İstatistiksel Analiz.....	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. Kan Şekeri ve İdrar Değerleri	46
4.2. VDKH'lerin Boyanması.....	49
4.3. VDKHK'de Proliferasyonun Değerlendirilmesi.....	50
4.3.1. Normal VDKHK'de 24 Saatlik Anjiyotensin II'nin Proliferasyona Etkisi .	50
4.3.2. Normal VDKHK'de Anjiyotensin II'nin 48 Saatlik Proliferasyona Etkisi .	51
4.3.3. Normal VDKHK'de Ang II, Olmesartan ve PD123,319'un Proliferasyona Etkisi	52
4.3.4. Diyabetik VDKHK'de Anjiyotensin II'nin Proliferasyona Etkisi	53
4.3.5. Diyabetik VDKHK'de Ang II, Olmesartan ve PD123,319'un Proliferasyona Etkisi	54
4.3.6. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK'de Anjiyotensin II'nin Proliferasyona Etkisi	55
4.3.7. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK'de Ang II, Olmesartan ve PD123,319'un Proliferasyona Etkisi	56
4.4. Total Protein Miktarı.....	57
4.5. ELİSA ile Ang II Düzeyi Ölçümü	58
4.5.1. ELİSA ile Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi Ölçümü	58
4.5.1.1. Normal VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi	59

4.5.1.2. Diyabetik VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi	60
4.5.1.3. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi.....	62
4.5.2. ELİSA ile Hücre Medyumunda Ang II Düzeyi Ölçümü	63
4.5.2.1. Normal VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi.....	64
4.5.2.2. Diyabetik VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi	65
4.5.2.3. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi 67	
5. TARTIŞMA	69
5.1. VDKH'lerin İHK ile Boyanması	69
5.2. Normal, Diyabetik ve Yüksek Glukoz Uygulanan VDKH'de Proliferasyon	70
5.3. Normal, Diyabetik ve Yüksek Glukoz Uygulanan VDKH'de ve Medyumunda Ang II Düzeyi	75
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	78
6.1. Sonuçlar.....	78
6.2. Öneriler	79
KAYNAKLAR	80
EKLER	88
Ekler 1: Etik Kurul Onayı	88
ÖZGEÇMİŞ	89

TABLÖLAR LİSTESİ

<u>Tablo No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1. Ang II'nin Vasküler Doku Üzerine Fizyolojik ve Fizyopatolojik Etkileri.....	14
Tablo 2. Deney Grupları.	24
Tablo 3. Enzim Ayırışma Solüsyonu Hazırlanması.	28
Tablo 4. Kan Şekeri ve Vücut Ağırlığı Ölçümü.....	47
Tablo 5. Kontrol ve Diyabetik Hayvanın İdrar Değerleri.	48
Tablo 6. Total Protein Miktarı.....	58
Tablo 7. Normal VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi.	59
Tablo 8. Diyabetik VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi.....	61
Tablo 9. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi.	62
Tablo 10. Normal VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi.	64
Tablo 11. Diyabetik VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi.	66
Tablo 12. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi.....	67

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil No:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1. Sistemik Renin Anjiyotensin Sistemi.	4
Şekil 2. RAS İnhibitörleri	11
Şekil 3. Vasküler Dokuda İntrasellüler RAS.	16
Şekil 4. Diyabetes Mellitus'un Vasküler Dokuda Fizyopatolojik Etki Mekanizmaları.	20
Şekil 5. Hayvan Bakım Odası ve Kafesler.	23
Şekil 6. Deney Akış Şeması	25
Şekil 7. Kimyasallar ve Solüsyonlar.	27
Şekil 8. Diyabetik Modelin Oluşturulması, a) Lateral Kuyruk Veni, b) Streptozotosinin Kuyruk Veninden Uygulanması.	30
Şekil 9. Deney Hayvanları, a) Sağlıklı Sıçan, b) Diyabetik Sıçan.	30
Şekil 10. Diyabetik Hayvan, a) Hayvanın Tutacağa Yerleştirilmesi, b) Glukometre İle Kan Şekerinin Ölçümü, c) Normal Sıçan Kan Şekeri, d) Diyabetik Sıçan Kan Şekeri.	31
Şekil 11. Aorta'nın İzolasyonu, a) Karnın Orta Hattan Kesilmesi, b) Torasik Aortanın İzolasyonu, c) Aortanın Kesilmesi, d) Damarın Ucunun Pensetle Tutulması, e) Damar İçinin Solüsyonla Temizlenmesi, f) İzole Edilmiş Aorta.	32
Şekil 12. Düz Kas İzolasyonu, a) Adventisya Tabakasının Bistüriyle Temizlenmesi, b) Aortanın Mikrocerrahi Makasla Kesilmesi, c) Aortanın İğneler Yardımıyla İç Yüzünden Gerilmiş Hali, d) İzole Edilen Media Tabakası.	33
Şekil 13. Enzim Ayrışma Aşaması, a) İzole Düz Kas Tabakası, b) Düz Kas Tabakasının 1-2 mm'lik Parçalara Ayrılmış Hali.	34
Şekil 14. Kültür Kabının İnvert Mikroskopta İncelenmesi.	35
Şekil 15. İnkübatör ve Laminer Flow Kabin.	35
Şekil 16. MTT'nin Formazon Kristaline Dönüşümü.	36
Şekil 17. Hücre Proliferasyonu, a) MTT Eklenmesiyle Oluşan Kahverengi Renk Değişimi, b) DMSO Eklenmesiyle Oluşan Mor Renk Değişimi.	37
Şekil 18. Doksan Altı Kuyucuklu Hücre Kültür Kabının Plate Okuyucuyla (Eon, Biotek marka) Değerlendirilmesi.	38
Şekil 19. Soğutmalı Santrifüj Cihazı.	39
Şekil 20. Hücre Ekstraksiyonu, a) Altı Kuyulu Hücre Kültür Kabı b) Hücre Kazıyıcı.	39
Şekil 21. Lowry Yöntemiyle Mavi Renk Değişimi.	41
Şekil 22. Durdurucu Solüsyonun Eklenmesiyle Sarı Rengin Mavi Renge Değişimi.	42
Şekil 23. Anjiyotensin II ELİSA Kiti.	43
Şekil 24. Standartların Seyreltilmesi.	43
Şekil 25. a) Plate Kuyucuklarını Yıkama Cihazı b) Plate Okuyucu.	44
Şekil 26. Glukometre ve İdrar Stribi.	46

Şekil 27. Kontrol ve Diyabetik Sıçanların Sekiz Haftalık Kan Şekeri Ölçümleri (n=1).	47
Şekil 28. Kontrol ve Diyabetik Sıçanların Sekiz Haftalık Vücut Ağırlığı (n=1).....	48
Şekil 29. İnvirt Mikroskopta VDKHK, a) x200'lük Büyütme, b) x400'lük Büyütme.	49
Şekil 30. α -smooth muscle actin (α -SMA) ile Boyanan VDKH'ler, a) x100'lük Büyütme, b) x400 Büyütme.....	49
Şekil 31. Kaldesmon'la Boyanan VDKH'ler, a) x100'lük, b) x200'lük Büyütme.	50
Şekil 32. Kalponin'le Boyanan VDKH'ler, a) x100'lük, b) x200'lük Büyütme.....	50
Şekil 33. Normal VDKH'de 24 Saatlik Ang II Doz Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA <i>Post hoc</i> Dunnett Testi (n=6-12).	51
Şekil 34. Normal VDKH'de 48 Saatlik Ang II Doz Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA <i>Post hoc</i> Dunnett Testi (n=12-15).	52
Şekil 35. Normal VDKHK'de Ang II, Olmesartan ve PD123,319 Proliferasyon Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA <i>Post hoc</i> Dunnett Testi. # $p<0,05$ Ang II grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA <i>Post hoc</i> Tukey Testi (n=5-8).	53
Şekil 36. Diyabetik VDKHK'de 24 Saatlik Ang II Doz Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA <i>Post hoc</i> Dunnett Testi (n=6-7).	54
Şekil 37. Diyabetik VDKHK'de Ang II, Olmesartan ve PD123,319 Proliferasyon Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA <i>Post hoc</i> Dunnett Testi (n=6-7).	55
Şekil 38. Yüksek Glukozlu VDKHK'de 24 Saatlik Ang II Doz Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA <i>Post hoc</i> Dunnett Testi (n=7-13).	56
Şekil 39. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK'de Ang II, Olmesartan ve PD123,319 Proliferasyon Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA <i>Post hoc</i> Dunnett Testi (n=6-8).....	57
Şekil 40. VDKHK Hücre Ekstraktı Ang II Standart Eğrisi.....	59
Şekil 41. Normal VDKHK'de Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=3-4).	60
Şekil 42. Diyabetik VDKHK'de Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=1-4).	61
Şekil 43. Yüksek Glukozlu VDKHK'de Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=1-4).	63
Şekil 44 VDKHK Hücre Medyumu Ang II Standart Eğrisi.....	64
Şekil 45. Normal VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=4).	65

Şekil 46. Diyabetik VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=3-4).....	66
Şekil 47. Diyabetik VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=1-2).....	68



KISALTMALAR

ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
ADH	: Antidiüretik Hormon
AGE	: İleri Glikasyon Son Ürünü
AGE-R1	: p60
AGE-R3	: Galektin-3
Ang I	: Anjiyotensin I
Ang II	: Anjiyotensin II
APG	: Açlık Plazma Glukozu
ARB	: Anjiyotensin Reseptör Blokörü
ATR	: Anjiyotensin II Reseptörü
ATR1	: Anjiyotensin II Tip 1 Reseptörü
ATR2	: Anjiyotensin II Tip 2 Reseptörü
BAC	: Bikinkoninik Asit
CD 36	: Glikoprotein-III-B
DAG	: Diaçilgliserol
DDKHK	: Diyabetik Düz Kas Hücre Kültürü
DM	: Diyabetes Mellitus
DMEM	: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
EİA	: Enzim immünoassay
ELİSA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESM	: Ekstrasellüler Matriks
FAK	: Focal Adhesion Kinase
GAPDH	: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GDM	: Gestasyonel Diyabetes Mellitus
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HBSS	: Hanks' Balanced Salt Solution
IFN-γ	: İnterferon- γ
IGFR	: İnsülin Growth Factor Receptor

IHK	: İmmünohistokimya
IL-1	: İnterlökin-1
IP	: İntraperitoneal
IP3	: İnozitol-3 Fosfat
IV	: İntravenöz
JAK/STAT	: Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription
JGA	: Jukstaglomerüler Aparat
JGH	: Jukstaglomerüler Hücre
KDKHK	: Kontrol Düz Kas Hücre Kültürü
LDL	: Low Density Lipoprotein
LOX-1	: Lipoprotein Reseptörü-1
MAPK	: Mitojenle Aktifleşen Protein Kinaz
M6P	: Manno-6-Fosfat Reseptörleri
MTT	: 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa B
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDGFR	: Platelet Derived Growth Factor Receptor
PIP2	: Fosfoinozitol 4,5-bifosfatı
PKC	: Protein Kinaz C
PSA	: Penisilin Streptomisin Antibiyotiği
RAGE	: Glikasyon Son Ürün Reseptörü
RAS	: Renin Anjiyotensin Sistemi
ROS	: Reaktif Oksijen Ürünleri
SA-HRP	: Streptavidin-Yaban Turpu Peroksidazı
STZ	: Streptozotosin
TGF-α	: Transforming Büyüme Faktörü
VDHK	: Vasküler Düz Kas Hücre Kültürü

ÖZET

İntrasellüler Anjiyotensin II'nin Diyabetik Sıçan Vasküler Düz Kas Hücre Proliferasyonuna Etkisi

Amaç: Diyabet ve intrasellüler anjiyotensin II'nin (Ang II) neden olduğu vasküler düz kas hücre proliferasyonunun altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca diyabet ve hipertansiyonda renin anjiyotensin sistemi bileşenlerinin intrasellüler ve sistemik olarak arttığı bilinmektedir. Birçok çalışmada sistemik Ang II, anjiyotensin II tip 1 reseptörü (ATR1) ve anjiyotensin II tip 2 reseptörünün (ATR2) düz kas hücre proliferasyonundaki rolü gösterilmiştir. Ancak vasküler düz kas hücresi tarafından intrasellüler olarak da sentezlenen anjiyotensin II'nin proliferasyona etkisiyle ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle diyabetik sıçan vasküler düz kas hücre proliferasyonuna intrasellüler anjiyotensin II, ATR1 ve ATR2'nin etkisi araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda deney hayvanı olarak Wistar albino 180-200 g ağırlığında erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanların bir kısmına streptozotosin 45 mg/kg intravenöz yolla kuyruk veninden verilerek deneysel diyabetik grup oluşturuldu. Tüm deneysel uygulamalar Çukurova Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Etik Kurul kararlarına uygun olarak yapıldı. Oluşturulan diyabetik ve kontrol grubu sıçanların aorta düz kas dokusundan primer düz kas hücre kültürü yapıldı. Elde edilen hücrelerin bir kısmı Ang II (0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M ve 1000 μ M), ATR1 antagonisti Olmesartan (1 μ M) ve ATR2 antagonisti PD123,319 (1 μ M) ile 24 saat muamele edilerek hücre çoğalması ve canlılığı 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ile spektrofotometrik olarak değerlendirildi. Ang II düzeyi hücre medyumundan ve hücre lizatından ELİSA kitiyle ölçüldü.

Bulgular: Normal, diyabetik ve yüksek glukoz uygulanan vasküler düz kas hücresinde (VDKH) 0,1 μ M ve 0,01 μ M Ang II uygulaması hücre proliferasyonunu anlamlı olarak artırdı. Çalışmamızda normal VDKH'de Ang II, Ang II+PD123,319, Olmesartan+PD123,319 ve Ang II+Olmesartan+PD123,319 uygulamaları hücre proliferasyonunda anlamlı artışa neden olurken, Ang II+Olmesartan uygulaması hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttı. Ancak diyabetik ve yüksek glukoz uygulanan VDKH'de Ang II+Olmesartan uygulamasında azalma görülmedi. Normal, diyabetik ve yüksek glukoz uygulanan VDKH'de ve medyumunda ELİSA'yla intrasellüler Ang II varlığı gösterildi. Çalışmamızda normal, diyabet ve yüksek glukozlu intrasellüler ve hücre medyumunda ölçülen Ang II düzeyleri mg/protein olarak hesaplandığında normal grupla diyabetik grup arasında anlamlı bir fark görülmedi.

Sonuç: Çalışmamızda diyabetik VDKH proliferasyonunda artma eğilimi olmasına rağmen hücre içi ve dışı Ang II düzeylerinde kontrol grubuna göre fark olmaması, diyabetteki proliferasyon, Ang II düzeyleri ve ATR arasında ilişkinin olmadığını düşündürmektedir.

Anahtar Sözcükler: Anjiyotensin II, diyabet, düz kas hücresi, intrasellüler, proliferasyon.

ABSTRACT

Effect of Intracellular Angiotensin II on Diabetic Rat Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation

Background: The mechanism underlying vascular smooth muscle cell proliferation caused by diabetes and intracellular angiotensin II (Ang II) is not fully understood. It is also known that components of the renin angiotensin system in diabetes and hypertension increase intracellularly and systemically. Many studies have shown the role of systemic Ang II, angiotensin II type 1 receptor (ATR1) and angiotensin II type 2 receptor (ATR2) in smooth muscle cell proliferation. However, there has not been enough studies about the effect of angiotensin II, which is synthesized intracellularly by vascular smooth muscle cell on proliferation. Therefore, the effect of intracellular angiotensin II, ATR1 and ATR2 on diabetic rat vascular smooth muscle cell proliferation was investigated.

Materials and Methods: We used Wistar albino male rats weighing 180-200 g as experimental animals. An experimental diabetic group was formed by administering streptozotocin 45 mg/kg intravenously via a tail vein of the rats. All experimental applications were made in accordance with the decisions of the Ethical Committee of the University of Çukurova Experimental Medicine Research and Application Center. Primary smooth muscle cell culture was performed from the aorta smooth muscle tissue of the diabetic and control group of rats. Some of the obtained cells were treated with Ang II (0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M and 1000 μ M), ATR1 antagonist Olmesartan (1 μ M) and ATR2 antagonist PD123,319 (1 μ M) for 24 hours to evaluation of cell proliferation and viability spectrophotometrically with 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Ang II level was measured in cell medium and cell lysate by ELISA kit.

Findings: In normal, diabetic and high glucose treated vascular smooth muscle cell (VDKH), 0,1 μ M and 0,01 μ M Ang II application significantly increased cell proliferation. In our study, Ang II, Ang II+PD123,319, Olmesartan+PD123,319 and Ang II+Olmesartan+PD123,319 resulted in a significant increase in cell proliferation whereas Ang II+Olmesartan administration significantly decreased cell proliferation in normal VDKH. However, there was no decrease in Ang II+Olmesartan administration in VDKH with diabetic and high glucose. Intracellular Ang II was detected with ELISA in VDKH and medium with normal, diabetic and high glucose. In our study, Ang II levels measured in normal, diabetic and hyperglucose intracellular and cell media were calculated as mg/protein, but no significant difference was found between normal group and diabetic group.

Conclusion: Although there was an increased tendency in diabetic VDKH proliferation in our study, the difference between intracellular and extracellular Ang II levels compared to the control group suggests that there is no relationship between diabetes proliferation, Ang II levels and ATR.

Key Words: Angiotensin II, diabetes, smooth muscle cell, intracellular, proliferation.

1. GİRİŞ

Renin Anjiyotensin Sisteminin (RAS) kardiyovasküler fizyolojide, kalp krizi, atheroskleroz ve hipertansiyon gibi sık görülen kardiyovasküler hastalıkların fizyopatolojisinde önemli rolünün olduğu belirtilmektedir.^{1,2} Sistemik RAS bileşenleri dolaşıma salgılanmakta ve bazı enzimler aracılığıyla substratlarının dönüşümü gerçekleşmektedir.³ Ancak yakın zamanda yapılan bilimsel çalışmalarda RAS bileşenlerinin ve enzimlerinin birçok hücrede intrasellüler olarak sentezlenebildiği ve substratların birbirine dönüşümünün gerçekleştiği gösterilmiştir. Ayrıca sentezlendiği hücre üzerinde otokrin etkisinin olduğu belirtilmektedir.⁴ Sistemik RAS kan basıncının düzenlenmesini, antidiüretik hormon (ADH) salınımını, tuz ve su tutulumunu sağlamaktadır. Vasküler düz kas hücresi, kardiyomiyosit, yağ dokusu ve beyin gibi birçok yerde RAS bileşenlerinin intrasellüler olarak sentezlenebildiği gösterilmiştir.⁴ RAS'ı oluşturan bileşenler hem sistemik hem de lokal olarak sentez edilip vasküler dokunun endotel, media ve adventisya tabakasında etkilerini gösterebilmektedir. Lokal RAS vasküler düz kas hücrelerinin çoğalmasına, büyümesine, apoptozuna ve inflamasyonuna neden olmaktadır.⁵ Anjiyotensin II (Ang II) de bu bileşenlerden bir tanesi olup kan basıncının düzenlenmesi, aldosteron salınımı, vazokonstriksiyon, vasküler düz kas hücresinin çoğalması, büyümesi ve inflamasyonu gibi fizyolojik ve fizyopatolojik süreçlerde önemli rol oynamaktadır.^{6,7} Ayrıca sistemik ve intrasellüler olarak sentezlenebilen Ang II'nin de endotel hücrelerinin fonksiyonunu bozarak ve düz kas hücrelerinin çoğalmasını uyarak ateroskleroz ve hipertansiyon gelişimine neden olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir.¹

Ang II, hücre üzerindeki etkilerini reseptörleriyle gerçekleştirmekte olup en az dört alt tipi araştırmalarda gösterilmiştir. Bunlar anjiyotensin II tip 1, tip 2, tip 3 ve tip 4 reseptörüdür. Ang II vasküler doku üzerine etkilerini G proteini aracılığıyla göstermektedir.⁸ Anjiyotensin II tip 1 reseptörünün (ATR1) uyarılmasıyla inozitol-3 fosfat (IP3) ve diasilgliserol (DAG) oluşturarak vazokonstriksiyon, hücre çoğalması, büyümesi ve yeni damar oluşumunu sağlayan birçok sinyal yolağını aktive etmektedir. Tirozin kinaz reseptörlerinin uyarılmasıyla birlikte mitojen aktive protein kinaz (MAPK), protein kinaz C (PKC), NADPH oksidaz ve reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumu artmaktadır.^{6,9} Anjiyotensin II tip 2 reseptörü (ATR2) aracılığıyla da serbest

radikal oluşumunu azaltarak hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir.⁶

Diyabetes mellitus, insülin eksikliği veya direnciyle karakterize bir grup metabolik hastalık olup özellikle kardiyovasküler ve renal sistemde bozukluklara yol açmaktadır.¹⁰ RAS'ın diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarının oluşumunda rolü olabileceği belirtilmektedir. Ayrıca Ang II'nin de diyabetes mellitusun vasküler komplikasyonlarından sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir.^{11,12}

Hem sistemik hem de lokal olarak sentez edilip etki gösteren Ang II'nin sağlıklı ve diyabetik vasküler düz kas hücresi üzerine intrasellüler etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır.¹³ Bu nedenle çalışmamızda sağlıklı ve diyabetik sıçan vasküler düz kas hücre proliferasyonuna Ang II, ATR1 ve ATR2'nin etkisinin araştırılması amaçlandı. Çalışmamızda streptozotosin (STZ) ile deneysel diyabet modeli oluşturulan sıçanların torasik aortasından primer düz kas hücre kültürü (DKHK) yapıldı. Elde edilen 4. ve 8. kuşak arasındaki hücreler Ang II, ATR1 antagonisti (Olmesartan) ve ATR2 antagonisti (PD123,319) ile 24 saat muamele edildikten sonra hücre çoğalması ve canlılığı 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) yöntemiyle spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ayrıca hem sağlıklı DKHK hem de diyabetik DKHK'den elde edilen hücre lizatından ve medyumundan Ang II düzeyi ELİSA yöntemiyle ölçüm yapılarak belirlendi.

Dünyada en yaygın ölüm sebepleri arasında olan diyabet ve neden olduğu komplikasyonlar özellikle ilerleyen yaşlarda ortaya çıkmakta ve bireylerin yaşam kalitesini olumsuz etkilemektedir. Ayrıca diyabetin tedavisi için ülke ekonomisinden ciddi bütçeler ayrılmaktadır.¹⁴ Bu nedenle çalışmamızda oluşturulan deneysel diyabetik hayvan modelinde değişen intrasellüler Ang II konsantrasyonunun diyabetle ilişkisi ve ATR1 ve ATR2'lerin vasküler düz kas hücre fonksiyonu üzerine etkisi incelenmiş olup elde edilen veriler diyabetin fizyopatolojisinde intrasellüler Ang II, ATR1 ve ATR2'nin rolünün aydınlatılmasında etkili olabilir. Ayrıca diyabetin makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlarının fizyopatolojik mekanizmalarının moleküler ve hücresel düzeyde aydınlatılmasına ışık tutacak olup sosyal ve ekonomik olarak olumsuz sonuçları olan diyabetin kardiyovasküler komplikasyonlarının önlenmesine ve yeni tedavi metotlarının geliştirilmesine olumlu katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

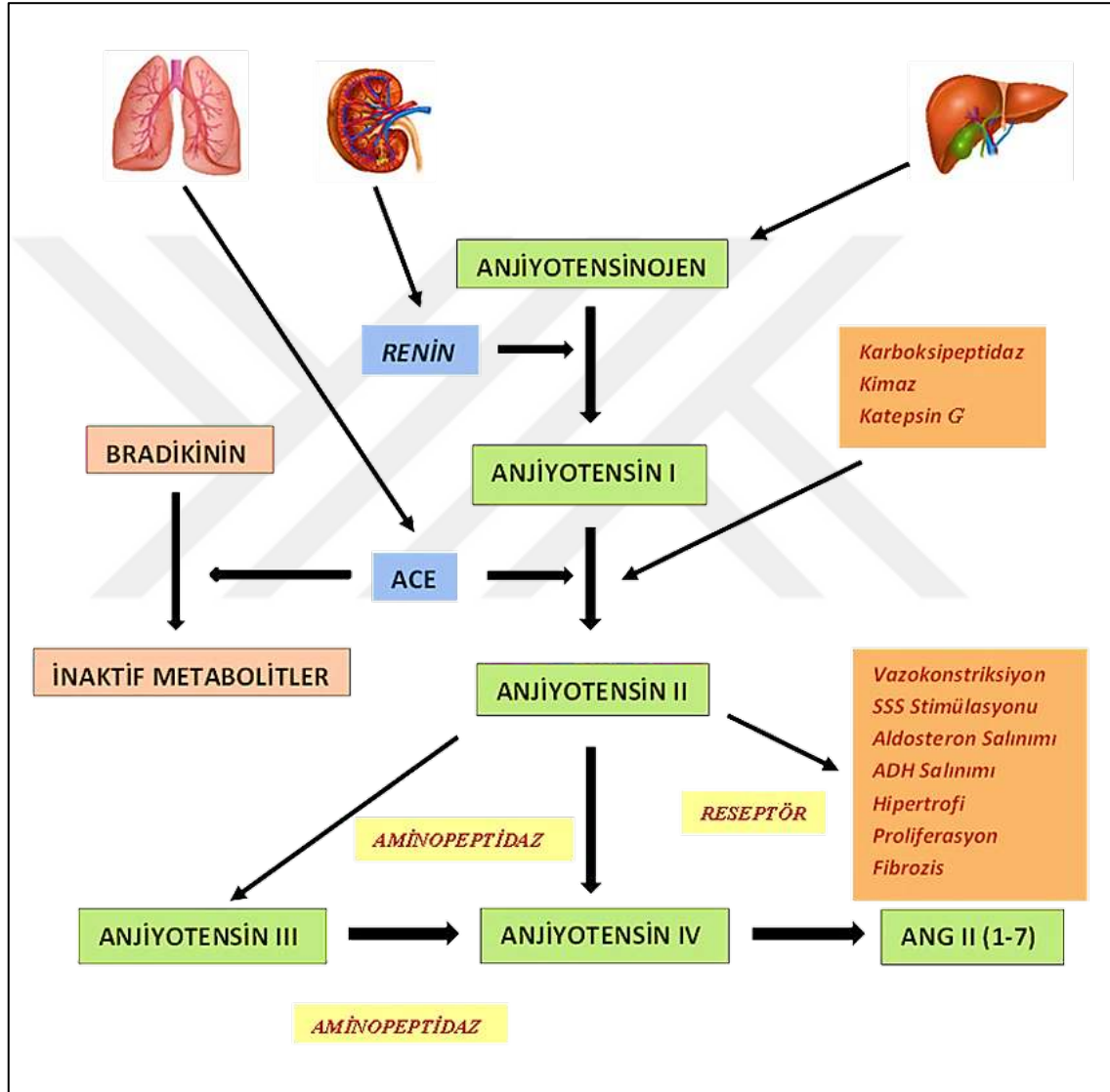
2.1. Sistemik Renin Anjiyotensin Sistemi (RAS)

Renin Anjiyotensin Sisteminin (RAS) kalp ve böbrek hastalıklarındaki önemli rolü ve temel bileşenleri 1970'li yılların başlarında keşfedilmiş olup o yıllardan itibaren de bilim insanları bu konuyu yoğun bir şekilde çalışmışlardır.¹⁵ Bu çalışmalarda anjiyotensin II'nin (Ang II) kalp ve böbrekler üzerine olumsuz etkilerinin olduğu ayrıca plazma renin aktivitesi yüksek olan kişilerin inme ve kalp krizi gibi kardiyovasküler hastalık geçirme olasılığının renin düzeyi düşük olanlara göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir.^{5,16} Bununla birlikte RAS'la ilgili moleküler ve hücresel düzeyde bilimsel araştırmalar devam etmekte ve konuyla ilgili bilgilerimiz hızla artmaktadır.

RAS'ın kardiyovasküler sistemde oluşan fizyolojik ve fizyopatolojik süreçlerin düzenlenmesinde temel rol oynadığı belirtilmektedir. Kan basıncının düzenlenmesi, su ve elektrolit homeostazının sağlanması, vasküler düz kas hücrelerinin çoğalması, büyümesi ve inflamasyonu RAS'ın üstlendiği görevlerden sadece birkaç tanesidir.^{1,16} RAS'la ilgili olarak klasik bilgi bileşenlerinin belli organlarda enzimler ve substratlar yardımıyla üretilerek kan dolaşımına salınmasıyla ortaya çıkan sistemik endokrin etkileridir. Ancak son yıllarda bu sistemin etkilerinin sadece sistemik olarak gerçekleşmediği RAS bileşenlerinin çeşitli organ, doku ve hücrelerde intrasellüler olarak sentez edildiği ve sistemik RAS'tan bağımsız olarak düzenlendiği, lokal parakrin ve otokrin etkilere sahip olduğu araştırmalarda gösterilmiştir.^{3,5} Ayrıca RAS'ın hipertansiyon, ateroskleroz, anjiyoplasti sonrası restenoz ve kalp yetmezliği gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıkların ortaya çıkmasına ve ilerlemesine neden olduğu çok sayıda çalışmada vurgulanmaktadır.¹⁷ RAS'la ilişkili kardiyovasküler ve böbrek hastalıklarını tedavi etmek için de bu sistemin bileşenlerini inhibe edici ilaçlar geliştirilmiştir. Özellikle Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE), Anjiyotensin II reseptörleri (ATR) ve renin blokerleri hipertansiyon, kalp yetmezliği ve diyabetik nefropati tedavisinde kullanılan güncel ilaç tedavileri arasında yer almaktadır.¹⁸

RAS'ın temel bileşenleri 1) Büyük bir globüler protein olan anjiyotensinojen 2) Anjiyotensinojenin bir dekaeptit olan Anjiyotensin I (Ang I)'e dönüşümünü sağlayan renin, 3) Ang I'i bir oktaeptit olan Ang II'ye çeviren karboksipeptidaz grubunda yer alan enzimlerden ve membran bağımlı metalloproteinaz olan ACE, 4) RAS'ın temel

efektör peptidi Ang II ve 5) Ang II'nin hücrel etkilerinden sorumlu ATR'lerdir. Bu temel bileşenlerinin dışında RAS hakkında bilgiler giderek artmaktadır. Farklı ATR'ler (ATR1, ATR2, ATR3, ATR4) ve bu reseptörlerin aktivasyonu ile ortaya çıkan sinyal yolları tanımlanmıştır.^{19,20} (Şekil 1)



Şekil 1. Sistemik Renin Anjiyotensin Sistemi.⁵

Ayrıca Ang I'ı Ang II'ye yıkan ACE yanında bir serin proteaz enzimi olan karboksipeptidaz, kimaz ve katepsin G de bulunmaktadır. Ang II aminopeptidazlar ile Ang III, Ang IV ve Ang (1-7) oluşmaktadır. Ang (1-7)'nin vasküler yapıyı koruyucu

etkilerinin olduğu belirtilmektedir.^{3,19,21} Ayrıca ACE2'nin Ang (1-9) oluşumunu sağladığı belirtilmektedir. ACE'nin böbrek damarının endotel tabakası, kalp, hipotalamus ve aortada bulunduğu gösterilmiştir. Bu yolun ACE aracılığıyla Ang II oluşumunun karşıt düzenleyicisi olabileceği de belirtilmektedir.⁵

2.1.1. RAS Bileşenleri

2.1.1.1. Anjiyotensinojen

Anjiyotensinojen renin için temel bir substrat olup karaciğer lobüllerinde bulunan perisantral zondan sentezlenmektedir.¹⁵ Ayrıca beyaz yağ dokusunda sentezlenen anjiyotensinojenin sistemik dolaşıma katılmakla beraber lokal etkilerinin de olduğu belirtilmektedir.^{5,22} Dolaşımdaki anjiyotensinojen, böbrekte bulunan jukstaglomerüler hücreler (JGH) tarafından sentezlenen renin enzimiyle Ang I'e dönüştürülmektedir. Anjiyotensinojen, plazmanın α 2-globulin grubunda yer alan bir glikoproteindir. α -antitripsin'le benzerlikleri çok fazla olup serin proteaz inhibitörleri süperailisindendir. Dört yüz elli iki aminoasit kalıntısından oluşup, ortalama % 13-14 oranında karbonhidrat içermektedir.^{6,20,23} Dolaşımdaki seviyesinin inflamasyon, insülin, glukokortikoid, tiroid hormonları, östrojenler, birçok sitokin ve Ang II ile arttığı gösterilmiştir.²⁰ Anjiyotensinojen seviyesinin kan basıncı ve beden kitle indeksiyle ilişkili olduğu da belirtilmektedir. Anjiyotensinojen her ne kadar karaciğerde sentez edilse de sağlıklı kan damarlarının mediyal düz kas tabakasında da mRNA ekspresyonu gösterilmiştir.^{13,23} Anjiyotensinojenin damar duvarında sentez edilip difüzyonla vasküler duvarı geçtiği ve vasküler reninle de bu şekilde temas ettiği çalışmalarda belirtilmektedir. Ayrıca sıçanlarda balon hasarlaması yapıldıktan sonra hasarlı kan damarlarında yeni intima oluşumu görülmüş olup, bu tabaka ve mediasında anjiyotensinojen mRNA'sının arttığı saptanmıştır. Anjiyotensinojen mRNA'sının fare, sıçan, köpek ve insan kalbinde, sıçan beyrinde ve birçok türde testiküler dokuda da lokal olarak bulunduğu tespit edilmiştir.²³

2.1.1.2. Renin

Renin, Fin fizyolog Robert Tigerstedt ve İsveçli öğrencisi Per Bergman tarafından 1898 yılında keşfedilmiştir.^{5,24} Glikoproteolitik bir enzim olup, Ang II

oluşumunda ilk basamak olan anjiyotensinojenin Ang I'e dönüşümünü sağlamaktadır.²⁵ Proteaz bir enzim olan renin, böbreğin JGH'sinde üretilmektedir. JGH'ler afferent arteriyolün duvarında bulunan özelleşmiş düz kas hücreleridir. JGH, granüler hücre olarak da bilinmektedir. Makula densa ve ekstramedüller mezenşimal hücrelerle birlikte jukstaglomerüler aparatı (JGA) oluşturmaktadır. Sistemik kan hacminde, arteryel kan basıncında, makula densada NaCl miktarında ve renal perfüzyonda azalma renin salınımını uyarmaktadır.^{6,26} Protein yapılı hormonlar gibi renin de preprohormon olarak sentezlenmektedir.²⁷ Preprorenin 406, prorenin 383, renin ise 340 aminoasit kalıntısı içermekte ve ağırlığı 37-40 kDa'dır. Preprorenin sinyal peptidinin uzaklaşmasıyla ve glikozilasyonla düz endoplazmik retikulumda prorenine dönüşmektedir.²⁷ Proreninin bir kısmı granüllerde depolanıp 43 aminoasit segmentinin uzaklaştırılmasıyla renin olarak bir kısmı da golgi aparatından prorenin olarak salgılanmaktadır.²⁸ Proreninin biyolojik aktivitesi varsa da çok azdır.²⁹ İnsanlarda dolaşımdaki prorenin seviyesinin artışı diyabetik mikrovasküler komplikasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Prorenin overler dahil birçok organdan da salgılanmaktadır. Aktif reninin dolaşımdaki ömrü yaklaşık 80 dakikadır. Bilinen tek görevi ise anjiyotensinojenin aminoterminal ucundan, bir dekaeptit olan Ang I'i ayırmaktır.²⁵ Günümüzde renin salgılanmasını baskılayan ve hipertansiyon tedavisinde kullanılan pepstatin peptidi ve enalkiren gibi renin inhibitörleri bulunmaktadır. İndometazin gibi prostaglandin sentez inhibitörü ve propranolol gibi β -adrenerjik blokeri de renin salgılanmasını bloke etmektedir. Birçok türde renin mRNA'sının kalpte, vasküler dokuda, beyinde ve overlerde bulunduğu gösterilmiştir. Ayrıca prorenin ve reninin hücre içine mannoz-6-fosfat reseptörleri (M6P) aracılığıyla girebildiği belirtilmektedir. M6P'nin neonatal sıçan kardiyomiyositlerinde ve insan endotel hücrelerinde prorenin ve renine bağlandığı gösterilmiştir. M6P, insülin benzeri büyüme faktörü II internalizasyonuna ve inaktivasyonuna sebep olmaktadır.²³ Renin reseptörlerinin hem renine hem de prorenine bağlanabilme özelliği olup kalp, beyin, plasentada bol miktarda bulunduğu az da olsa böbrek ve karaciğerde bulunabildiği belirtilmektedir.^{5,30} Renin reseptörlerinin inhibisyonu RAS'la ilişkili hastalıkların tedavisinde yeni hedef olarak gösterilmektedir.⁵

2.1.1.3. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE)

Ang I bir dekaeptit olup, ACE tarafından güçlü vazokonstriktör olan Ang II'ye dönüştürülmektedir.³¹ ACE, dipeptidil-karboksipeptidazdır. Ayrıca kininaz II olarak da bilinmektedir. Aynı zamanda çinko metallopeptidaz grubu enzim ailesindendir. Enzimin yapısında bulunan çinko katalitik reaksiyonların hidroliz basamağının gerçekleşmesini sağlamaktadır.⁶ Endotelial formu için moleküler ağırlığı 140-160 kDa arasında değişirken testiküler formu için 90-100 kDa arasındadır. ACE'nin serum, akciğer, seminal sıvı ve plazma gibi birçok yerde bulunduğu gösterilmiştir. Ang II oluşumunu sağlayan bu enzimin büyük kısmı endotel hücrelerinde bulunmaktadır. Kanın akciğerlerden geçişi sırasında dönüşümün büyük kısmı gerçekleşse de vücudun birçok bölümünde bu dönüşümün olduğu belirtilmektedir.^{5,23} Deneysel hipertansiyonda vasküler ACE'nin artmasıyla ilgili olarak tartışmalar sürmektedir. Birçok yayında vasküler ACE'nin iki böbrek tek klip hipertansif sıçanlarda arttığı gösterilmiştir fakat spontan hipertansif sıçanlarda ise bu artış doğrulanamamıştır.⁶ Birçok canlı türünde (insan, köpek ve tavşan) ACE üretiminin endotel ve adventisya tabakasında da olduğu gösterilmiştir.²³ Vasküler düz kas hücre ve endotel hücre kültürlerinde ACE konsantrasyonunun yüksek olduğu ifade edilmiştir.⁷ ACE aynı zamanda güçlü bir vazodilatör olan bradikininin de inaktif hale getirmektedir.⁶ Hipertansiyonda ACE inhibitörü kullanımıyla artan bradikinin düzeyleri, hastaların % 20'sinden fazlasında öksürük oluşumuna neden olmaktadır. Kaptopril ilk olarak bulunan ACE inhibitörü olup hipertansiyon, kalp yetmezliği, diyabetik nefropati gibi birçok hastalığın tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır.^{18,32}

2.1.1.4. Anjiyotensin II

Ang II, 8 aminoasitten oluşan güçlü bir vazoaktif peptit olup çok hızlı şekilde metabolize olmaktadır.²⁹ İnsan dolaşımında 1-2 dakika içerisinde yıkılmaktadır. Ang II, Ang I'in ACE'yle yıkılmasıyla oluşmakta olup aminopeptidaz enzimleriyle Ang III ve Ang IV'e de parçalanabilmektedir. Bununla birlikte Ang I ve Ang II farklı enzimatik yollarla da oluşabilmektedir. Ang I, tonin ve katepsin gibi enzimler aracılığıyla meydana gelmektedir. Ayrıca Ang I'den Ang II oluşurken tripsin, katepsin ve kimaz enzimi görev alabilmektedir. Ang II, RAS'ın temel efektör molekülüdür.^{5,23} Kan basıncının, tuz, su ve vasküler homeostazının düzenlenmesinde önemli bir role sahip

olup, damar duvarının fizyolojik ve patolojik süreçlerinde görev almaktadır.^{16,33} Ang II, sistemik etkilerinin yanında büyüme, migrasyon ve fibrozis gibi hücresel düzeyde vasküler yeniden şekillenmede de rol oynamaktadır.²⁹ Ang II'nin kalp, böbrek, damar ve beyin gibi organlar üzerine olumlu etkilerinin yanında olumsuz etkileri bulunmaktadır.³⁴ Birçok çalışmada ateroskleroz gelişimine Ang II'nin hemodinamik etkileri yanında hücresel olarak da etkili olduğu belirtilmiştir. Ang II temel etkisini vasküler düz kas hücresinde olmakla birlikte endotel hücrelerinde bulunan anjiyotensin II reseptörlerine (ATR) bağlanarak etkilerini gösterebilmektedir.⁷ Ang II, vasküler düz kas hücresinde ATR1'e bağlanmasıyla vazokonstriksiyon, düz kas hücresinde büyüme, kontraksiyon, hipertrofi, migrasyon, fibrozis, lipid oksidasyonu ve sitoplazma iskeletinin yeniden düzenlenmesi gibi etkilere sahiptir.³⁵ ATR2'ye bağlanmasıyla nitrik oksit (NO) salınımını artırarak vazodilatasyona, hücre proliferasyonunda ve büyümesinde azalmaya neden olmaktadır.^{1,33,36} ATR1 aracılı etkilerin hipertansiyon, ateroskleroz, tromboz ve inflamasyon gibi patolojik süreçlere neden olduğu belirtilmektedir.¹⁷ Yapılan *in vivo* çalışmalarda da, sıçanlara 2 hafta boyunca Ang II uygulanmasının hipertansiyona ve vasküler düz kas hücresinde hipertrofiye neden olduğu gösterilmiştir.³⁷

2.1.1.5. Anjiyotensin II Reseptörleri ve Vasküler Etkileri

Anjiyotensin II reseptörleri, G proteini aracılığıyla etkilerini göstermekte olup dört alt tipi vardır (ATR1, ATR2, ATR3 ve ATR4).²⁸ Bu dört alt tipten en fazla ATR1 ve ATR2 üzerine ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır.^{1,38} ATR1'lerin böbrek, beyin, adrenal bez, trombositler, yağ hücreleri ve plasentada bulunduğu gösterilmiştir.¹⁵ ATR2'ler daha çok beyinde yerleşmiştir. ATR2 fetal ve neonatal dokuda yetişkin dokulara göre daha fazla bulunmaktadır; postnatal hayatta reseptör sayısı giderek azalmaktadır.^{16,36} Uterus, adrenal bez, kardiyomiyositler ve fibroblastlarda ATR2'lerin düşük seviyede de olsa bulunabildiği belirtilmektedir. ATR3, nöro2A nöroblastoma hücre hattında bulunduğu bildirilmektedir.^{15,38} ATR4'ün de kalp, akciğer, böbrek ve karaciğerde bulunduğu sadece Ang IV'e bağlandığı ATR1 ve ATR2 blokerlerine herhangi bir affinitesinin olmadığı gösterilmiştir.³⁸

ATR1'in yaklaşık olarak 50 kDa, ATR2'nin ise 44 kDa ağırlığında olduğu belirtilmektedir. Ang II'nin ATR1'e bağlanmasıyla Ang II-ATR1 hızlı bir şekilde hücre

sitoplazmasına geçerken, agonistle uyarılmasıyla da desensitizasyon gerçekleşmektedir. Reseptör plazma membranına tekrar dönerken Ang II, lizozom ve hücre çekirdeği gibi intrasellüler lokalizasyonlara gitmektedir.³⁹ Ancak ATR2’de ATR1’de görülen internalizasyon ve desensitizasyon gerçekleşmemektedir.¹⁵ Ang II’nin akut kardiyovasküler etkileriyle ATR2 ilişkisinin daha az olduğu bildirilmektedir. Bu iki reseptör tipinin işlevsel olarak da birbirlerine zıt etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Ang II, ATR1 aracılığıyla hücre çoğalması, büyümesi, yeni damar yapılarının oluşması ve vazokonstriksiyon gibi etkiler gösterirken, ATR2 aracılığıyla hücre çoğalması ve büyümesini engelleyici etkilerinin olduğu belirtilmektedir.³³ Ayrıca ATR2’lerin santral sinir sisteminde nörotrofik etkilerinin olduğu bildirilmektedir.¹ Bununla birlikte ATR2’nin, Ang II’nin ATR1 aracılı bazı etkilerinin karşıt düzenleyicisi olarak önemli bir rolü olabileceği de düşünülmektedir.³³ ATR2’nin kanser, tip 2 diyabetes mellitus⁴⁰, spinal kord hasarlanması⁴¹, diyabetik nefropati⁴², inflamasyon⁴³ ve doku hasarlanmalarına⁴⁴ karşı koruyucu etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir.⁵ ATR2’lerin aktivasyonu endotel hücrelerinde NO sentezini artırarak cGMP ile vazodilatasyona neden olurken, vasküler düz kas hücrelerinde antioksidan etkileri bulunmaktadır. Aynı zamanda ATR2’ler böbrekte bradikinin, NO, prostaglandin üretimini artırmaktadır.^{5,15,38} Hasarlı arterlerin yeni intima tabakasında önemli miktarda ATR1 bulunmaktadır. ATR1’in ATR1A ve ATR1B olarak da alt tipleri mevcut olup, ATR1A daha çok kardiyovasküler dokularda bulunurken, ATR1B adrenal ve hipofiz bez gibi endokrin dokularda bulunduğu çalışmalarda gösterilmiştir.¹⁵ Bununla birlikte araştırmalarda Wistar şişman sıçanların vasküler düz kas hücrelerinde normal sağlıklı sıçanlarla karşılaştırıldığında şişman sıçanlarda ATR1 ve ATR2 yoğunluğunun anlamlı olarak daha fazla olduğu görülmüştür. Makrofaj ve endotel hücre kültürlerinde de ATR1’ler saptanmıştır.¹

2.1.2. Anjiyotensin II Reseptör Blokerleri (ARB)

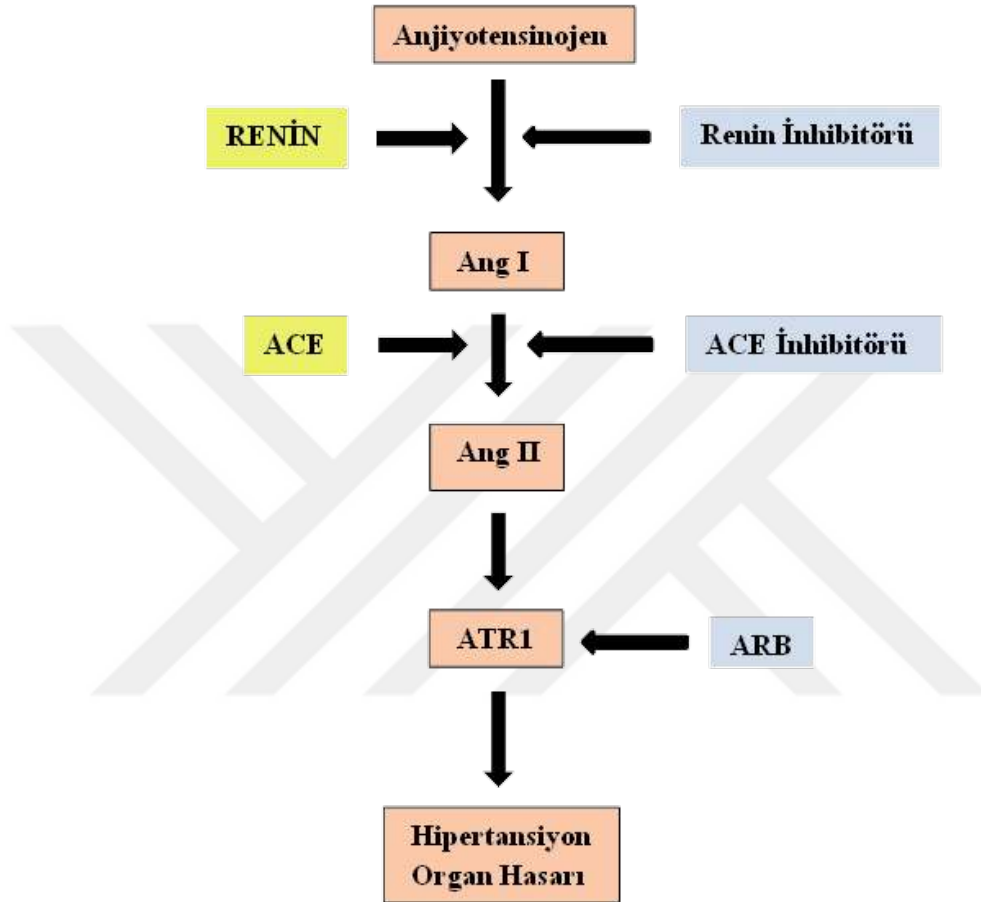
İlk ARB 1980’li yılların başında Takeda Kimyasal Şirketinde çalışan araştırmacılar tarafından bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda, tavşandan izole edilen kan damarında Ang II ile oluşturulan vazokonstriksiyon 10 µM maksimum dozda imidazol yapıdaki bu ilaç ile ancak % 38 oranında inhibe edilebilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda 1 µM konsantrasyonda bulunan imidazol-5-asetik asit derivativesi % 100

inhibisyon sağlamıştır. Günümüzde güçlü, selektif ve oral olarak kullanılabilen ATR1 antagonistleri hipertansiyonu tedavi etme, diyabet ve aterosklerozun neden olduğu organ hasarlarını azaltma amacıyla kullanılmaktadır. ACE inhibitörleri de bu amaçlarla kullanılabilir. Ancak ARB'ler ACE inhibitörlerine kıyasla daha spesifik blokaj yapması ve tolere edilebilirliklerinin yüksek olmasıyla daha avantajlıdır. Günümüzde losartan, valsartan, olmesartan, telmisartan, irbesartan kardiyovasküler birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.^{38,45} ATR1 blokerleri ATR1'e yüksek afinite ile bağlanmakta ve genellikle ATR2'ye göre en az 10.000 kat daha seçicidir. Hemen hemen ATR2'lere affinitesi yok denilecek kadar azdır. ARB'ler için ATR1 affinitesi kandesartan = olmesartan > irbesartan = eprosartan > telmisartan = valsartan = EXP 3174 (losartanın aktif metaboliti) > losartan şeklinde sıralanmaktadır.^{27,38}

İlk bulunan ve oral olarak kullanılan ATR1 antagonisti losartandır. Klinik olarak en fazla veri elde edilen ARB'dir. *In vitro* çalışmalarda losartanın ATR1'e bağlanmak için Ang II (20 nmol/L) ile yarıştığı ve % 50 oranında inhibisyon yaptığı gösterilmiştir. Ayrıca Losartanın EXP 3174 isminde aktif metabolitinin oral biyoyararlanımı çok azdır.^{27,38}

Olmesartan medoksomil, inaktif ester yapıda ön ilaçtır. Oral uygulamadan 1,4-2,8 saat sonra plazma seviyelerinde pik elde edilmekte ve yarılanma ömrü 10-15 saat olduğu belirtilmektedir. Böbrek yetmezliği ve karaciğer hastalıkları olmesartanın plazma klirensini azaltsa da hafif ila orta derecede böbrek veya karaciğer yetmezliği olan hastalarda herhangi bir doz ayarlamasına gerek duyulmamaktadır. Olmesartan medoksomil'in oral dozu günde bir kez 20-40 mg'dır.²⁷ Olmesartan ATR1'lere ayrılmayacak şekilde bağlanıp inhibe etmektedir. Klinik olarak ARB'ler çok iyi tolere edilmekte ve ilk doz hipotansiyon yapmamaktadır. Bunun yanında ARB'lerin öksürük yapmamaları ACE inhibitörlerine göre üstün yanlarıdır. RAS inhibitörleri Şekil 2'de gösterilmektedir. ARB'lerin vasküler doku üzerine olumlu etkileri *in vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalarda belirtilmektedir.³⁸ ATR1 blokajının diyabetik şişman sıçanlarda hücre proliferasyonunu ve insülin sinyal yollarını inhibe ettiği gösterilmiştir. Buna karşın ATR2 aktivasyonunun ATR1'e zıt etkilere sahip olduğu belirtilmektedir. ATR2 agonistleri tek başlarına kullanıldığında kan basıncı üzerine direkt etkilerinin olduğunu gösteren yeterli bilgi bulunmamaktadır. ATR2'nin uyarılması ile kan basıncında

değişiklik görülmemesine rağmen hipertansiyonun indüklediği vasküler bozukluklarda (remodelling) etkisinin olabileceği ileri sürülmektedir.



Şekil 2. RAS İnhibitörleri.⁵

Diyabetin neden olduğu hipertansiyonun tedavisinde ATR1 blokerleri kullanılmasının kan basıncını azalttığını bildiren *in vivo* çalışmalar literatürde mevcut olup *in vitro* çalışmalarda ATR1 blokerlerinin vasküler düz kas hücre kültürü uygulamalarında hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir.³⁸

2.1.3. Anjiyotensin II'nin Vasküler Etkileri

Ang II'nin akut hemodinamik etkilerinin yanında vasküler tonus üzerine etkileri bulunmaktadır. Bununla birlikte vasküler hücrelerin çoğalmasına, migrasyonuna ve

ekstraselüler matriks oluşumuna neden olmaktadır. Ang II bu etkilerinin çoğunu ATR1'lere bağlanarak gerçekleştirmektedir.³ Ang II'nin ATR'ler aracılığıyla vasküler hücreler üzerine direkt etkileri yanında, intrasellüler sinyal yollarının vazoaktif ajanlarla ve büyüme faktörleriyle etkileşimi sonucu indirekt etkileri bildirilmektedir. Ang II'nin ATR1'e bağlanmasıyla hücre büyümesi, vasküler kontraksiyon, inflamatuvar yanıt, su ve tuz tutulumu gerçekleşirken, ATR2'lere bağlanmasıyla apoptoz, vazodilatasyon ve natriürez meydana gelmektedir. Ang II'nin ATR1'le birleşmesiyle sanilyeler içerisinde fosfolipaz C enzimi aktifleşip fosfoinozitol 4,5-bisfosfatı (PIP2) hidrolize etmesiyle inozitol 1,4,5 trisfosfat (IP3) ve 1,2 diaçil gliserol (DAG) oluşmaktadır.⁴⁶ DAG oluşumu bifaziktir. Erken fazda üretilen DAG, fosfolipaz C enziminin aktivasyonu ile gerçekleşirken geç dönemde üretilen ve toplam DAG'nin büyük kısmı ise fosfolipaz D enzimi aracılığıyla gerçekleşmektedir. İkinci mesajcılar hücre içi sinyal yollarını kontrol etmektedir. Bu akut etki sanilyeler içerisinde başlamakta ve iki dakika içerisinde sonlanmaktadır. Birçok hücre tipinde IP3 hücre içi kalsiyum deposu olan endoplazmik retikulumdan kalsiyum salınımına neden olmaktadır. IP3 ile kalsiyum mobilizasyonu DAG'a göre daha hızlı gerçekleşmektedir.^{7,29} DAG ise kalsiyumla birlikte protein kinaz C'yi aktive ederek çeşitli hücre proteinlerinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca protein kinaz C Na^+/H^+ değiştiricisini uyararak hücre içi pH'sını, serbest Na^+ ve Mg^{2+} miktarını değiştirmekte ve src kinaz ailesinin aktivasyonunu sağlamaktadır. Bu olay sonucunda hücre içisine Ca^{2+} girişı ve hücre içi Ca^{2+} mobilizasyonu artmakta böylece hücre içinde serbest Ca^{2+} konsantrasyonu artmaktadır. Ayrıca Ang II'nin hücre içerisinde kalsiyum artışını sağladığı diğer yollar halen aydınlatılamamıştır. Fakat voltaj bağımlı ve reseptör aracılı kalsiyum kanalları, kalsiyum aracılığıyla aktive olan kalsiyum kanalları ve $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiştiricisinin aktivasyonu ile hücre içi kalsiyumun arttığı ileri sürülmektedir. Rodent vasküler düz kas hücrelerinde ATR1A ve ATR1B'nin kalsiyum sinyalizasyonunu düzenlediğı belirtilmektedir.³ Düz kas kültür hücrelerinde ATR1'in uyarılması ile hücre içinde serbest Ca^{2+} düzeyinde artış olduğı bilinmektedir. Ayrıca Ang II, fosfolipaz D, fosfolipaz A2 aktivasyonu, mitojenle aktifleşen protein kinaz (MAPK), tirozin kinaz, RhoA/Rho kinaz sinyal yollarını aktive ederek düz kas hücrelerinde yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır.^{6,29} Bu sinyal yollarının aktivasyonu dakikalar içerisinde gerçekleşen süreçler olup oksidatif stres

oluşumu, protoonkogen ekspresyonu ve protein sentezi gibi süreçler ise saatler içerisinde meydana gelmektedir.²⁹ Bu sinyal yollarına ek olarak Ang II büyüme sinyallerinde ve inflamasyonda görevli çok sayıda intrasellüler tirozin kinazı aktive etmektedir. Src, Pyk2, p130Cas, FAK (Focal adhesion kinase) ve JAK/STAT (Janus kinase/signal transducers and activators of transcription) hücre içi tirozin kinazlardandır. Bu olaylar PDGFR (platelet derived growth factor receptor), EGFR (epidermal growth factor receptor), IGFR (insulin growth factor receptor) gibi tirozin kinaz reseptörlerini direkt veya indirekt olarak aktive etmektedir.^{7,17,29} Ang II, NADPH oksidazı da aktive ederek reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna neden olmaktadır. NADPH oksidaz enzimi NADH ve NADPH'da bulunan elektronları moleküler oksijene aktararak süperoksit anyonu oluşumunu sağlamaktadır. Ancak NADPH oksidazın etkileri geç ortaya çıkmakta ve enzimin tespit edilebilmesi ancak Ang II uygulamasından 60 dakika sonra mümkün olmaktadır.^{7,47} Ayrıca vasküler hücrelerde yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda Ang II'nin kollajen, fibronektin, glikozaminoglikan, kondroitin ve dermatan sülfat üretimini artırarak hipertrofi ve hiperplaziye neden olduğu gösterilmiştir. Bu etkileri ERK-1/ERK-2 (extracellular signal-regulated kinase) bağımlı sinyal yolları aracılığıyla gerçekleştirdiği belirtilmektedir.⁷ Ang II'nin hücre büyümesini ve ekstrasellüler matriksin yapısını yeniden düzenleyerek vasküler duvarın yapısını ve bütünlüğünü etkilediği bildirilmektedir. Böylece vasküler dokuda proliferasyon yollarının aktivasyonunu ile patolojik süreçleri başlatmaktadır.⁴⁸ Ang II'nin akut etkileri su, tuz homeostazını ve vazokonstriksiyonu düzenleyerek kan basıncını ayarlarken, kronik etkileri vasküler düz kas hücresinde hiperplaziye, hipertrofiye ve migrasyona neden olmaktadır. Tip 2 diyabet, obezite, hipertansiyon ve ateroskleroz gibi patolojilerin sonucunda vasküler dokuda erken dönemde endotel disfonksiyonunun ortaya çıktığı belirtilmektedir. Endotel disfonksiyonunda Ang II aracılı sinyal yolları tam olarak bilinmemektedir. Ancak yakın zamanda yapılan çalışmalarda Ang II'nin vasküler etkilerinin ATR1 aracılı olarak NO fonksiyonu ve reaktif oksijen radikalleri arasındaki dengeyle ilgili olabileceği bildirilmektedir. Kültür endotel hücrelerinde Ang II uygulamasıyla ATR1 aracılı olarak NO'nun arttığı bu durumun ise vasküler yapıyı koruyucu bir mekanizma olduğu düşünülmektedir. NO'nun vazodilatatör etkisinin yanında hücre proliferasyonu, inflamasyonu, trombosit agregasyonu ve ateroskleroza engelleyici etkisi de

bulunmaktadır. Ayrıca Ang II NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) yolağının ve proinflatuar sitokinlerin de aktivasyonunu sağlamaktadır.¹⁷ Ang II'nin vasküler doku üzerine fizyolojik ve fizyopatolojik etkileri Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Ang II'nin Vasküler Doku Üzerine Fizyolojik ve Fizyopatolojik Etkileri.⁷

Fizyolojik Etkiler	Fizyopatolojik Etkiler
Kontraksiyon	Kontraksiyon $\uparrow \rightarrow$ Periferik Direnç $\uparrow$ Kan Basıncı $\uparrow$
Hücre Büyümesi	Büyüme $\uparrow \rightarrow$ Media Genişliği $\uparrow$ Vasküler Remodeling $\rightarrow$ Kan Basıncı $\uparrow$
Apoptoz	Apoptoz $\downarrow \rightarrow$ Büyüme $\uparrow$ Vasküler Remodeling $\rightarrow$ Kan Basıncı $\uparrow$
Kolajen ve Fibronektin Üretimi	Ekstrasellüler Matriks Birikimi $\uparrow$ Vasküler Remodeling $\rightarrow$ Kan Basıncı $\uparrow$
İnflamatuar Yanıt	Ateroskleroz
Hücre Migrasyonu	Vasküler Remodeling Ateroskleroz

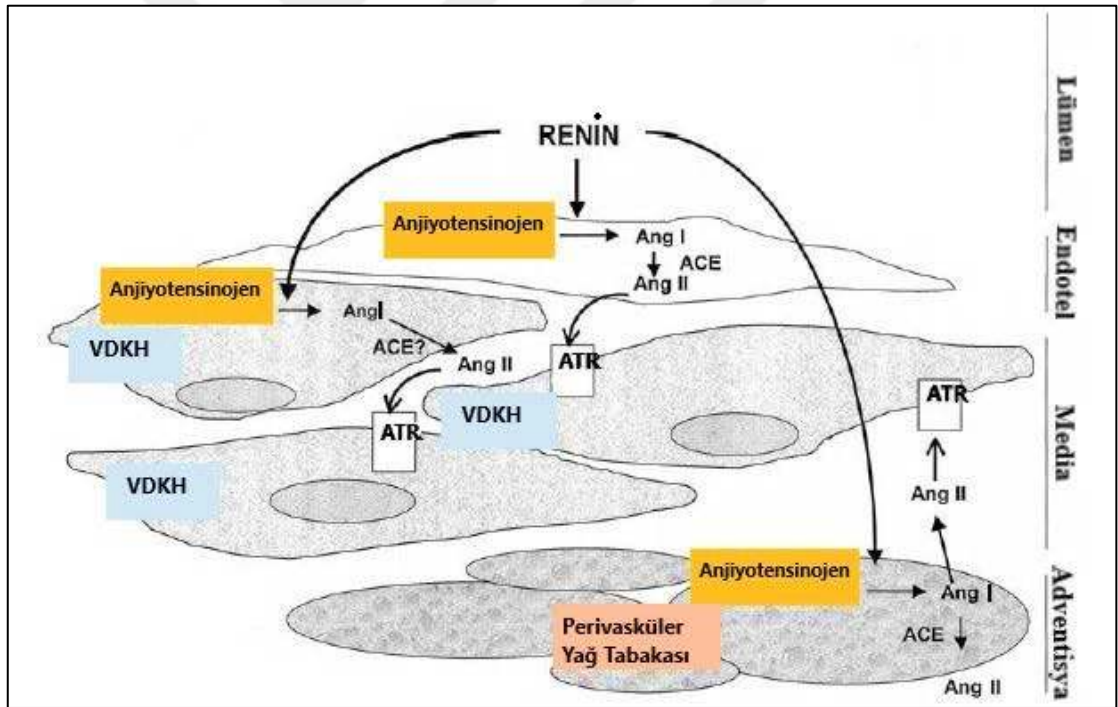
2.2. Lokal Renin Anjiyotensin Sistemi

Keşfinden bu zamana RAS büyüme devam etmekte yeni bileşenleri ve fonksiyonları tanımlanmaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda lokal RAS'ın dokudaki kronik etkilerin düzenleyicisi olduğu ileri sürülmektedir. Birçok araştırmada lokal RAS'ın kardiyovasküler fizyolojik ve fizyopatolojik süreçlerdeki önemli rolü belirtilirken halen bu sistem tam olarak aydınlatılamamıştır.¹³

Ang II'nin intrasellüler olarak sentezi birçok hücre türü tarafından yapılabilmektedir. Özellikle nöron, kardiyomiyosit, fibroblast, endotel, vasküler düz kas hücresi gibi bir çok hücre tarafından hem Ang II hem de RAS'ın diğer bileşenlerinin (anjiyotensinojen, Ang I, renin, ACE) sentezi lokal olarak yapılabilmekte olup mRNA ekspresyonları birçok farklı türde ve hücre tipinde gösterilmiştir.²³ İntrasellüler ACE immünohistokimyasal yöntemle kardiyomiyositlerde ve fibroblastlarda gösterilmiştir.

Hücre içerisinde gösterilen reninin bir kısmının hücresel kaynaklı bir kısmının da renal kaynaklı reninden sağlandığı, yeni yapılan çalışmalarda üzerinde durulan konuların başında gelmektedir. Kardiyomiyositlerin prorenin ve renini hücre içerisine aldığı ve prorenini hücre içerisinde aktifleştirdiği belirtilmektedir. Bu durum RAS'ı sadece endokrin bir sistemin parçası değil aynı zamanda parakrin ve intrakrin bir sistem yapmaktadır. Bununla birlikte sistemik RAS'ın lokal RAS'la ilişkili olduğu özellikle kan dolaşımında bulunan renin ve anjiyotensinojenin diğer dokular tarafından hücre içerisine alınabildiği de belirtilmektedir.^{23,49} Sistemik RAS kan hacmini, elektrolit ve su dengesini en önemlisi arteriyal kan basıncını düzenlerken, lokal RAS proliferasyon, büyüme, protein sentezinde rol oynamaktadır. Ayrıca intrasellüler RAS böbrek, kalp, beyin, üreme sistemi ve pankreas gibi organların işlevlerini lokal olarak düzenlemektedir. Lokal RAS bileşenlerinin patolojik durumlarda arttığı gösterilmiştir. Miyokard infarktüsü, kalp yetmezliği olanlar ile ACE inhibitörü ve ARB tedavisi alanlar ACE2 mRNA ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Atherosklerotik plakta da lokal RAS'ın aktif olduğu belirtilmiş olup ACE, Ang II ve ATR1'in yüksek değerlerde eksprese edildiği gösterilmiştir.^{50,51} Ayrıca yapılan çalışmalarda Ang II'nin kardiyak miyositlerin gelişimine ve hipertrofisine neden olduğu intrakrin etkilerinin de losartan gibi ATR1 blokerleriyle inhibe edilemediği ileri sürülmektedir. Hücre içine uygulanan ARB'lerin de intrasellüler Ang II'yi kısmen bloke edebildiği belirtilmektedir. Başka bir çalışmada da, diyabetik hastaların kalp dokusunda intrasellüler Ang II de anlamlı bir artış görülmüştür.⁵² Ang II'nin intrakrin etkileri tam olarak açıklanamamıştır. İntrasellüler Ang II'nin etkilerini ATR1 aracılığıyla olmayabileceği ileri sürülmüştür. Bu durum, Re ve ark. tarafından Ang II'nin kromatin ve gen ekspresyonu üzerine doğrudan etkisiyle açıklanmıştır.^{53,54} Aynı çalışmada ekstrasellüler Ang II'nin sinyal yollarını intrasellüler Ang II'ye göre daha güçlü aktive ettiği gösterilmiştir. Bu durumun kanıtı da ekstrasellüler Ang II'nin çok daha fazla hücre proliferasyonuna sebep olmasıdır. İntrasellüler RAS'ın hücre tiplerinde özgün olarak aktive olduğu veya birçok patolojik durumda selektif olarak aktive olabileceği düşünülmektedir.⁵⁵ İntrasellüler RAS Ca^{2+} girişine ve gen aktivasyonuna neden olmaktadır. Spontan hipertansif sıçanlardan elde edilen vasküler düz kas hücre kültüründe de Ang II'nin *de novo* sentez edildiği gösterilmiştir.⁵⁶ Artmış glukoz düzeyleri lokal RAS'ı aktive etmektedir.^{57,58} Yapılan bir çalışmada sıçan mezenşimal hücrelerinde prorenin,

anjiyotensinojen, ACE ve katepsin B'yi kodlayan genlerin ekspresyonlarını arttırdığı gösterilmiştir. Yüksek glukoz maruz bırakılan sıçan vasküler düz kas hücre kültüründe de Ang II'nin hücre medyumunda ve hücre lizatında anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir.⁵⁹ Aynı şekilde yüksek glukoz değerlerinde sıçan mezenkimal hücrelerinde prorenin sekresyonunun azaldığı ve bu durumun renin aktivitesini ve Ang II düzeyini arttırdığı belirtilmektedir.^{11,60} Ang II'nin nükleer membranda bağlanma noktalarının olması da fizyopatolojik süreçlerde rolü olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmalarda böbrek hücresi ve hepatosit nükleusunda ve kromatinde intrasellüler Ang II bağlanma bölgeleri olduğu belirtilmektedir. Ancak bu mekanizmanın nasıl meydana geldiği halen belirlenememiştir.^{51,55} Şekil 3'te vasküler dokuda intrasellüler RAS gösterilmektedir.



Şekil 3. Vasküler Dokuda İntrasellüler RAS.⁷

Beyin RAS: Renin, ACE, anjiyotensinojen ve ATR'lerin sıçan ve fare beyinde lokal olarak bulunabildiği gösterilmiştir. Beyin RAS bileşenleri birçok nörobiyolojik etkiye aracılık etmektedir. ATR1'in aktivasyonu su ve tuz alımını, kan basıncı ve vazopressin salınımını sağlarken, ATR2'nin uyarılması ise nöronal hasar sonrası

muhtemel nöronal rejenerasyonu ve apoptozu sağlamaktadır. Ang II, öğrenme ve hafıza yanıtlarını içeren beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde de görev almaktadır.^{5,30,61,62}

Yağ Dokusunda RAS: Yağ dokusu lokal RAS'ın tüm bileşenlerini (renin ve renin reseptörleri de dahil) içermektedir. Bu sistem viseral yağ doku yoğunluğunun düzenlenmesinden sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca viseral RAS metabolik sendromun patofizyolojisinde de önemli rol oynamaktadır. Yağ doku hem lokal hem de dolaşımdaki anjiyotensinojenin önemli bir kaynağıdır. Ancak bu insanlarda gösterilememiştir.^{63,64}

2.3. Diyabetes Mellitus (DM)

2.3.1. Tanımı ve Önemi

DM, insülinin mutlak eksikliği, sentez ve sekresyon bozukluğu ve/veya reseptör ve postreseptör düzeyde etkisinin yeterli olmaması sonucu gelişen, karbohidrat, lipid ve protein metabolizmasında bozulma ve kronik hiperglisemi ile karakterize heterojen bir grup metabolik hastalıktır.⁶⁵ Hiperglisemi ve eşlik eden metabolik düzensizlik birçok organda özellikle böbrekler, gözler, sinirler ve kan damarlarında ikincil hasarlanmalara sebep olmaktadır.^{66,67}

DM'nin yaygınlığı giderek artarak önlem alınması gereken bir düzeye ulaşmıştır. Dünya Sağlık Örgütüne (DSÖ) göre dünya genelinde yaklaşık 400 milyon civarında diyabetik hastanın bulunduğu, 2025 yılında ise bu rakamın ikiye katlanacağı düşünülmektedir. Gelecek 20 yılda nüfusun % 4,4'ünü kapsayacağı öngörülmektedir. Diyabetes mellitus tüm dünyada ölüm nedenleri arasında 8. sırada yer almaktadır.^{67,68}

DM genetik, çevresel faktörler ve yaşam şekli değişiklikleri sonucu ortaya çıkan bir hastalık olup DM hastalarının % 5-10'u tip 1 DM'li iken % 90- 95'i tip 2 DM'lidir. Tip 1 DM otoimmün bir nedenle pankreasın beta hücrelerinin hasarlanması sonucunda meydana gelirken, tip 2 DM ise değişik derecelerde insülin direnci, bozulmuş insülin sekresyonu ve glukoz üretiminde artış sonucunda meydana gelmektedir.⁶⁹ Bu iki tipin dışında gebelikte görülen gestasyonel diyabetes mellitus (GDM) ve diğer spesifik diyabet tiplerinin de bulunduğu bilinmektedir.^{70,71}

Diyabet veya prediyabet tanısı açlık plazma glukozu (APG), 2 saatlik oral glukoz tolerans testi (OGTT) ve glikozillenmiş hemoglobin A1c (HbA1c) ölçümleri ile konulmaktadır. En az 8 saatlik gece boyu açlığı takiben plazma glukoz düzeyinin ölçülmesi halen en fazla kabul gören ve pahalı olmayan bir yaklaşım olarak bilinmektedir. En az 2 kez bakılan APG düzeyi 126 mg/dL veya üzerinde ise DM tanısı konulmaktadır.^{69,72} Diyabet riski yüksek olan kişilerde OGTT yapılması diyabet ve prediyabet tanısı konmasında faydalı olarak görülmektedir. Bunun için kişiye 75 gram glukozlu sıvı içirildikten 2 saat sonra kan glukoz düzeyinin 200 mg/dL veya üzerinde olması diyabet tanısını koydurmaktadır. Poliüri ve polidipsi gibi diyabet semptomları varlığında rastgele bir zamanda ölçülen plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dL veya üzerinde olması da diyabet tanısı koydurmaktadır.^{72,73} Yakın zamanda, standardize edilmiş HbA1c ölçümü de DM'nin tanı kriterleri arasına girmiştir. Buna göre HbA1c $\geq$ % 6,5 (48 mmol/mol) olması diyabet tanısı için eşik değer kabul edilmiştir. Bir başka deyişle HbA1c $\geq$ % 6,5 olması tanı koydurmaktadır. Bununla birlikte ölçüm standardizasyondaki sorunlar sebebiyle diğer tanı kriterlerinden biri ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği belirtilmektedir.⁷²

2.3.2. Diyabetes Mellitus'un Vasküler Etkileri

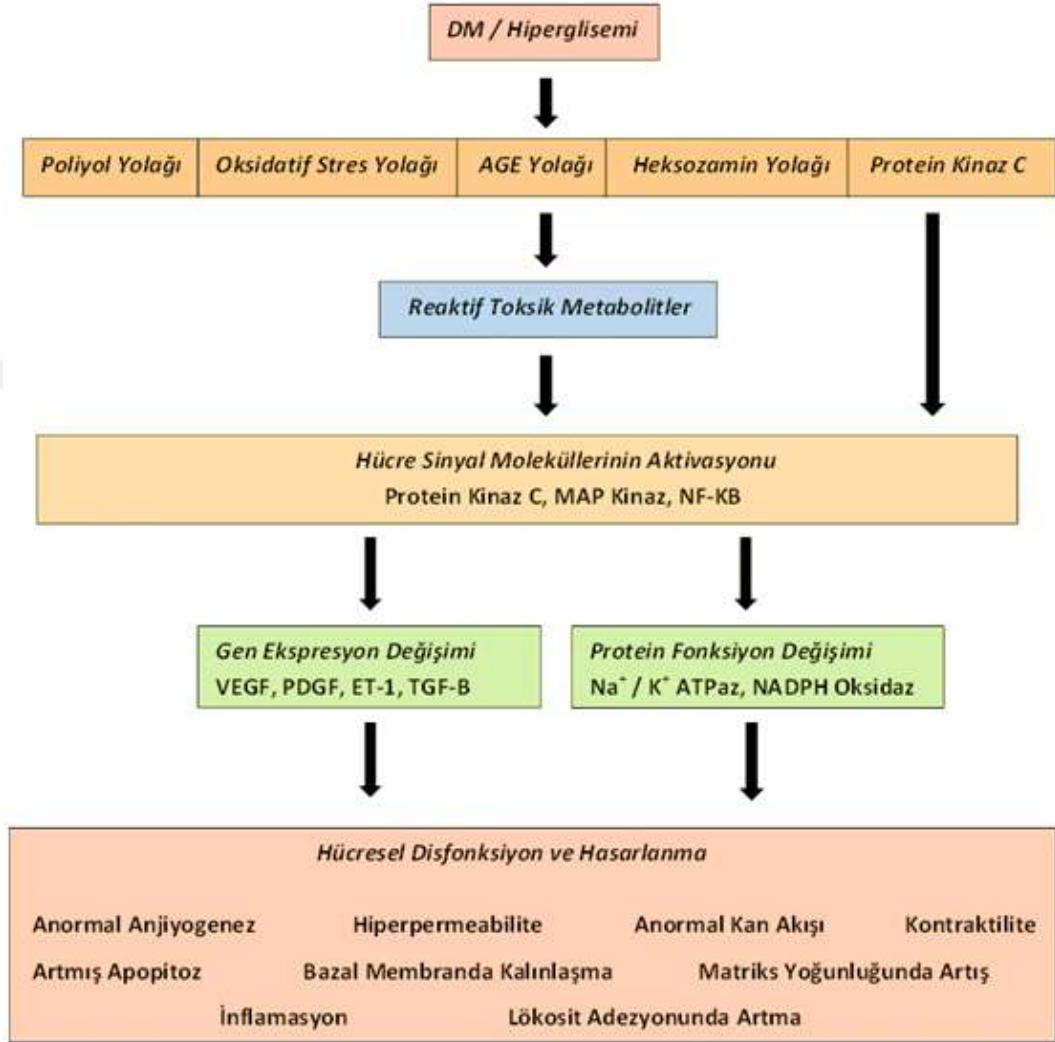
DM, vasküler dokuyu da kapsayan birçok organda disfonksiyona sebep olan metabolik bir hastalık olarak bilinmektedir.^{74,75} Diyabetin tüm vücut organ ve sistemlerini etkileyen akut, erken ve geç dönem komplikasyonlarından esas olarak açlık ve tokluk hiperglisemisi sorumludur. Diyabetin uzun dönem komplikasyonlarının patogenezinin multifaktöryel olduğu belirtilmektedir. Çok sayıda çalışmada DM'nin kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde en önemli risk faktörleri arasında olduğu belirtilmiştir.⁷⁶ Yirmi yıllık takipler sonrasında aterosklerotik kardiyovasküler hastalık gelişme oranının diyabetik hastalarda, diyabetik olmayanlara göre 2–3 kat arttığı 1979 yılında yayınlanan Framingham çalışması ile gösterilmiştir.⁷⁷ DM'nin son dönem böbrek yetmezliği, körlük, morbidite ve mortalitenin ana nedenlerinden olduğu da bildirilmektedir. Ayrıca tip 2 DM'nin komplikasyonları sonucunda meydana gelen tüm ölümlerin % 70'inin nedeni kardiyovasküler hastalıklar sebebiyle olduğu belirtilmektedir. Diyabetiklerde kardiyovasküler komplikasyonların oluşumunda, hızlanmış aterosklerozun anahtar rol oynadığı ifade edilmektedir.^{76,78,79} Bununla birlikte

diyabetik olgularda aterosklerotik plakların diffüz dağılım gösterdikleri ve daha karmaşık yapıda oldukları belirtilmektedir.⁸⁰ Endotel hücresi kaybına ve disfonksiyonuna neden olan bu damar zedelenmesi, düz kas hücresi çoğalmasını ve eşlik eden matriks sentezini uyarmaktadır. Zedelenmiş damarlardaki iyileşmeyle birlikte düz kas hücreleri veya düz kas hücresi öncülleri intimaya göç etmektedir. Bu bölgede bu hücreler çoğalmakta ve ekstrasellüler matriks (ESM) sentezi yaparak, fibroblastların yarayı doldurmasına benzer şekilde, intakt bir endotel tabakası içeren bir neointima oluşturmaktadır. Bu neointimal yanıt enfeksiyon, inflamasyon, immün zedelenme, balon kateter veya hipertansiyonla meydana gelen fiziksel travma, toksik ajana maruziyet dahil her türde damar zedelenmesi veya disfonksiyonunda oluşmaktadır. Düz kas hücreleri hem normal damar onarımında hem de ateroskleroz gibi patolojik süreçlerde yer almaktadırlar.⁷⁸

Çeşitli uyarılara yanıt olarak düz kas hücreleri proliferere olabilmekte; ESM kollajeni, elastin ve proteoglikan üretimini artırabilmekte ve büyüme faktörleri ile sitokinlerin salınımını sağlayabilmektedir.⁷⁶ Düz kas hücrelerinde ayrıca fizyolojik veya farmakolojik uyarılara yanıt olarak vazokonstriksiyon veya vazodilatasyon gerçekleştirmektedir. Düz kas hücrelerinin yer değiştirme ve çoğalma faaliyetleri çok sayıda faktör ile düzenlenmektedir.⁸¹ Büyümeyi tetikleyen faktörler arasındaki en önemlileri PDGF, endotelin, trombin, fibroblast büyüme faktörleri ve interferon- γ (IFN- γ) ile interleukin-1 (IL-1) gibi inflamatuvar mediyatörlerdir. Düz kas hücrelerinin pasif duruma geçmesini tetikleyenler arasında ise heparan sülfat, NO ve transforming büyüme faktörü- α (TGF- α) sayılabilmektedir. Diyabetlilerde gelişen kardiyovasküler komplikasyonlardan olan hipertansiyonun fizyopatolojik süreçleri üzerine literatürde oldukça fazla sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen bu konu tam olarak aydınlatılamamıştır.⁷⁴

Kronik hiperglisemi diyabetteki vasküler komplikasyonların başlamasında anahtar rol oynamaktadır.⁸² DM ile ortaya çıkan vasküler disfonksiyonda hiperglisemiyle ilişkili çok sayıda mekanizma ortaya çıkarılmıştır.⁸³ Diyabetteki yüksek glukoz düzeyinin neden olduğu vasküler patolojinin altında yatan mekanizma sorbitol ve fruktoz birikimine neden olan poliyol yolağı, ileri glikasyon son ürün (AGE) oluşum yolu, protein kinaz C (PKC), heksozamin yolu ve RAS aktivasyonunu içeren beş farklı yol ile oluşan vasküler doku hasarı ile açıklanmaya çalışılmaktadır. Halen hangi yolağın

baskın rol oynadığı belirsizliğini korumaktadır.^{84,85,86} Şekil 4'te DM'nin vasküler dokuda oluşturduğu fizyopatolojik etkilerin mekanizmaları gösterilmektedir.



Şekil 4. Diyabetes Mellitus'un Vasküler Dokuda Fizyopatolojik Etki Mekanizmaları.^{64,65}

AGE oluşumu hiperglisemi varlığında artış göstermektedir. AGE'ler non-enzimatik yolla protein, lipid ve nükleik asitlerin glikasyonu sonucunda geri dönüşümü olmayacak şekilde oluşmaktadır. Proteinlerin aldehit ve keton gruplarına kovalent bağlanmasıyla oluşan non enzimatik şekerler, serbest aminoasitlere redükte edilerek labil schiff bazlar meydana gelmektedir.⁸⁷ Daha sonra schiff baz yeniden düzenlemelerle daha stabil bir ketoamin olan amadori ürünlerine dönüşmektedir. Amadori ürünlerinin reaktif olan serbest karbonil grupları glikasyonun biyolojik

sonuçlarından sorumlu tutulmaktadır. AGE'ler birçok açıdan kan damar duvarı fonksiyonuna ve bütünlüğüne aşırı derecede zararlı olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca AGE'ler ekstrasellüler aralıkta ve damar duvarı hücreleri arasında birikerek diyabette artmış ateroskleroza neden olmaktadır.^{88,89} Bununla birlikte Low Density Lipoprotein (LDL)'yi de okside ederek atherogenezin ilerlemesine sebep olup intimal kollajende patolojik değişiklikler yapmaktadır. Ateroskleroza sebep olan ikinci bir hasar oluşum şekli, AGE birikiminin dolaşımdaki kan hücrelerinin damar duvarına adhere olmasına sebep olmasıdır. Üçüncü olarak da mekanik olmayan hasar kaynağı ise AGE'nin çok çeşitli reseptörlere bağlanmasıyla hücresel fonksiyonda bozukluklara sebep olmasıdır. AGE'ler ileri glikasyon son ürün reseptörüne (RAGE) bağlanmaktadır. RAGE 45 kDa ağırlığında bir protein olup çok sayıda RAGE tipi mevcuttur. Bunlar arasında AGE-R1 (p60), AGE-R2, AGE-R3 (galektin-3), Lipoprotein Reseptörü-1 (LOX-1) ve glikoprotein-III-B (CD 36)'dir. RAGE immünoglobulin süper ailesine üyedir ve çok sayıda ligandı diyabetik dokularda artmış olarak görülmektedir.⁹⁰ Bu reseptörler endotel ve damar düz kasında bulunan makrofajlar ve T hücreleri tarafından da eksprese edilmektedir. AGE-RAGE bağlanmasıyla birçok sinyal yolağı aktive olmaktadır. NADPH oksidaz, MAPK (mitojen-aktive protein kinaz)/ERK (ekstrasellüler sinyal-regüle kinaz), PKC- α artmaktadır.

İntimal makrofajlardan sitokinlerin ve çoğalmayı sağlayan etkenlerin salınması, endotel hücrelerinde reaktif oksijen türevlerinin üretimi, endotel hücrelerinde ve makrofajlarda prokoagulan etkinliğinde artış, damar düz kas hücrelerinde çoğalma ve ekstrasellüler matriks sentezinde artış gerçekleşmektedir.^{84,91} Damar yapısında AGE'lerin endotel yüzeyindeki RAGE'lerle etkileşimi sonucunda intrasellüler ROS indüksiyonu meydana gelmektedir.⁸³ Böylece NADPH oksidaz aktivasyonu gerçekleşmekte ve ROS duyarlı transkripsiyon nükleer faktörü NF- κ B aktive olmaktadır.^{92,93} Hücre stresi, hücre disfonksiyonu, ve hedef organ hasarı yaparak komplikasyon oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Altı çizilmesi gereken bir ihtimal olarak da RAGE'lerin sadece diyabet komplikasyonlarının oluşumunda değil aynı zamanda Tip 1 ve Tip 2 diyabetin ortaya çıkmasında da görevli olabileceğidir.¹⁴

PKC, serin treonin kinaz ailesinden düzenleyici bir enzim olup birçok damar fonksiyonunda ve sinyal transdüksiyonunda görevli olduğu belirtilmektedir. Hiperglisemi ile indüklenmiş oksidatif stres ve AGE-RAGE bağlanması PKC'yi aktive

etmektedir.⁹² PKC vasküler dokuda hücre geçirgenliğinde artışta, ekstraselüler matriks sentezi, hücre büyümesi, sitokin aktivasyonu, anjiyogenez ve vasküler düz kas kontraktilitesinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. PKC, hücre içi kalsiyum ve DAG ile aktive edilmekte ve birçok hücrel sistemde önemli bir taşıma yolağı olduğu belirtilmektedir. Diyabette DAG oluşumunda artış görülmüştür. Hücre içindeki yüksek glukoz düzeyi glikolitik ara moleküllerden *de novo* DAG sentezini uyaramaktadır. Böylece PKC aktivasyonu gerçekleşmektedir. Hiperglisemide DAG artışı glikolizde gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) inhibisyonu ve gliseraldehit-3-fosfat oluşumuyla da meydana gelmektedir.⁹⁴ Hiperglisemi ile aktive olan bu biyokimyasal yolların ortak bir özelliği, reaktif oksijen ürünlerinin üretimiyle de ilişkili olmasıdır. Reaktif oksijen ürünlerinin artışının da endoplazmik retikulumda fonksiyon bozukluğuna neden olduğu, katlanmamış proteinlerin birikimini artırdığı ve sonuç olarak da proinflamatuvar yolların uyarıldığı ve DNA hasarına neden olduğu savunulmaktadır.^{67,91} Bu yolların aktive olması sonucunda sitokinler, monosit ve makrofajların migrasyonunu artırmakta ve damar düz kas hücresinde proliferasyonu artırıcı etki göstermektedir. Böylece diyabetik hastalarda aterosklerotik plak oluşumunun hızlandığı ileri sürülmektedir.^{71,91} Ayrıca PKC'nin vasküler permeabilityi düzenleyici bir etkisinin olduğu, bunun yanında vazodilatör bir ajan olan NO ve vazokonstriktör ajanlar Ang II ve endotelin-1 artışını da sağladığı belirtilmektedir.⁹⁵

Diğer bir vasküler patolojik mekanizma ise poliyol yolağının aktivasyonudur. Sinir, lens, böbrek ve kan damarı gibi bazı dokularda glukoz hücre içerisine insülin aracılığıyla taşınmamaktadır. Bu sebeple hiperglisemi sonucunda bu yapılarda hücre içerisinde glukoz artmaktadır. Hücre içerisinde giren glukoz aldoz redüktaz enzimi yardımıyla sorbitol ve poliyol yapılarına dönüşmekte en son olarak da fruktoza çevrilmektedir. Normoglisemik durumda glukozun çok küçük bir kısmı sorbitole dönüşürken hiperglisemik durumda aldoz redüktaz enziminin de aktive olmasıyla birlikte intrasellüler sorbitol oluşumu artmaktadır. Hücre içerisinde sorbitol artışı hücrenin osmotik basıncının atmasına ve şişmesine daha da önemlisi hücre zarının parçalanmasına neden olabilmektedir. Bu fizyopatolojik mekanizmalar sonucunda da hücrelerin hasarlanmasıyla birlikte DM'nin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları ortaya çıkmaktadır.⁹⁶

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda deney hayvanı olarak Wistar albino 180-200 g ağırlığında 8 haftalık erkek sıçanlar kullanıldı. Tezde hayvanlar üzerinde yapılan tüm deneysel uygulamalar Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 22.12.2016 tarihli toplantı 1 nolu kararına uygun olarak yapıldı. Deney hayvanları Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilerek bölümümüzde yer alan hayvan bakım odalarında barındırıldı. Sıçanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık sağlayan otomatik denetleyici cihaz ile ayarlanan hayvan bakım odasında barındırıldı. Ortam sıcaklığı (21 ± 1 °C) ve nemi (% 40-60) olacak şekilde klimayla devamlı kontrol altında tutuldu. Deney hayvanlarının yemleri MBD Yem Ticareti'nden temin edilmiş olup bu yemler herhangi bir kısıtlama olmadan (*ad libitum*) verilmiştir. Tüm deney hayvanlarının su ihtiyaçları da herhangi bir kısıtlama olmadan çeşme suyuyla karşılanmıştır (Şekil 5).



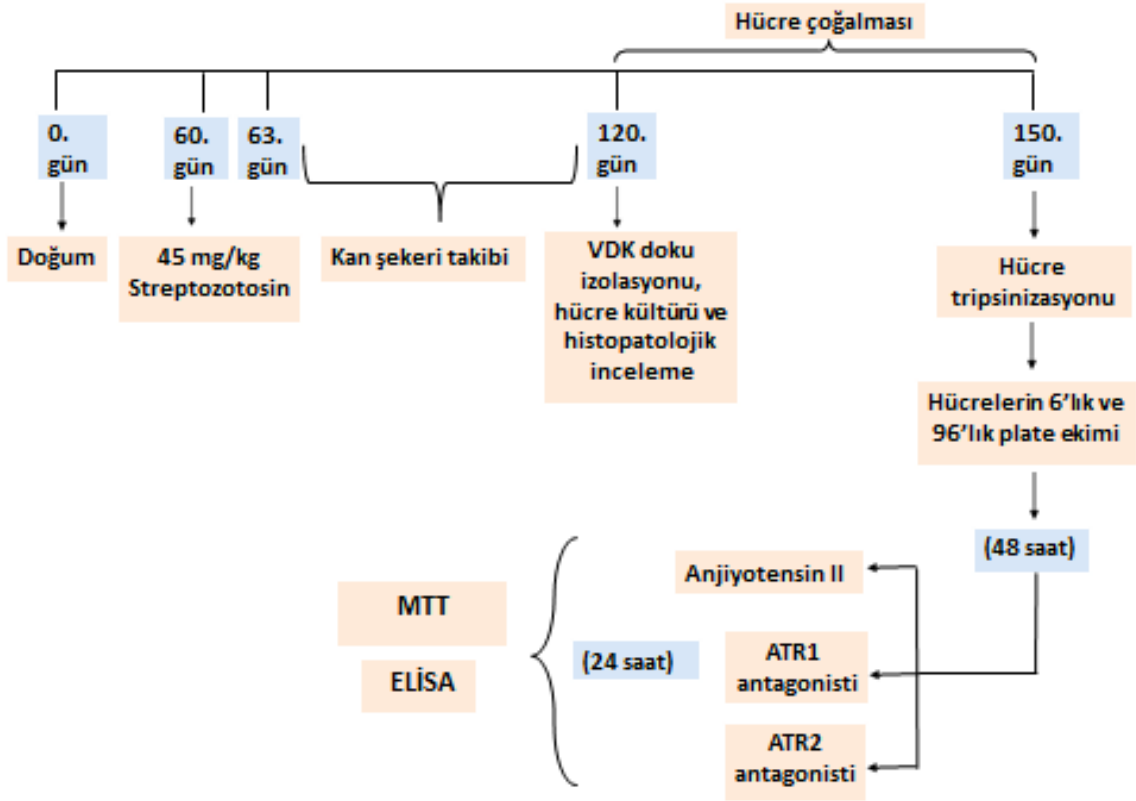
Şekil 5. Hayvan Bakım Odası ve Kafesler.

Sıçanların bir kısmına 45 mg/kg dozunda STZ kuyruk veninden intravenöz (IV) verilerek deneysel diyabetik model grubu oluşturuldu. Kontrol grubundaki hayvanlara ise aynı hacimde sitrat tamponu uygulandı. Kontrol grubu olarak sağlıklı ve diyabet

oluşturulan sıçanların (diyabet geliştikten 8 hafta sonra) aorta düz kas dokusundan primer düz kas hücre kültürü yapıldı. Elde edilen hücrelerin bir kısmı Ang II (0,0001 μ M, 0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M ve 1000 μ M), ATR1 antagonisti Olmesartan (1 μ M) ve ATR2 antagonisti PD123,319 (1 μ M) ile 24 saat muamele edilerek hücre çoğalması ve canlılığı MTT yöntemiyle spektrofotometrik olarak 570 ve 630 nm’de değerlendirildi. Hücre medyumunda ve hücre lizatında spektrofotometreyle 450 nm dalga boyunda ölçüm yapılarak ELİSA yöntemiyle Ang II düzeyi kantitatif olarak değerlendirildi. Çalışmamızda yer alan deney grupları Tablo 2’de, deney akış şeması Şekil 6’da belirtilmiştir.

Tablo 2. Deney Grupları.

Kontrol	Diyabet
1.Kontrol düz kas hücre kültürü (KDKHK) grubu	9.Diyabetik düz kas hücre kültürü (DDKHK) grubu
2. KDKHK + Ang II	10. DDKHK + Ang II
3. KDKHK + ATR1 antagonisti	11. DDKHK + ATR1 antagonisti
4. KDKHK + ATR1 antagonisti + Ang II	12. DDKHK + ATR1 antagonisti + Ang II
5. KDKHK + ATR2 antagonisti	13. DDKHK + ATR2 antagonisti
6. KDKHK + ATR2 antagonisti + Ang II	14. DDKHK + ATR2 antagonisti + Ang II
7. KDKHK + ATR1 antagonisti + ATR2 antagonisti	15. DDKHK + ATR1 antagonisti + ATR2 antagonisti
8. KDKHK + ATR1 antagonisti + ATR2 antagonisti + Ang II	16. DDKHK + ATR1 antagonisti + ATR2 antagonisti + Ang II



Şekil 6. Deney Akış Şeması

3.1. Çalışmada Kullanılan Solüsyon, Kimyasal ve Kitler

1. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), D6046, 500 mL, 3,7 g/L NaHCO₃, 1000 mg/L D-glukoz içeren, pirüvatsız, Sigma-Aldrich, Buzdolabında 2-8 °C'de saklandı.
2. Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), F0435, 500 mL, 4500 mg/L glukoz, L-glutamin ve Na bikarbonat içermeli, pirüvatsız olmalı, Biochrom Merck, Buzdolabında 2-8 °C'de saklandı.
3. Hank's Balanced Salt solution (HBSS), Ca²⁺ ve Mg²⁺ içermeyen, fenol kırmızısı içeren, 0,35 g/L NaHCO₃, Biochrom Merck, L2055, 500 mL, buzdolabında 2-8 °C'de saklandı.
4. Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific), buzdolabında -20 °C'de saklandı.

5. Penicillin-Streptomycin (PSA), solüsyon, 10,000 ünite penisilin ve 10 mg streptomisin/mL, steril filtreden geçirilmiş, BioReagent, hücre kültürü için uygun, P4333-100 mL, Sigma-Aldrich, buzdolabında -20 °C’de saklandı.
6. Trypsin-EDTA Solution, % 0,25 steril filtreden geçirilmiş, BioReagent, hücre kültürü için uygun, T4049-100 mL, SigmaAldrich, buzdolabında -20 °C’de saklandı.
7. RIPA Lysis Buffer System, Santa Cruz Biotechnology, Inc., SC-24948A, 500 mL, buzdolabında -20 °C’de saklandı.
8. Ketazol (Ketamin) % 10, 10mL, buzdolabında 2-8 °C’de saklandı.
9. Rompun (Ksilazin HCl) % 2, buzdolabında 2-8 °C’de saklandı.
10. HEPES, $\geq$ % 99,5 (titrasyon), H3375, Sigma-Aldrich, oda sıcaklığında saklandı.
11. Bovine Serum Albumin (BSA) A3156-5G lipofilize toz, γ -irradiated, globulinsiz, BioXtra, hücre kültürü için uygundur, Sigma-Aldrich, Buzdolabında 2-8 °C’de saklandı.
12. Dimethyl sulfoxide (DMSO), EMPLURA®, Merck, 1 lt, M1167431000, oda sıcaklığında muhafaza edildi.
13. Calcium chloride dihydrate, BioReagent, hücre kültürü için uygundur, C7902-500G Sigma-Aldrich, oda sıcaklığında saklandı.
14. Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, toz şeklinde, BioReagent, hücre kültürü için uygun, $\geq$ % 97,5 (HPLC), M5655-1G, Sigma-Aldrich, buzdolabında 2-8°C’de saklandı.
15. Streptozocin, $\geq$ % 75 α -anomer basis, $\geq$ % 98 (HPLC), toz şeklinde, S0130-1G, Sigma-Aldrich, buzdolabında -20 °C’de saklandı.
16. [Val⁵]-Angiotensin II acetate salt hydrate, toz şeklinde, $\geq$ % 95 (HPLC), A 2900-50 mg, 25 mg/mL’de saf suda çözüldü. Sigma-Aldrich, buzdolabında -20 °C’de saklandı.
17. PD 123,319 di(trifluoroacetate) salt hydrate, toz şeklinde, $\geq$ % 98 (HPLC), P 186-10 mg Sigma-Aldrich, 10 mg/mL’de saf suda çözüldü. Buzdolabında 2-8 °C’de saklandı.
18. Olmesartan, $\geq$ % 98 (HPLC), SML 1394-50 mg, Sigma- Aldrich, DMSO’da 20 mg/mL’de çözüldü. Buzdolabında 2-8 °C’de muhafaza edildi.

19. Elastase from porcine pancreas, lipofilize toz, hücre kültürü için uygun, E7885-5MG, Sigma-Aldrich, -20°C’de saklandı.
20. Trypsin inhibitor from Glycine max (soybean) (STİ), toz formunda, BioReagent, hücre kültürü için uygun, T6522-100 mg, Sigma-Aldrich, buzdolabında 2-8 °C’de saklandı.
21. Folin&Ciocalteu’s Phenol Reagent, Sigma-Aldrich, F-9252, 100 mL, oda sıcaklığında saklandı.
22. Collagenase from Clostridium histolyticum, lipofilize toz içeren, ≥ 125 CDU/mg toz (CDU = collagen digestion units), 0,5-5,0 FALGPA unite/mg toz, C2674-100 mg, Sigma-Aldrich, buzdolabında -20 °C’de saklandı.
23. Potassium sodium tartarate tetrahydrate cryst extra pure ($C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$), A5011285, Merck, 1 kg, oda sıcaklığında saklandı.
24. Copper (II) sulfate 5 hydrate cryst extra pure ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), A794587, Merck, 1 kg, oda sıcaklığında saklandı.
25. Sodium carbonate (Na_2CO_3), A759798, Merck, 1 kg, oda sıcaklığında saklandı.
26. Sodium hydroxide pellets pure (NaOH), C292462, Merck, 1 kg, oda sıcaklığında saklandı.
27. Angiotensin II ELİSA Kiti, serum, plazma, kültür süpernatanı ve hücre lizati için, RAB0010, Sigma-Aldrich, buzdolabında -20 °C’de saklandı. Şekil 7’de kimyasallar ve solüsyonların saklama koşulları gösterilmiştir.



Şekil 7. Kimyasallar ve Solüsyonlar.

3.1.1. Enzim Ayırışma Solüsyonunun Hazırlanması (EAS)

Media tabakası izole edildikten sonra 1-2 mm²'lik küçük parçalara ayrılarak EAS içerisinde 45 dakika 37 °C'de inkübe edilerek dokunun ayrışması sağlandı. EAS hazırlamadan önce bütün solüsyonlar 37 °C'ye getirildi. EAS taze olarak hazırlandı. Bu işlemle doku aralarında bulunan fibroblastların uzaklaştırılması ve hücrelerin birbirlerinden ayrılması amaçlandı (Tablo 3).

Tablo 3. Enzim Ayırışma Solüsyonu Hazırlanması.

Eklenen Çözelti	Eklenen Hacim
HBSS	0,5 mL
HEPES	1 mL
Bovin Serum Albümin (BSA)	0,5 mL
Soya Tripsin İnhibitörü (STİ)	1 mL
Elastaz	0,25 mL
Kolajenaz	0,25 mL
Stok Ca ²⁺	0,5 mL
Toplam	4 mL

- 1. Stok Ca²⁺ Hazırlanması:** 58,8 mg CaCl₂ 2H₂O tartılıp, 1 mL distile suda çözüldü. Hazırlanan CaCl₂ çözeltisi şırınga ucu filtreden geçirildi. CaCl₂ çözeltisi -20°C'de saklandı.
- 2. Ca²⁺ Solüsyonunun Hazırlanması:** 20 µL stok Ca²⁺dan alındı. Falkon tüpü içerisinde bulunan 5 mL HBSS'ye eklendi.
- 3. HEPES Solüsyonunun Hazırlanması:** 71,55 mg HEPES tartılıp 5 mL HBSS ile çözüldükten sonra 0,22 µM çapı olan steril şırınga ucu filtreden geçirilerek falkon tüpü içerisinde hazır duruma getirildi.
- 4. Elastaz Hazırlanması:** 5 mg elastaz bulunan şişe 5 mL HBSS'de çözüldü. Falkon tüpü içerisinde hazırlanan solüsyon 500 µL olacak şekilde ependorf tüplerine bölündü. Kapak kısımları parafilm ile sıkıca sarılarak -20 °C'de saklandı.
- 5. Kolajenaz Hazırlanması:** 100 mg'lık şişedeki kolajenazı 12,5 mL HBSS'de çözülerek, ependorf tüplerinde 500 µL olacak şekilde bölündü. Buzdolabında -20 °C'de saklandı.

6. **Soya Tripsin İnhibitörü (STİ) Hazırlanması:** STİ 5 mg tartılıp, 5 mL HBSS'de çözüldü. Hazırlanan solüsyon steril şırınga uçlu filtreden geçirildi.
7. **Bovin Serum Albumin Hazırlanması:** BSA 2 mg tartıldı, 2 mL HBSS'de çözüldü. Hazırlanan solüsyon steril şırınga ucu filtreden geçirildi.

3.1.2. Transfer Medyumunun Hazırlanması

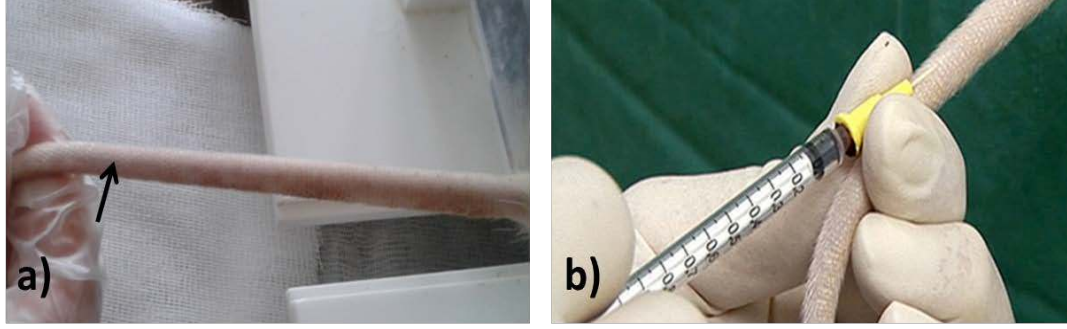
Torasik aortayı çıkardıktan sonra damarın canlılığını sürdürebilmesi ve steril kalması amacıyla transfer medyumu içerisine koyuldu. Transfer medyumu buzdolabında +4°C'de saklandı. Buzdolabı dışında ise buz içerisine kondu. Transfer medyumu 100 mL HBSS, 2 mL PSA ve 50 µL stok Ca²⁺ içmektedir.¹⁰⁰

3.1.3. Hücre Medyumunun Hazırlanması

Kültür hücreleri canlılıklarını hücre medyumunda devam ettirmektedir. Hücre medyumu, 450 mL DMEM, 50 mL FBS (% 20 olacak şekilde) ve 5 mL PSA'nın eklenmesiyle hazırlandı. 500 mL haznesi olan steril filtre ünitesiyle vakumlandı. Hazırlanan hücre medyumu 50 ml'lik falkon tüplere bölünerek, buzdolabında +4 °C'de saklandı. Kullanılmadan önce 37 °C'de su banyosunda ısıtıldı.

3.2. Deneysel Diyabetik Modelin Oluşturulması

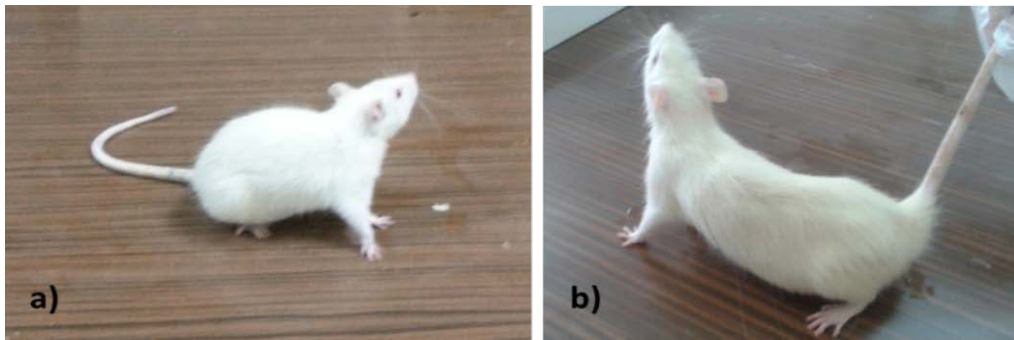
Ad libitum beslenen 180-200 g ağırlığındaki sağlıklı Wistar albino sıçana ketamin/ksilazin 100/10 mg/kg dozunda intraperitoneal (IP) uygulandı. Streptozotosin 45 mg/kg dozunda pH'sı 4,5 olan sitrat tamponunda çözülerek insülin enjektörüyle IV olarak kuyruk veninden verildi. Sitrat tamponu, 2,1 g (10 mmol/L) sitrik asit.H₂O bir miktar saf su içerisinde çözüldü. Üzerine 2,94 g (10 mmol/L) sodyum sitrat.2H₂O eklenerek son hacim 1 litreye tamamlandı; pH 4,5 olarak ölçüldü. Hazırlanan tampon buzdolabında saklandı. Şekil 8'de kuyruk veninden STZ uygulaması gösterilmektedir.



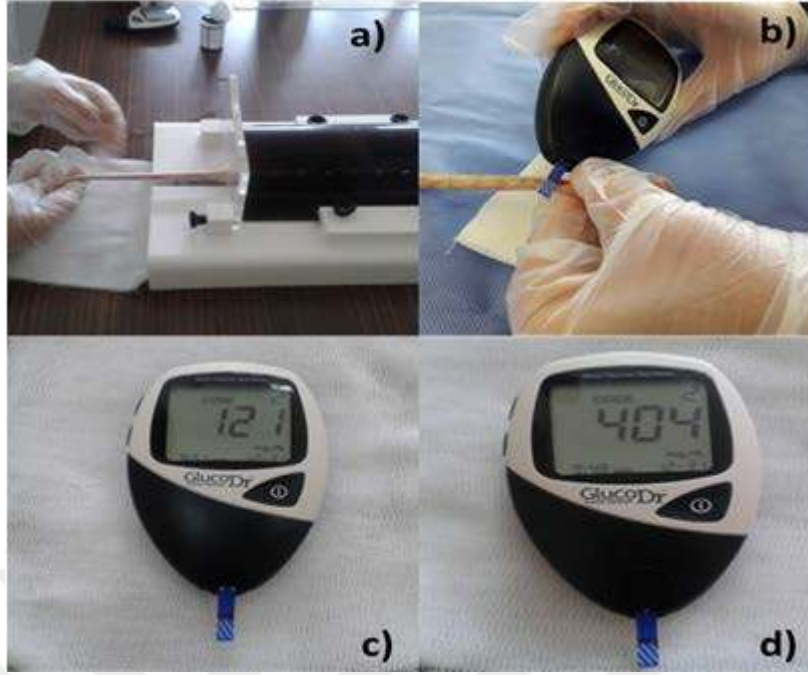
Şekil 8. Diyabetik Modelin Oluşturulması, a) Lateral Kuyruk Veni, b) Streptozotosinin Kuyruk Veninden Uygulanması.

3.2.1. Kan Glukoz Değerlerinin Ölçümü

Streptozotosin uygulamasından önce ve üç gün sonra sağlıklı ve diyabetik hayvanların kan şekeri ölçümleri yapıldı. Her bir hayvanın kuyruk veninden kan alınacak bölge önce alkolle silinip temizlendi. Kan alınacak yerin üst kısmına hafif baskı yapılarak ve ısıtılarak yüzeysel venöz damarın belirginleşmesi sağlandı. Damar hattı izlenerek 22 G'lik enjektör ucuyla 45 derecelik açıyla girilerek bir damla kan alındı. Kalibre edilmiş Gluco Dr marka glukometre ile kan şekeri ölçümü yapıldı. Kan glukoz değerleri 8 hafta boyunca haftalık olarak takip edildi. Sıçanlardan kan şekeri 250 mg/dL ve üzeri olanlar diyabetli gruba alındı. (Şekil 9, 10).



Şekil 9. Deney Hayvanları, a) Sağlıklı Sıçan, b) Diyabetik Sıçan.

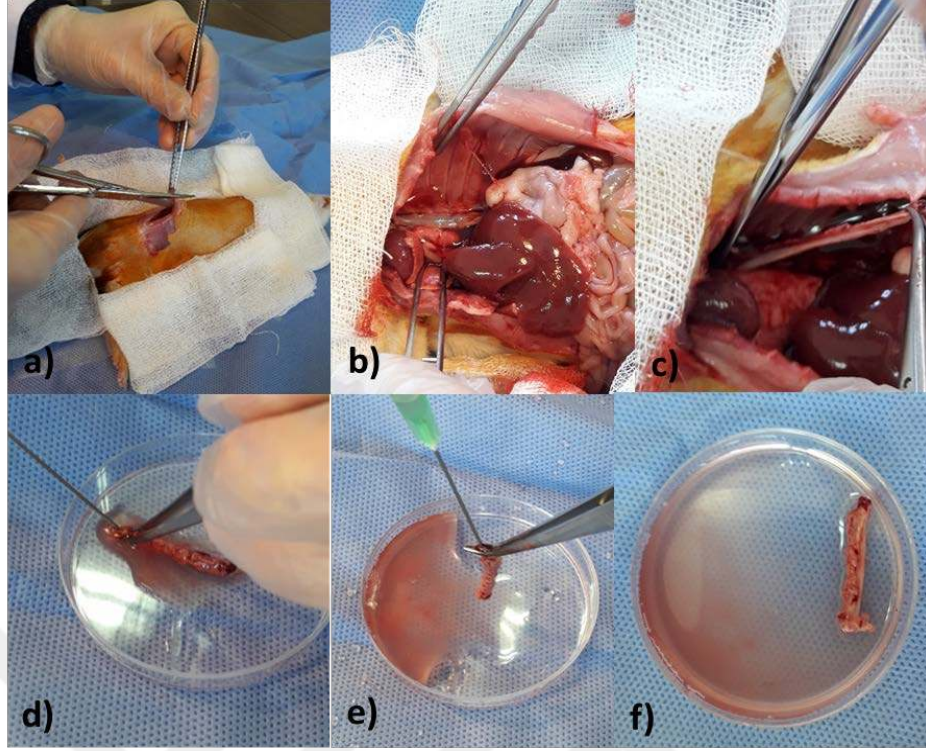


Şekil 10. Diyabetik Hayvan, a) Hayvanın Tutacağa Yerleştirilmesi, b) Glukometre İle Kan Şekerinin Ölçümü, c) Normal Sıçan Kan Şekeri, d) Diyabetik Sıçan Kan Şekeri.

3.3. Vasküler Düz Kas

3.3.1 Düz Kasın Elde Edilmesi

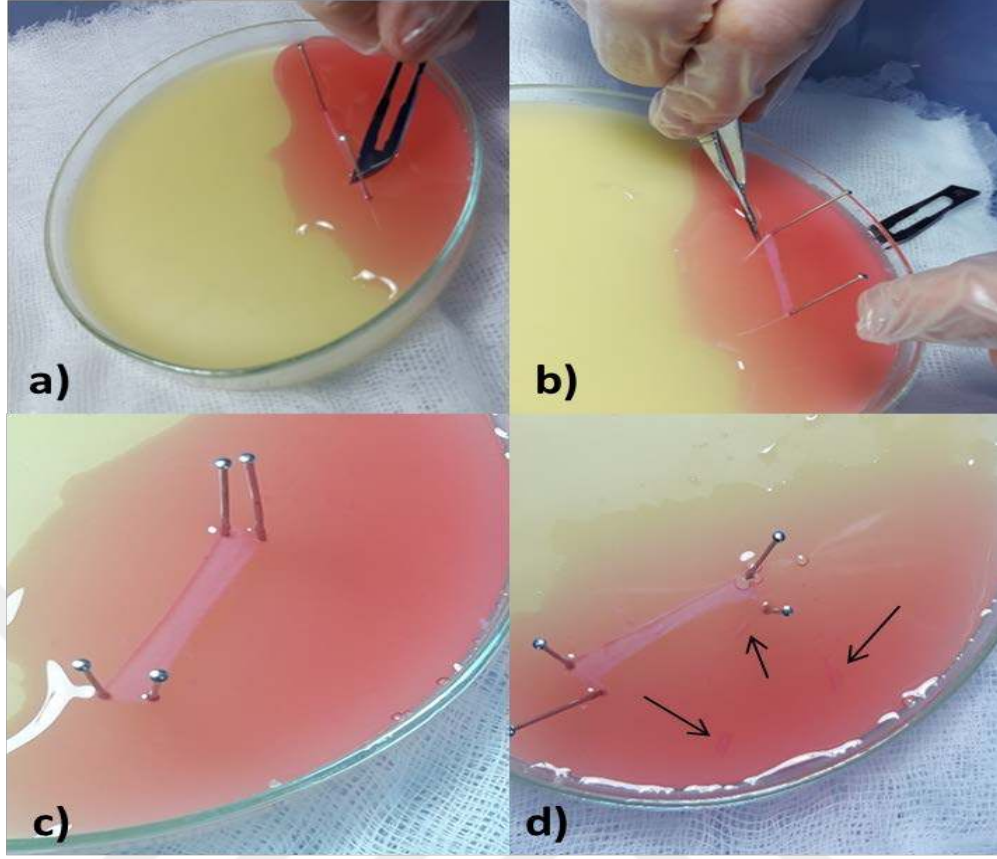
Wistar albino sıçanlara ketamin/ksilazin (100/10 mg/kg) anestezisi altında, kesi yapılacak bölge karın orta hattın göğse kadar tıraşlandı. Hayvanda kontaminasyon kaynağı olabilecek vücut bölgesi merkezden periferik povidon iyot yardımıyla temizlendi. Steril koşullar altında karın orta hattına yapılan insizyon ile deri, deri altı dokuları geçilerek abdominal aortaya ulaşıldı. Göğüs bölgesine doğru aorta takip edildi. Torasik aorta kesilerek transfer medyumuna alındı. Petri kabına alınan damar, kıvrık uçlu pensetle uç kısmından tutularak içerisinde 5 mL transfer medyumunu bulunduran enjektörle yıkandı. Damar lümeninin kan ve pıhtıdan temizlenmesi sağlandı.⁹⁷ (Şekil 11)



Şekil 11. Aorta'nın İzolasyonu, a) Karnın Orta Hattan Kesilmesi, b) Torasik Aortanın İzolasyonu, c) Aortanın Kesilmesi, d) Damarın Ucunun Pensetle Tutulması, e) Damar İçinin Solüsyonla Temizlenmesi, f) İzole Edilmiş Aorta.

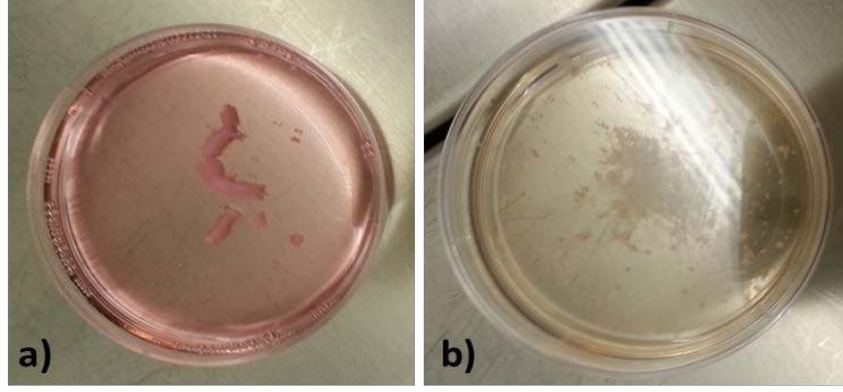
3.3.2. Düz Kas Hücre Kültürü

Transfer medyumunda içinde bulunan torasik aorta, mikro cerrahi makas ve kıvrık uçlu penset yardımıyla stereo mikroskop altında endotel ve bağ dokusundan temizlendi. HBSS, kalsiyum ve % 2 penisilin-streptomisin antibiyotiği (PSA) içeren transfer medyumunda içerisinde torasik aortanın adventisya tabakası uzaklaştırıldı. Damar toplu iğneler yardımıyla dört köşesinden gerildi. Buz kabında bulunan cam petri kabındaki parafin bloğa toplu iğneyle tutturularak kalan adventisya tabakasından ve doku kalıntılarından uzaklaştırıldı. Daha sonra steril mikro cerrahi makasla damar uzunlamasına kesildi. Endotel tabakası steril, ucu pamuk çubukla damar boyunca yavaş ve hafif bir şekilde kazındı. Media tabakasına ulaşıldığında damar ucundan başlanarak media tabakasının adventisyadan ayrılması sağlandı.^{98,99} (Şekil 12)



Şekil 12. Düz Kas İzolasyonu, a) Adventisya Tabakasının Bistüriyle Temizlenmesi, b) Aortanın Mikrocerrahi Makasla Kesilmesi, c) Aortanın İğneler Yardımıyla İç Yüzünden Gerilmiş Hali, d) İzole Edilen Media Tabakası.

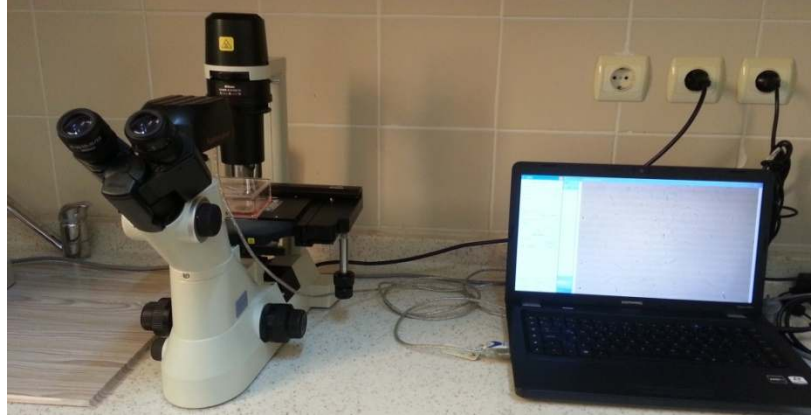
Steril Laminar Flow Kabinde media tabakası, içerisinde 4 mL enzim ayrışma solüsyonu bulunan petri kabına alınarak mikro cerrahi makas yardımıyla 1-2 mm²'lik küçük parçalara ayrıldı (Şekil 13). Enzim ayrışma solüsyonu içerisinde çalkalayıcıda 45 dak. 37°C'de inkübe edildi. Üzerine 8 mL hücre medyumunu eklenerek 3 dak. 1300 G'de santrifüj edildi. Pelet kısmı hücre medyumunu ile resüspanse edilerek 25 cm²'lik hücre kültür kabına ekim yapıldı. Hücreler % 5 CO₂ - % 95 hava içeren ortamda 37 °C'de inkübe edildi. İnvert mikroskop altında 4-5. günde hücrelere bakıldığında hücrelerin kültür kabının tabanına tutunarak yayıldığı ve çoğaldığı görüldü. Her 72 saatte bir kültürün hücre medyumunu değiştirildi.



Şekil 13. Enzim Ayrışma Aşaması, a) İzole Düz Kas Tabakası, b) Düz Kas Tabakasının 1-2 mm'lik Parçalara Ayrılmış Hali.

3.3.3. Hücre Pasajlanması ve Tripsinizasyon

İnkübatörde bulunan, daha önce ekimi yapılan hücreler 25 cm²'lik kültür kabının tabanını kapladığında bu hücrelerin tabandan kaldırılması için öncelikle kap 5 ml HBSS ile yıkandı. HBSS uzaklaştırıldıktan sonra tripsin-EDTA solüsyonu eklendi. Tripsin-EDTA'nın kültür kabının tabanına tamamen yayılması sağlanarak 90 saniye inkübatörde bekletildi. Hücrelerin kültür kabının tabanından kalkması sağlandı. Bu arada invert mikroskop altında hücrelerin kalkıp kalkmadıkları kontrol edildi. Kalkan hücrelerin yüzdüğü görüldükten sonra kültür kabı laminar flow kabinine alındı. İçerisine 8 mL hücre medyumunu eklenerek 1300 G'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpün üst kısmındaki süpernatant atıldı. Kalan pelet kısmına 1-2 mL hücre medyumunu eklenerek pipet yardımıyla birkaç defa çekip geri bırakıldı; peletin hücre medyumuyla karışması sağlandı. Oluşan hücre süspansiyonu otomatik pipetle çekilerek hücre yoğunluğuna göre 75 cm²'lik hücre kültür kabına konuldu. Kültür kabı inkübatöre konularak hücrelerin çoğalması için 4-5 gün beklendi. İnvrt mikroskopta bakılarak hücrelerin çoğalması gözlemlendi (Şekil 14,15). Üç dört günde bir VDKH kültürünün hücre medyumunu değiştirildi.^{97,99}



Şekil 14. Kültür Kabininin İnvart Mikroskopta İncelenmesi.



Şekil 15. İnkübatör ve Laminer Flow Kabin.

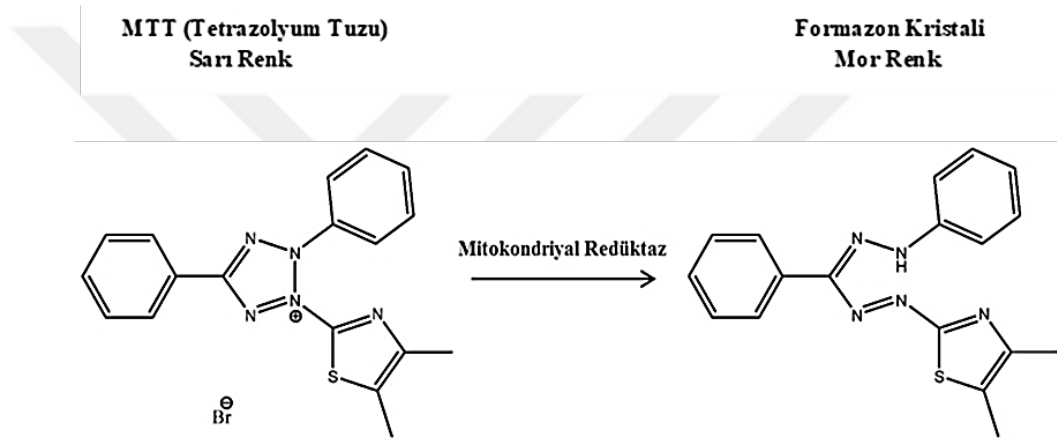
3.4. VDKH'lerin Boyanması

Vasküler düz kas hücreleri polilizinli lamlara ekilerek içerisinde hücre medyumunu bulunan petri kaplarına yerleştirildi. Düz kas hücrelerinin lam üzerinde yayılmaları ve çoğalmaları için inkübatörde 5-7 gün arasında bekletildi. Çukurova Üniversitesi Patoloji Anabilim Dalı tarafından preparatlar **α -smooth muscle actin (α -SMA)**, **kaldesmon** ve **kalponin** ile immünohistokimyasal (İHK) yöntemle boyanarak değerlendirildi. Çalışmada kullanılan hücrelerin VDKH olduğu doğrulandı.

3.5. MTT Yöntemi

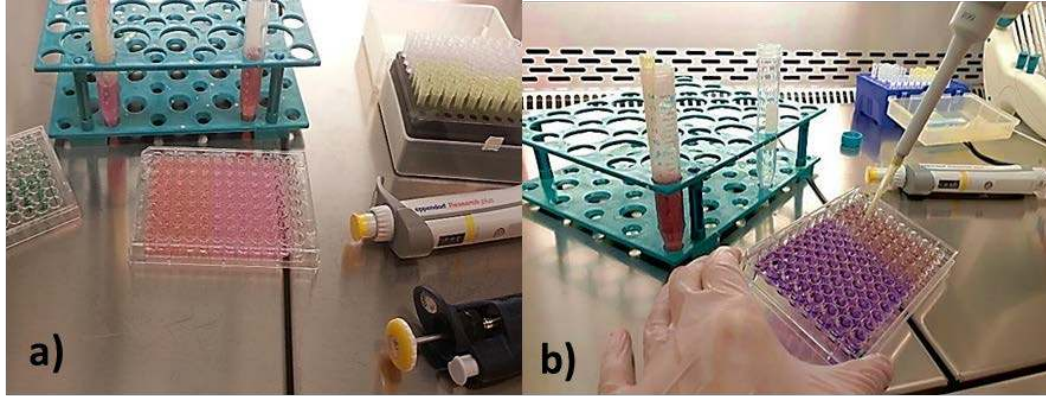
Çalışmamızda hücre çoğalması ve canlılığının değerlendirilmesi MTT yöntemiyle yapıldı. MTT yöntemi hücre proliferasyonu, canlılığı ve sitotoksitenin

değerlendirilmesinde kullanılan metabolik aktivite ölçümüne dayalı sıklıkla kullanılan hücre proliferasyon testidir.^{101,102} Bu yöntemle hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kantitatif olarak saptanabilmektedir. Sağlam hücrelerin mitokondrilerinde bulunan dehidrogenaz enzimlerinin MTT boyasını redükte edip tetrazolyum halkasını parçalamasıyla oluşan renk değişimi bu testle değerlendirilmektedir. Bu reaksiyon kırılğan bir mitokondriyal enzim olan süksinat dehidrojenazın aktivitesine bağlıdır. Canlı vasküler düz kas hücrelerde tetrazolyum halkasının parçalanması sonucunda soluk sarı renkli MTT boyası koyu mavi-mor formazon ürününe dönüşmektedir.¹⁰³ (Şekil 16)



Şekil 16. MTT'nin Formazon Kristaline Dönüşümü.¹⁰³

Yöntem temel olarak proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz aktivitesi ile sarı renkli suda çözülebilen tetrazolyumu kullanarak mor renkli formazona dönüşmesi sonucunda ortaya çıkan renk değişiminin absorbans değerinin plate okuyucu veya spektrofotometreyle kolorimetrik olarak ölçülmesi ilkesine dayanmaktadır (Şekil 17).



Şekil 17. Hücre Proliferasyonu, a) MTT Eklenmesiyle Oluşan Kahverengi Renk Değişimi, b) DMSO Eklenmesiyle Oluşan Mor Renk Değişimi.

Çoğalan hücreler proliferasyon göstermeyen hücrelere göre metabolik olarak daha çok aktivite gösterdiği için bu yöntemle sadece hücre canlılığı ve sitotoksikite değil hücre aktivasyonu ve proliferasyonu da değerlendirilmektedir. Tetrazolyum tuzu canlı hücre varlığında suda çözünmeyen formazon halkasına dönüştürülmekte ve DMSO gibi deterjan etkili solüsyonların eklenmesiyle formazon kristalleri çözülüp mor renge dönüşmektedir.⁷⁸

Proliferasyon çalışmasında dördüncü ve sekizinci kuşak arasındaki vasküler düz kas hücreleri 96 kuyucuklu kültür kabına her kuyucukta 5,000-10,000 hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler 37°C'de % 5 CO₂ - % 95 hava içeren inkübatör ortamında 24 saat inkübe edildikten sonra her kuyucuğa 100 µL Ang II (0,0001, 0,001, 0,01, 0,1, 1, 10 ve 100 µM, 1000 µM), ATR1 antagonisti Olmesartan (1 µM) ve ATR2 antagonisti PD123,319 (1 µM) eklenerek tekrar 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki solüsyon uzaklaştırıldı. Her kuyucuğa 100 µL MTT (5 mg/mL MTT) solüsyonu eklenerek hücreler 4 saat inkübe edildi.¹⁰⁴ Bu süre sonunda kimyasallar kuyucuklardan pipet yardımıyla alınarak 100 µL DMSO eklendi. Formazan kristallerinin çözünmesi için 20-30 dakika hücreler inkübatörde bekletildi. Tetrazolyum halkasının parçalanması sonucunda oluşan soluk sarı renkli MTT boyasının, koyu mavi-mor formazon ürününe dönüştüğü gözlemlendi.^{66,104} DMSO, MTT'nin ve indirgenme ürünlerini çözmek için kullanıldı. Doksan altı kuyucuklu hücre kültür kabının 20-30 dakika DMSO ile inkübasyonundan sonra oluşan renk değişimi absorbans olarak spektrofotometre veya plate okuyucuyla (Eon, Biotek marka) 570-630

nm dalga boyunda değerlendirildi.⁶⁶ Her kuyunun 570 nm dalga boyundaki absorbans değeri 630 nm dalga boyundaki absorbans değerinden çıkarılarak ($A_{570nm} - A_{630nm}$) her grubun ortalama absorbansı hesaplandı (Şekil 18).



Şekil 18. Doksan Altı Kuyucuklu Hücre Kültür Kabının Plate Okuyucuyla (Eon, Biotek marka) Değerlendirilmesi.

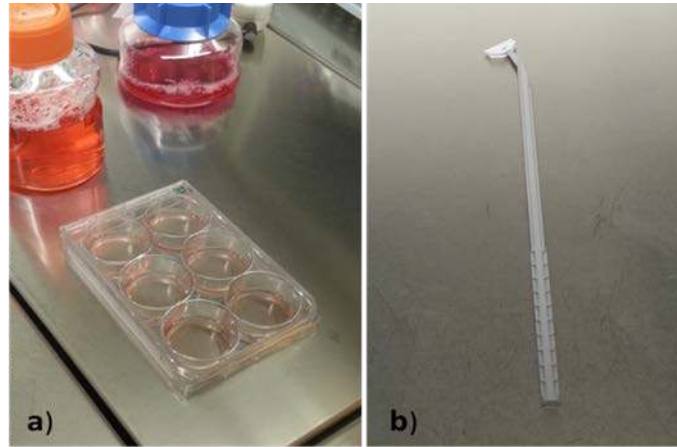
3.6. Hücre ve Medyum Ekstraktının Hazırlanması:

Hücre kültür kabında (75 cm^2) bulunan hücreler tripsinizasyon işlemi sonrasında altı kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Hücrelerin çoğalması için 24-72 saat beklenip Ang II ($0,1 \text{ } \mu\text{M}$), Olmesartan ($1 \text{ } \mu\text{M}$) ve PD123,319 ($1 \text{ } \mu\text{M}$) uygulaması yapıldı. Uygulamadan 24 saat sonra ekstraksiyon işlemine geçildi. Ekstraksiyon işlemi Santa Cruz Biotechnology ekstraksiyon kitinde belirtilen protokole göre yapıldı. Kuyucuklardaki hücre medyumunu ependorf tüplerine alınarak $+4 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de 1100 G'de 10 dakika santrifüj edildi (Şekil 19). Santrifüj sonrası, süpernatantlar ependorflara alınarak hücre medyum ekstraktları hazırlandı. Örnekler $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edildi.



Şekil 19. Soğutmalı Santrifüj Cihazı.

Medyumları uzaklaştırılan kuyucuklardan hücre ekstraktı elde etmek için ilk olarak kuyular Fosfat Tamponlu Tuz (PBS) çözeltisiyle yıkandı. Yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 450 μ L hazırlanan ekstraksiyon tamponundan eklenerek +4 °C’de buzdolabı içerisinde bulunan çalkalayıcıda 15 dakika karıştırıldı. On beş dakika sonunda kuyucukların tabanında bulunan hücreler hücre kazıyıcısı yardımıyla yerlerinden dikkatlice kaldırılıp otomatik pipet yardımıyla ependorf tüplerine alındı (Şekil 20). Örnekler 10,000 G’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatantlar ependorflara alındı. Örnekler -80 °C’de derin dondurucuda muhafaza edildi.

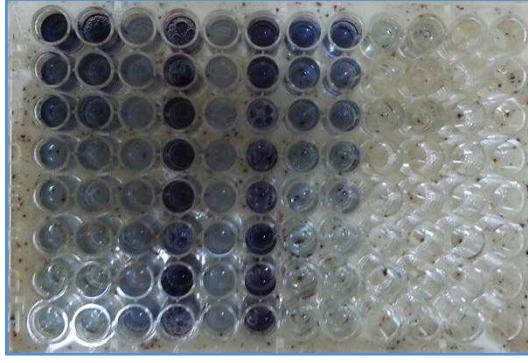


Şekil 20. Hücre Ekstraksiyonu, a) Altı Kuyulu Hücre Kültür Kabı b) Hücre Kazıyıcı.

3.7. Lowry Yöntemi

Lowry, Coomassie Blue G-250 (Bradford), Bikinkoninik Asit (BAC) ve Biuret gibi yöntemler total protein tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. Lowry yöntemi, biüret yönteminin geliştirilmiş şeklidir. Bu yöntemde Cu^{2+} iyonu alkali ortamda proteinlerdeki peptit bağları ile kompleks oluşturmakta ve Cu^{+} 'e indirgenmektedir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan tirozin, triptofan ve sistein aminoasitleri Folin-Ciocalteau's reaktifini indirgemesiyle mavi renk oluşumu meydana gelmektedir (Şekil 21). Oluşan mavi rengin yoğunluğu protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.^{105,106} Bu yöntemle 0,01-1,0 mg/mL arasındaki protein miktarı ölçülebilmektedir.¹⁰⁶ Lowry yöntemi sıklıkla kullanılan bir total protein testi olup biyolojik sıvı, protein karışımı ve ekstraktlardaki protein miktarı doğru ve uygun bir şekilde belirlenebilmektedir. Birçok bilimsel çalışmada serum örneklerindeki ve mezenkimal hücrelerdeki total protein miktarının bu yöntemle ölçüldüğü belirtilmektedir.¹⁰⁷

1. Ependorf tüplerine 50 μL örnek ve standart, kör ependorf tüpüne de 50 μL saf su konuldu.
2. Tüm tüplere 150 μL C reaktifi eklendi (C reaktifi 100:1 oranında A ve B reaktifi karışımından oluşmaktadır. A reaktifi % 2 Na_2CO_3 , % 0,4 NaOH , % 0,16 Na-tartarat ; B reaktifi ise % 4 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ olacak şekilde hazırlandı).
3. Tüpler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.
4. Tüm tüplere 3 μL Folin-Ciocalteau's reaktifi eklendi.
5. Doksan altı kuyulu kültür kabına standartlar ve örnekler pipetlenerek oda sıcaklığında 45 dakika bekletildi.
6. Kuyucuklarda bulunan örneklerin ve standartların absorbans değerleri 660 nm dalga boyunda spektrofotometreyle ölçüldü.
7. Her bir örneğin protein miktarı 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,062, 0,031 ve 0 mg/mL dozlarında hazırlanan BSA absorbanslarıyla oluşturulan standart eğriden yararlanılarak kontrol ve diyabetik grupta bulunan toplam 32 örneğin hem hücre ekstraktında hem de hücre medyumundaki total protein miktarı hesaplandı.^{105,106}



Şekil 21. Lowry Yöntemiyle Mavi Renk Değişimi.

3.8. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELİSA) Yöntemi

ELİSA, enzim immünoassay (EİA) olarak bilinen immünolojik bir ölçüm yöntemi olup biyolojik örneklerde bulunan antijen, antikor, protein, glikoprotein ve hormon gibi maddelerin hem kalitatif hem de kantitatif tayini için tasarlanmış bir tekniktir.¹⁰⁸ Tezde yarışmalı Ang II ELİSA kiti kullanıldı.

Ang II EİA Kiti, Ang II peptidini tayin eden in vitro kantitatif bir deney olup, temeli yarışmalı EİA prensibine dayanmaktadır. Kitin içerisindeki mikropate ikincil bir anti-tavşan antikoruyla önceden kaplıdır. Bloklama adımı ve kültür kabının anti-Anjiyotensin II antikoruna ile inkübasyonundan sonra, biyotinlenmiş Ang II peptidi ve peptit standardı veya numunelerde hedeflenen peptit, Ang II antikoruna ile yarışmalı bir şekilde etkileşime girmektedir. Bağlanmış biyotinlenmiş Ang II peptidi daha sonra bir renk geliştirme reaksiyonunu katalize eden Streptavidin-yaban turpu peroksidazı (SA-HRP) ile bağlanmaktadır (Şekil 22). Kolorimetrik sinyal yoğunluğu biyotinlenmiş peptit-SA-HRP kompleksinin miktarı ile doğrudan doğruya orantılıdır ve standart ve numunelerdeki Ang II peptit miktarıyla ters orantılıdır. Bu durum Ang II antikoruyla standart veya örneklerdeki biyotinlenmiş Ang II peptidi arasındaki yarışmalı bağlanmadan kaynaklanmaktadır. Ang II peptidinin bilinen konsantrasyonunun standart eğrisi oluşturulabilmekte ve örneklerdeki Ang II peptidinin konsantrasyonu bu eğriye göre hesaplanabilmektedir. Bu kit insan, fare ve sıçan Ang II'sini tespit edebilmektedir. Kitin Ang II tespit aralığı 0,1-1,000 pg/mL arasındadır.



Şekil 22. Durdurucu Solüsyonun Eklenmesiyle Sarı Rengin Mavi Renge Değişimi.

3.8.1. Kitin İçinde Bulunan Solüsyonlar

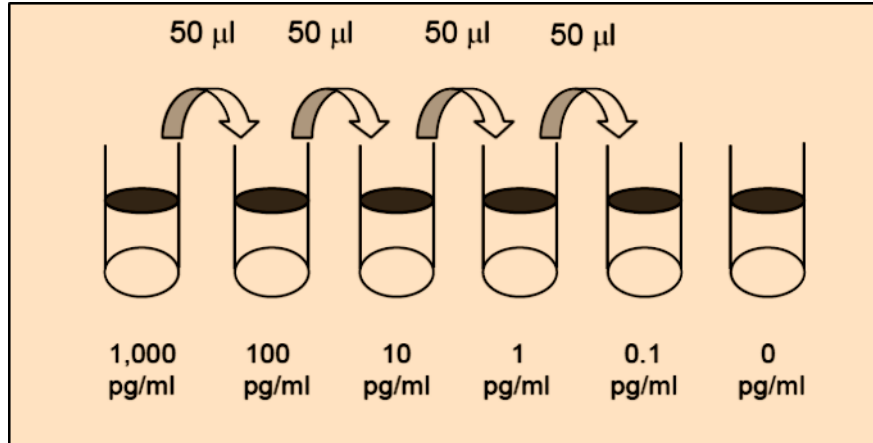
1. İkincil antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu plate (A Maddesi) - RAB0010A: İkincil antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu (12 şerit x 8 göz)
2. 20x Yıkama Tamponu (B Maddesi) RABWASH3: 25 ml
3. EİA Anjiyotensin II Peptit standardı, (C Maddesi) - RAB0010C: 2 şişe
4. Anti-Anjiyotensin II tespit Antikoru, (N Maddesi) - RAB0010F: 2 şişe
5. EİA Anjiyotensin II 5x Deney Seyreltici B (E Maddesi) - RABDIL10: 15 mL 5x yoğunlaştırılmış tampon
6. Biyotinlenmiş Anjiyotensin II Peptidi, (F Maddesi) - RAB0010G: 2 şişe
7. HRP-streptavidin (G Maddesi) - RABHRP3: 600 ul 100x konsantre HRP-konjuge Streptavidin
8. Anjiyotensin II Pozitif Kontrol Örneği, (M Maddesi) - RAB0010K: 1 şişe
9. TMB Substrat çözeltisi (H Maddesi) - RABTMB2: Tamponlanmış Solüsyonda 12 ml 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)
10. Durdurma Solüsyonu(I Maddesi) - RABSTOP2: 8 ml 0,2 M sülfürik asit (Şekil 23)



Şekil 23. Anjiyotensin II ELİSA Kiti.

3.8.2. Standartların Hazırlanması

Final konsantrasyonu 1000 pg/mL, 100 pg/mL, 10 pg/mL, 1 pg/mL, 0,1 pg/mL ve 0 pg/mL olacak şekilde 6 adet ependorf tüpü etiketlendi. Birinci tüpe 450 μ L 1000 pg/mL (standart Ang II peptidi ve 20 pg/mL biyotinlenmiş Ang II), diğer tüplere 450 μ L biyotinlenmiş Ang II solüsyonu pipetlendi. Birinci tüpten başlayarak 0 pg/mL olan tüpe kadar bir önceki tüpten 50 μ L alınarak standartlarda sırasıyla seyreltme yapıldı (Şekil 24).

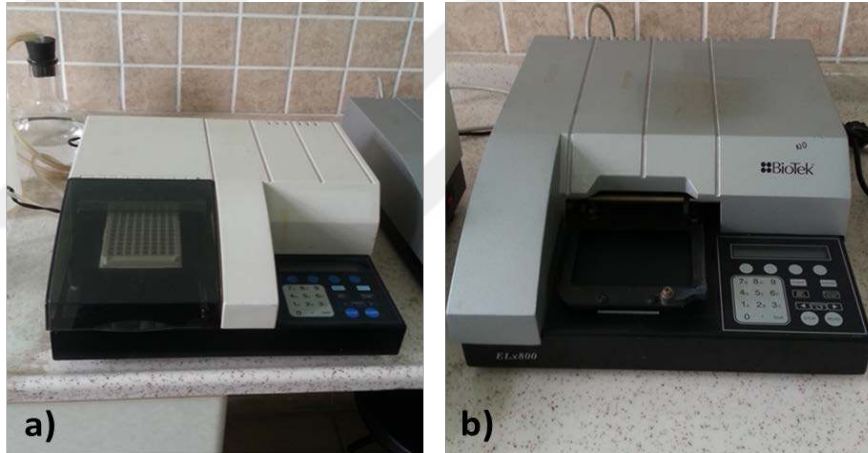


Şekil 24. Standartların Seyreltilmesi.

3.8.3. Deneyin Yapılışı

ELİSA kit prosedüründe belirtilen talimatlara uygun olarak çalışıldı. Reaktif hazırlama adımları sırasında kit solüsyonları buz aküsü üzerinde tutuldu. Çalışmada standartlar 2 kez, her grubun örnekleri 4 defa tekrarlanarak çalışıldı.

1. Her kuyucuğa 100 μ L anti-Anjiyotensin II antikorı eklenerek 96'lık plate oda sıcaklığında hafifçe çalkalanırken (1-2 devir/sn) 1,5 saat inkübe edildi.
2. Her bir kuyu 200-300 μ L yıkama solüsyonuyla 4 kez yıkandı. Bu işlem otomatik plate yıkayıcı ile yapıldı. Son yıkamadan sonra kuyucuklardaki yıkama solüsyonu aspire edildi ve plate kağıt havlu üzerine hızlıca ters çevrilerek kuyucukların tamamen boşalması sağlandı (Şekil 25).



Şekil 25. a) Plate Kuyucuklarını Yıkama Cihazı b) Plate Okuyucu.

3. Hücre ve medyum ekstraktları hazırlandı (-80 °C'de muhafaza edilen hücre ve medyum ekstraktları kullanılmadan önce her bir ependorfta bulunan örneğin oda sıcaklığında erimesi sağlandı. Örneklerin içerisinde kalmış olabilecek partikülleri uzaklaştırmak amacıyla +4 °C'de 10.000 G'de 5 dakika santrifüj edildi). Her bir standart, örnek ve pozitif kontrolden 100 μ L olacak şekilde kuyucuklara ilave edilerek boş bir kuyu eklendi (yalnızca deney seyreltici). Kuyucukların üzeri şeffaf yapışkan filmle kapatıldı ve oda sıcaklığında hafifçe çalkalanarak (1-2 devir/sn) 2,5 saat inkübe edildi.
4. Solüsyunlar atıldı ve otomatik cihazla kuyular 4 kez yıkandı.

5. Hazırlanan HRP-Streptavidin solüsyonundan 100 uL her kuyucuğa eklendi. Oda sıcaklığında hafifçe çalkanırken 45 dakika inkübe edildi.
6. Kuyucuklardaki solüsyon atıldı ve tekrar 4 kez yıkandı.
7. Her kuyucuğa 100 µL TMB Tek Adımlı Substrat Reagenti eklendi. Karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika hafifçe çalkalanarak inkübe edildi (1-2 devir/sn). Bağlanan hedef protein miktarıyla ters orantılı olarak mavi renk oluştuğu gözlemlendi.
8. Her göze 50 µL durdurma solüsyonunun eklenmesiyle mavi rengin sarı renge değiştiği görüldü. Oluşan rengin yoğunluğu 450 nm’de Eon, Biotek marka plate okuyucuyla ölçüldü.

3.8.4. Hesaplamalar ve Standart Eğri

Yinelenen standartların ve kontrollerin absorbens değerleri hesaplanarak boş optik yoğunluğun absorbens değeri çıkarıldı. Excel programı kullanılarak standart eğri çizildi. Ortaya çıkan standart eğrinin fonksiyonu Excel programıyla belirlendi. Tüm standartların ve örneklerin absorbens değerleri fonksiyon yardımıyla Ang II konsantrasyonu olarak hesaplandı. Kontrol, diyabetik ve yüksek glukoz uygulanan VDKHK gruplarında bulunan tüm örnek ekstraktlarında Ang II düzeyi ölçüldü.

3.9. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 21.0 paket programı kullanıldı. Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak ifade edildi. İstatistiksel analizde, varyansların homojen dağılıp dağılmadığına bakıldıktan sonra homojen dağılımları durumunda parametrik bir test olan ANOVA kullanıldı. Fark bulunması durumunda hangi gruplar arasında fark bulunduğunu göstermek amacıyla *pos hoc* Dunnett ve Tukey testleri yapıldı. Yapılan tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0,05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Kan Şekeri ve İdrar Değerleri

STZ uygulamasından önce ve sonra 3. günde sağlıklı ve diyabetik hayvanların kan glukozu kalibre edilmiş Gluko Dr marka glukometreyle ölçüldü. Hayvanların kan şekerleri ve vücut ağırlıkları sekiz hafta boyunca takip edildi. Ayrıca sağlıklı ve diyabetik hayvanların idrarı strip ile ölçüldü (Şekil 26).

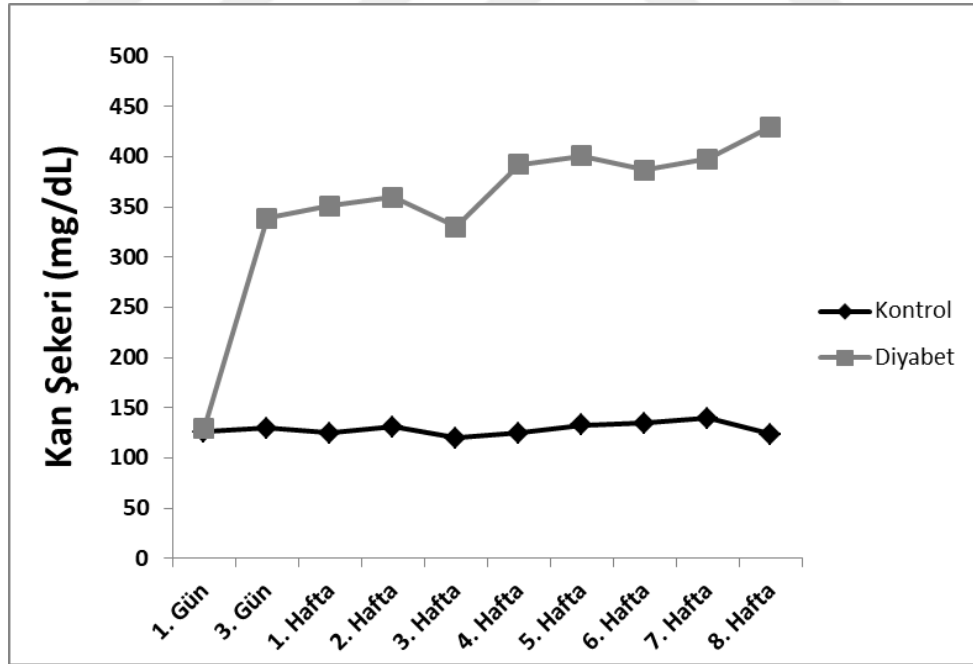


Şekil 26. Glukometre ve İdrar Stribi.

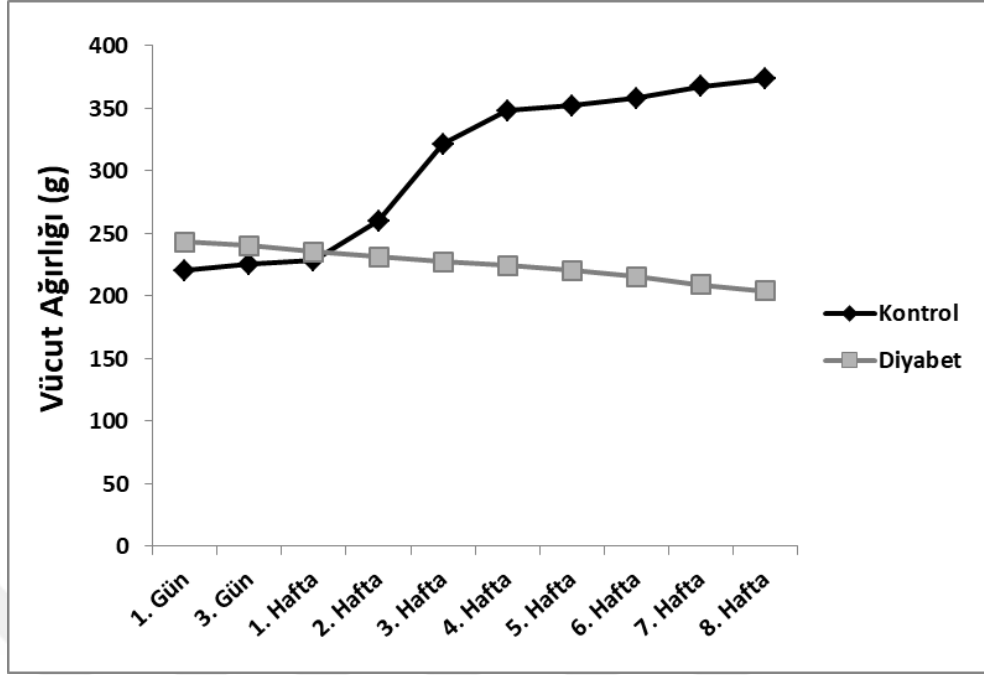
Hayvanların kan şekerleri aç ve susuz bırakılmadan ölçüldü. Kontrol grubu hayvanda kan şekeri 8 haftalık ölçümde 120-140 mg/dL arasında değişirken, STZ uygulanan hayvanda 3. günden sonra kan şekeri 330-401 mg/dL arasında değiştiği görüldü (Şekil 27), (Tablo 4). Kontrol grubu hayvanda vücut ağırlığı 8 haftada % 69 artarken, STZ uygulanan hayvanda ise % 16 azaldığı saptandı (Şekil 28).

Tablo 4. Kan Şekeri ve Vücut Ağırlığı Ölçümü.

	Kontrol (n=1)		STZ Uygulanan (n=1)	
	Vücut Ağırlığı (g)	Kan Şekeri (mg/dL)	Vücut Ağırlığı (g)	Kan Şekeri (mg/dL)
1. Gün	220	126	243	130
3. Gün	225	130	240	339
1. Hafta	228	125	235	351
2. Hafta	260	131	231	360
3. Hafta	321	120	227	330
4. Hafta	348	125	224	392
5. Hafta	352	133	220	401
6. Hafta	358	135	215	387
7. Hafta	367	140	209	398
8. Hafta	373	124	204	430



Şekil 27. Kontrol ve Diyabetik Sıçanların Sekiz Haftalık Kan Şekeri Ölçümleri (n=1).



Şekil 28. Kontrol ve Diyabetik Sıçanların Sekiz Haftalık Vücut Ağırlığı (n=1).

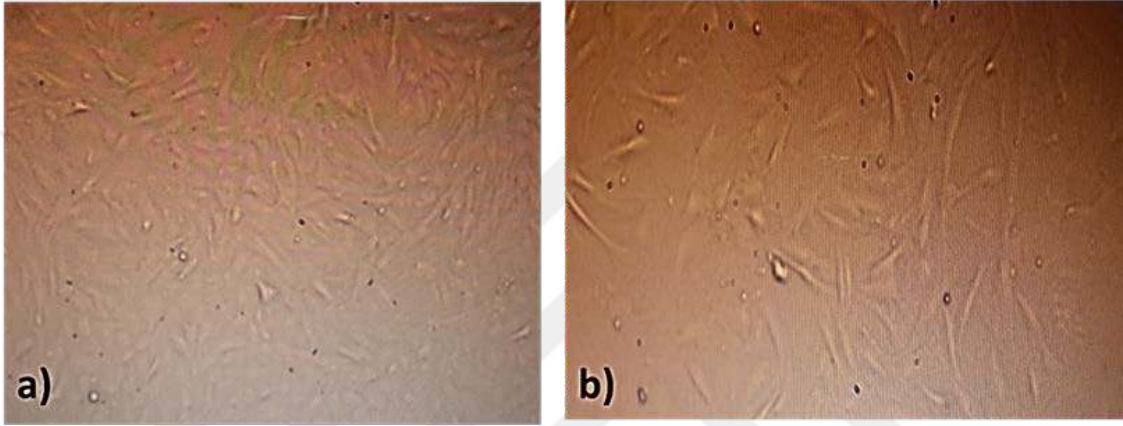
Kontrol grubunda idrar glukoz <50 mg/dL iken diyabetik hayvanın idrarında 500-1000 mg/dL glukoz ölçüldü. Kontrol ve diyabetik grubunun hayvanların idrar örneklerinin değerleri Tablo 5’te belirtilmiştir.

Tablo 5. Kontrol ve Diyabetik Hayvanın İdrar Değerleri.

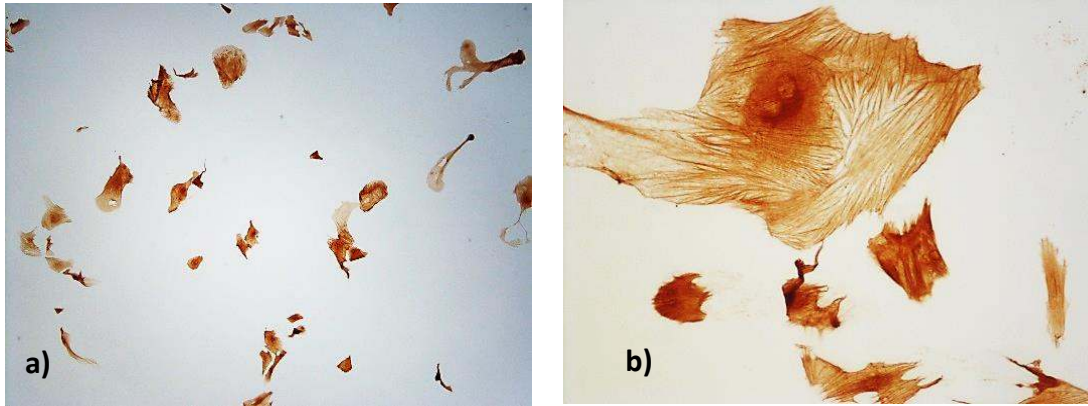
Parametre	Kontrol (n=1)	Diyabetik (n=1)
Glukoz	<50 mg/dL	500-1000 mg/dL
Proteinüri	(-)	30 mg/dL
Ketonüri	(-)	(-)
Nitrit	(-)	(+)
Lökosit	(-)	(-)
Eritrosit	(-)	(-)

4.2. VDKH'lerin Boyanması

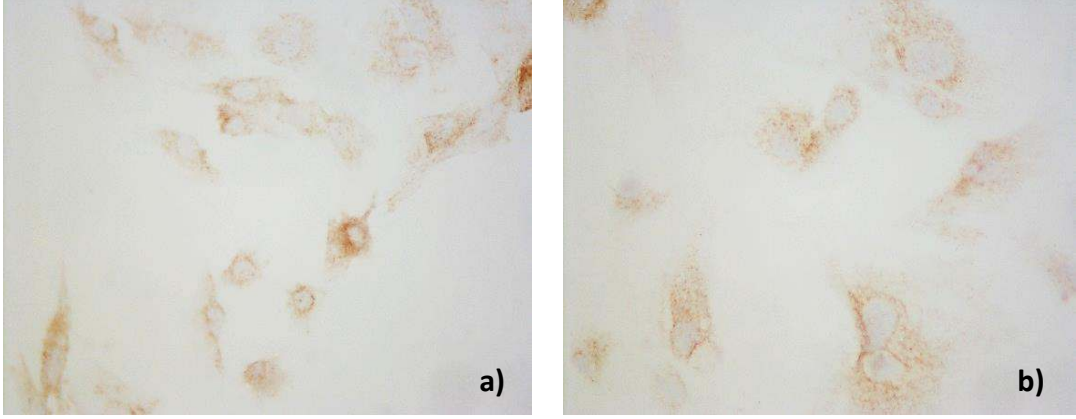
Petri kaplarında bulunan VDKH'ler boyanmadan önce invert mikroskopla bakılarak polilizinli lam yüzeyinde yayılmaları ve çoğalmaları değerlendirildi (Şekil 29). VDKH'ler lam yüzeyini kapladıktan ve yeterli sayıya ulaştıktan sonra preparatlar α -SMA, kaldesmon ve kalponinle İHK yöntemle boyandı. Çalışmada kullanılan hücrelerin VDKH olduğu doğrulandı (Şekil 30, 31, 32).



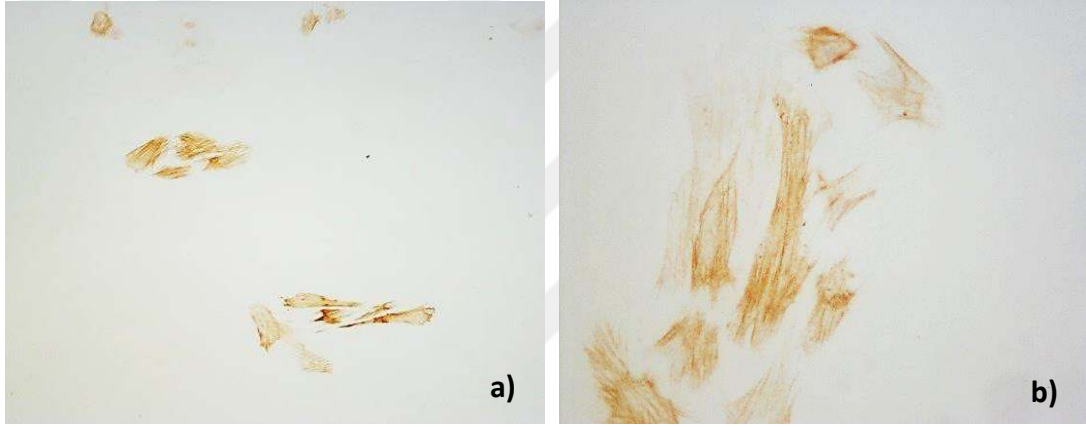
Şekil 29. İvert Mikroskopta VDKHK, a) x200'lük Büyütme, b) x400'lük Büyütme.



Şekil 30. α -smooth muscle actin (α -SMA) ile Boyanan VDKH'ler, a) x100'lük Büyütme, b) x400 Büyütme.



Şekil 31. Kaldesmon'la Boyanan VDKH'ler, a) x100'lük, b) x200'lük Büyütme.

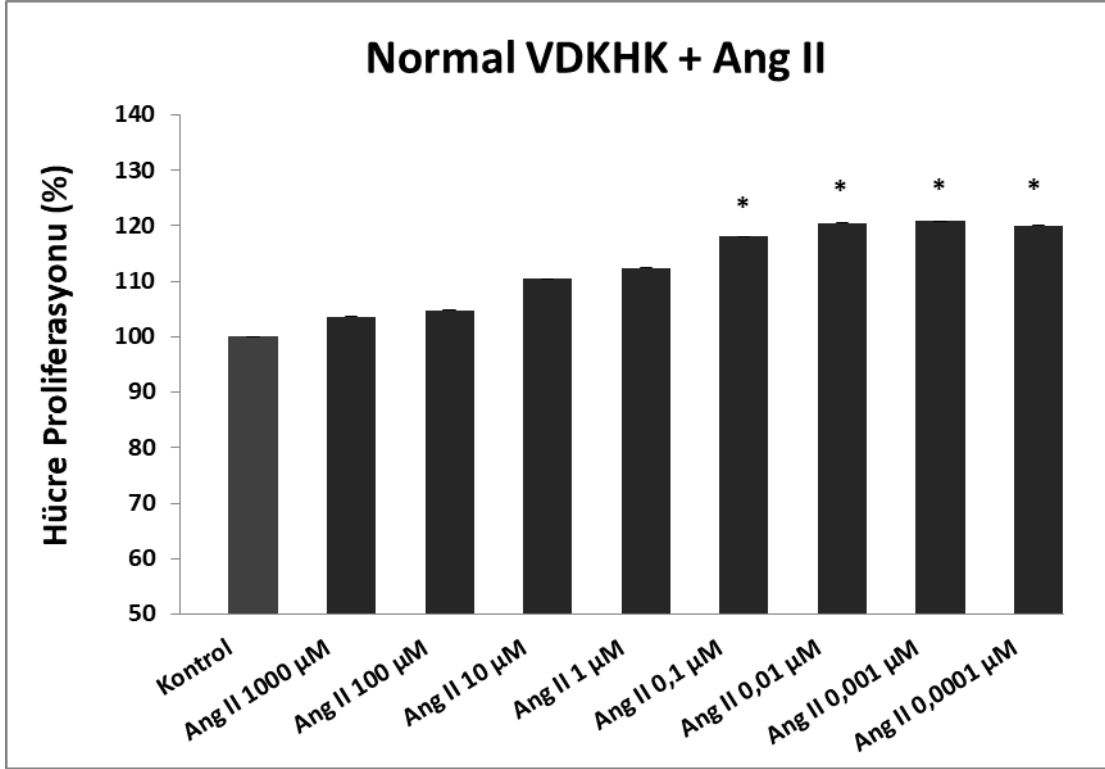


Şekil 32. Kalponin'le Boyanan VDKH'ler, a) x100'lük, b) x200'lük Büyütme.

4.3. VDKHK'de Proliferasyonun Değerlendirilmesi

4.3.1. Normal VDKHK'de 24 Saatlik Anjiyotensin II'nin Proliferasyona Etkisi

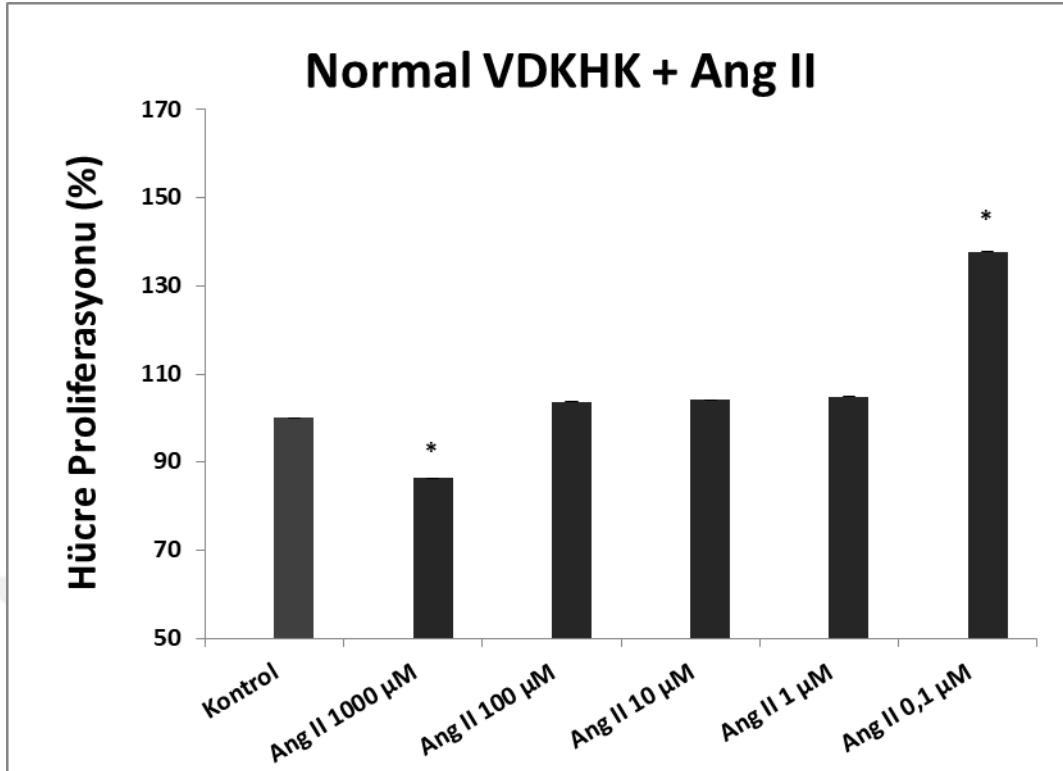
Normal VDKH'de Ang II dozlarının 24 saatlik proliferasyon değerlendirmesinde ANOVA ile gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(8,58)=3,903$ $p=0,001$]. *Post hoc* yapılan Dunnett testi ile kontrol grubuna göre Ang II 0,0001 μM ($p=0,005$), Ang II 0,001 μM ($p=0,005$), Ang II 0,01 μM ($p=0,004$) ve Ang II 0,1 μM ($p=0,008$) gruplarında hücre proliferasyonu anlamlı olarak arttı. Kontrol grubu ile Ang II 1000 μM , 100 μM , 10 μM , 1 μM grupları arasında anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$), (Şekil 33).



Şekil 33. Normal VDKH'de 24 Saatlik Ang II Doz Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA *Post hoc* Dunnett Testi ($n=6-12$).

4.3.2. Normal VDKHK'de Anjiyotensin II'nin 48 Saatlik Proliferasyona Etkisi

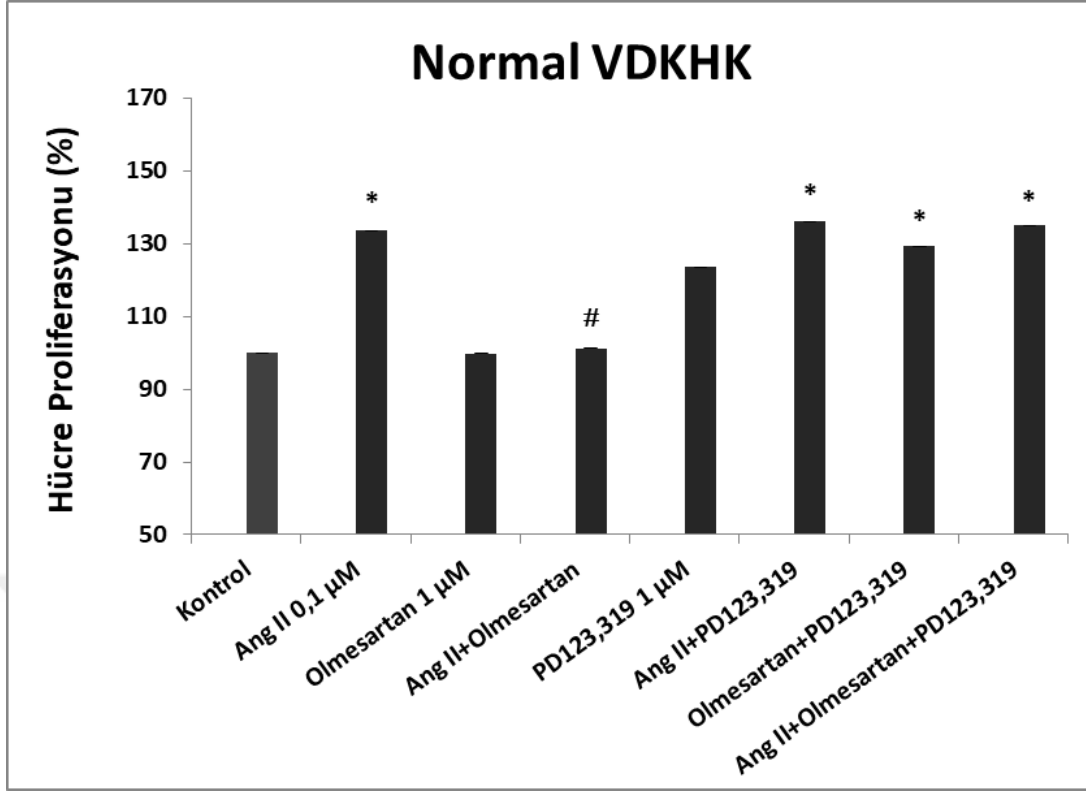
Normal VDKH'de Ang II dozlarının 48 saatlik proliferasyon değerlendirmesinde ANOVA ile gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(5,72)=35,449$ $p=0,000$]. *Post hoc* yapılan Dunnett testi ile kontrol grubuna göre Ang II 0,1 µM ($p=0,000$) grubunda hücre proliferasyonu anlamlı olarak arttı. Ang II 1000 µM ($p=0,004$) grubunda ise anlamlı azalma görüldü. Kontrol grubu ile 100 µM, 10 µM, 1 µM grupları arasında anlamlı fark görülmedi ($p > 0,05$), (Şekil 34).



Şekil 34. Normal VDKH'de 48 Saatlik Ang II Doz Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA *Post hoc* Dunnett Testi (n=12-15).

4.3.3. Normal VDKHK'de Ang II, Olmesartan ve PD123,319'un Proliferasyona Etkisi

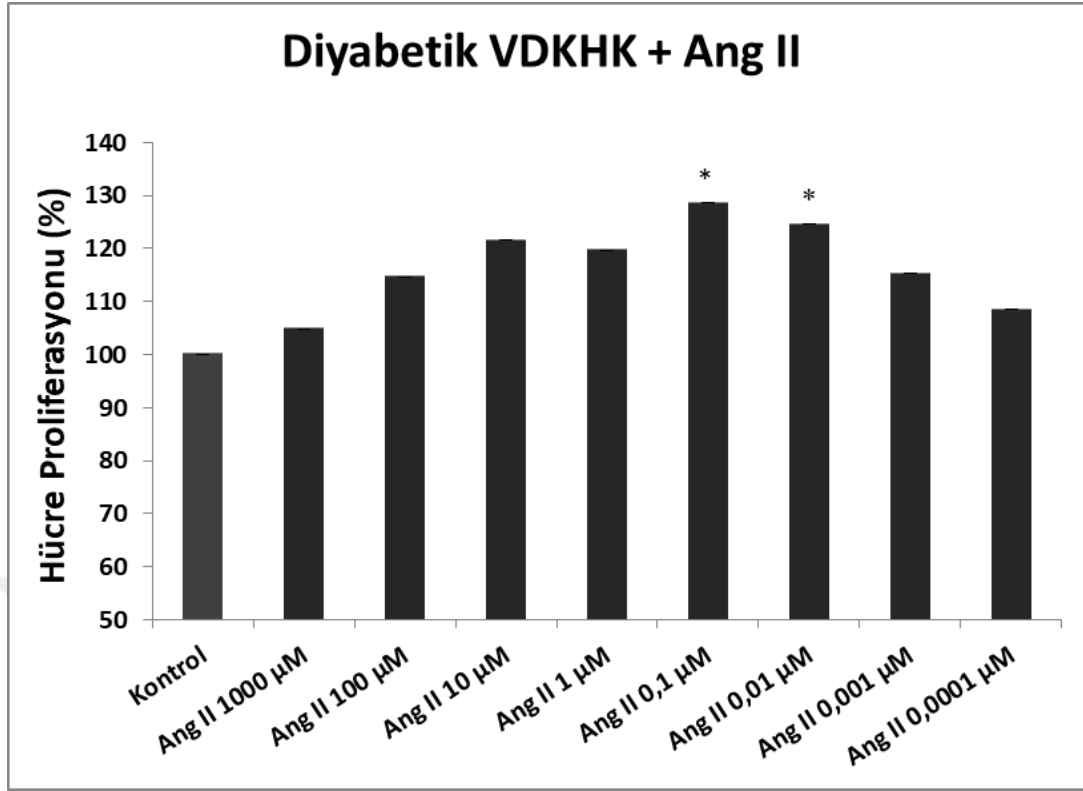
Normal VDKHK'de Ang II, Olmesartan ve PD123,319'un proliferasyon değerlendirmesinde ANOVA ile gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(7,48)=7,202$ $p=0,000$]. *Post hoc* yapılan Dunnett testi ile kontrol grubu Ang II ($p=0,007$), Ang II+PD123,319 ($p=0,001$), Olmesartan+PD123,319 ($p=0,008$), Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($p=0,001$) grupları karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda anlamlı artış saptandı. Kontrol grubu ile Olmesartan ($p=1,000$), Ang II+Olmesartan ($p=1,000$) ve PD123,319 ($p=0,071$) grupları arasında ise anlamlı fark saptanmadı. *Post hoc* yapılan Tukey testi ile Ang II grubu Ang II+Olmesartan ($p=0,028$) grubu karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda anlamlı azalma görüldü. Ang II grubu Ang II+PD123,319 ($p=1,000$) ve Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($p=1,000$) grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi (Şekil 35).



Şekil 35. Normal VDKHK’de Ang II, Olmesartan ve PD123,319 Proliferasyon Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA *Post hoc* Dunnett Testi. # $p < 0,05$ Ang II grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA *Post hoc* Tukey Testi (n=5-8).

4.3.4. Diyabetik VDKHK’de Anjiyotensin II’nin Proliferasyona Etkisi

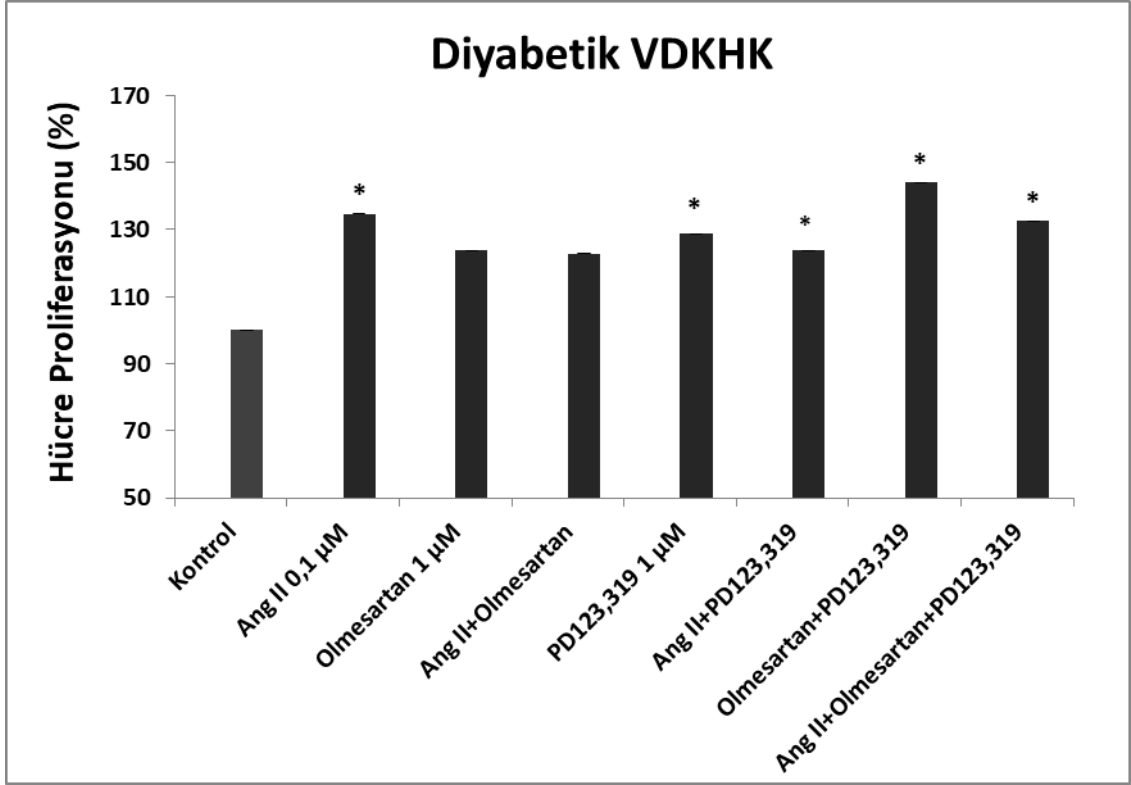
Proliferasyon değerlendirmesinde ANOVA ile gruplar arasında anlamlı fark saptandı [$F(8,47)=2,47$ $p=0,025$]. *Post hoc* yapılan Dunnett testi ile kontrol grubu Ang II 0,1 μM ($p=0,011$) ve Ang II 0,01 μM ($p=0,038$) grubu karşılaştırıldığında proliferasyonda anlamlı artış görüldü. Kontrol grubu ile Ang II 1000 μM , 100 μM , 10 μM , 1 μM , 0,001 μM , 0,0001 μM dozları arasında anlamlı fark görülmedi ($p > 0,05$), (Şekil 36).



Şekil 36. Diyabetik VDKHK’de 24 Saatlik Ang II Doz Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA *Post hoc* Dunnett Testi (n=6-7).

4.3.5. Diyabetik VDKHK’de Ang II, Olmesartan ve PD123,319’un Proliferasyona Etkisi

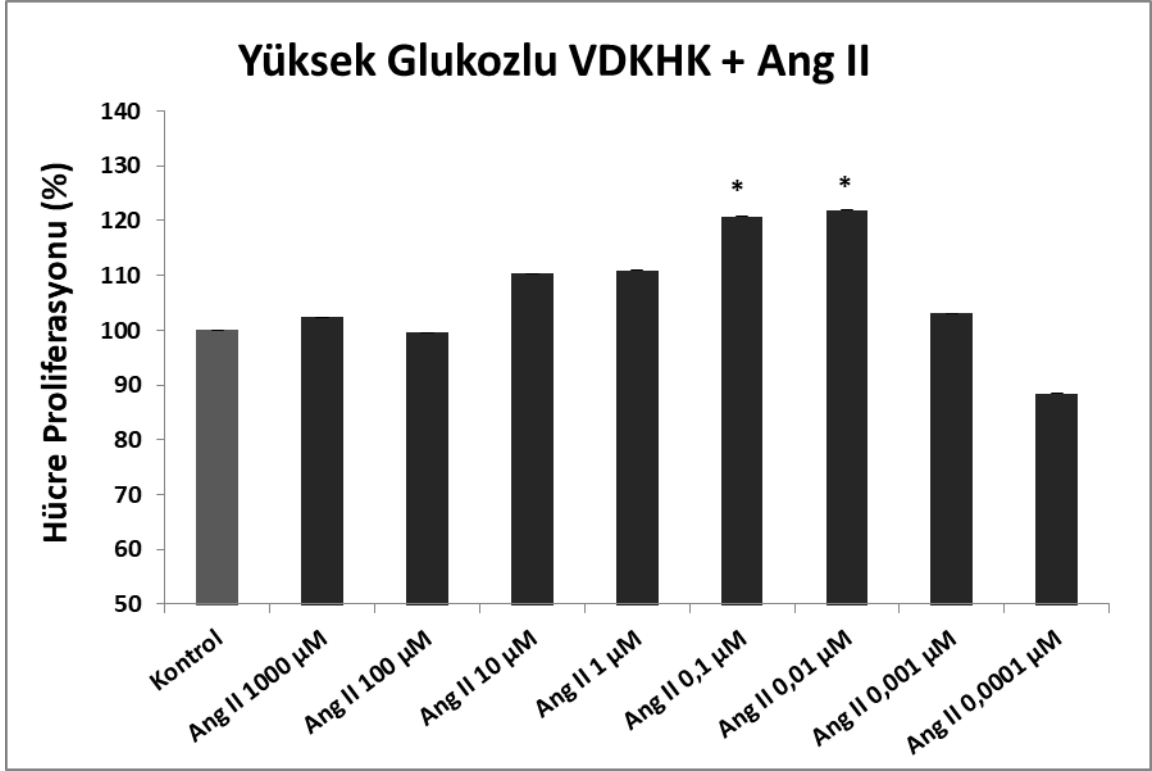
Diyabetik VDKHK’de Ang II, Olmesartan ve PD123,319’un proliferasyon değerlendirmesinde ANOVA ile gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(7,43)=4,133$ $p=0,001$]. *Post hoc* yapılan Dunnett testi ile kontrol grubu Ang II ($p=0,002$), PD123,319 ($p=0,011$), Ang II+PD123,319 ($p=0,049$), Olmesartan+PD123,319 ($p=0,000$), Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($p=0,0005$) grupları karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda anlamlı artış saptandı. Kontrol grubu ile Olmesartan ($p=0,064$) ve Ang II+Olmesartan ($p=0,081$) grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. *Post hoc* yapılan Tukey testiyle Ang II grubu Ang II+Olmesartan ($p=0,669$), Ang II+PD123,319 ($p=0,716$) ve Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($p=1,000$) grupları karşılaştırdığında anlamlı bir fark görülmedi ($p > 0,05$), (Şekil 37).



Şekil 37. Diyabetik VDKHK’de Ang II, Olmesartan ve PD123,319 Proliferasyon Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p<0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA *Post hoc* Dunnett Testi (n=6-7).

4.3.6. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK’de Anjiyotensin II’nin Proliferasyona Etkisi

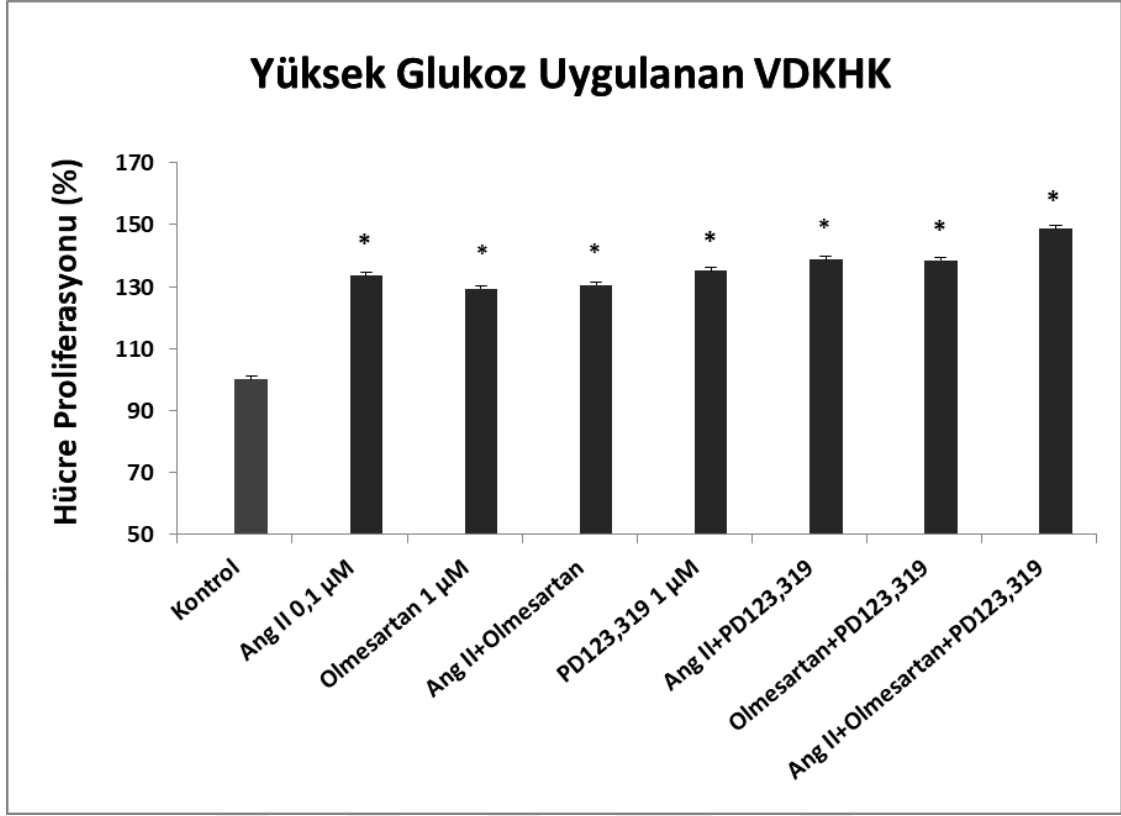
Yüksek glukozlu hücre medyumunda (4500 mg/L glukoz içeren) 4-6 hafta boyunca tutulan normal VDKHK’de Ang II dozlarının proliferasyon değerlendirmesinde ANOVA ile gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(8,65)=8,105$ $p=0,000$]. *Post hoc* yapılan Dunnett testi ile kontrol grubu Ang II 0,01 μ M ($p=0,000$) ve Ang II 0,1 μ M ($p=0,001$) grupları karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda anlamlı artış saptandı. Kontrol grubu ile Ang II 1000 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0,001 μ M ve 0,0001 μ M dozları arasında anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$), (Şekil 38).



Şekil 38. Yüksek Glukozlu VDKHK’de 24 Saatlik Ang II Doz Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA *Post hoc* Dunnett Testi ($n=7-13$).

4.3.7. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK’de Ang II, Olmesartan ve PD123,319’un Proliferasyona Etkisi

Yüksek glukozlu hücre medyumunda (4500 mg/L glukoz içeren) 4-6 hafta boyunca inkübe edilen normal VDKHK’de Ang II, Olmesartan ve PD123,319’un proliferasyon değerlendirmesinde ANOVA ile gruplar arasında anlamlı fark bulundu [$F(7,52)=3,947$ $p=0,002$]. *Post hoc* yapılan Dunnett testi ile kontrol grubu Ang II ($p=0,009$), Olmesartan ($p=0,036$), Ang II+Olmesartan ($p=0,037$), PD123,319 ($p=0,005$), Ang II+PD123,319 ($p=0,002$), Olmesartan+PD123,319 ($p=0,002$), Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($p=0,000$) gruplarıyla karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunda anlamlı artış saptandı. *Post hoc* Tukey testi ile Ang II grubu Ang II+Olmesartan ($p=1,000$), Ang II+PD123,319 ($p=0,998$) ve Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($p=0,749$) grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmedi (Şekil 39).



Şekil 39. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK’de Ang II, Olmesartan ve PD123,319 Proliferasyon Çalışması. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir. * $p < 0,05$ Kontrol grubuna göre. Tek Yönlü ANOVA *Post hoc* Dunnett Testi (n=6-8).

4.4. Total Protein Miktarı

Sağlıklı ve diyabetik VDKH’de ve VDKHK medyumunda bulunan gruplardaki tüm örneklerde total protein miktarı Lowry yöntemiyle ölçüldü. Miktarı bilinen BSA dozlarından standartlar hazırlanarak spektrofotometreyle ölçülen absorbans değerleriyle standart eğri çizildi. Ortaya çıkan eğim fonksiyonuyla sağlıklı ve diyabetik VDKH ekstraktı ve kültür medyumları gruplarındaki tüm örneklerin absorbans değerlerinden total protein miktarı hesaplandı (Tablo 6).

Tablo 6. Total Protein Miktarı.

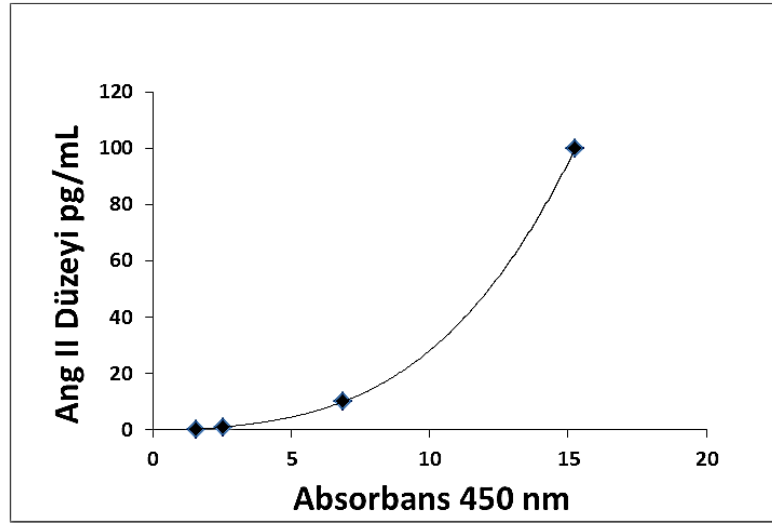
Gruplar	Normal VDKH Ekstraktı (mg/mL)	Normal VDKHK Medyumu (mg/mL)	Diyabetik VDKH Ekstraktı (mg/mL)	Diyabetik VDKHK Medyumu (mg/mL)
Kontrol	0,44	13,0	0,81	3,63
Ang II	1,41	30,1	0,52	3,02
Olmesartan	0,45	2,7	0,77	215,0
Ang II+Olmesartan	0,27	2,9	0,89	3,33
PD123,319	0,27	2,4	1,10	49,5
Ang II+PD123,319	0,56	118,3	1,44	15,0
Olmesartan+PD123,319	0,31	21,9	0,30	30,6
Ang II+Olmesartan+PD123,319	1,25	47,0	0,622	69,7

Gruplarda n=1

4.5. ELİSA ile Ang II Düzeyi Ölçümü

4.5.1. ELİSA ile Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi Ölçümü

Tüm gruplardaki örneklerin hücre ekstraktlarındaki Ang II düzeyini belirlemek için 1000, 100, 10, 1, 0,1 ve 0 pg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan Ang II peptit standartların 450 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleriyle Excel programında standart eğri çizildi. Oluşan eğrinin fonksiyonu belirlenerek sağlıklı, diyabetik ve yüksek glukozlu grupta VDKH ekstrakt örneklerindeki Ang II düzeyleri pg/mL olarak ölçüldü (Şekil 40).



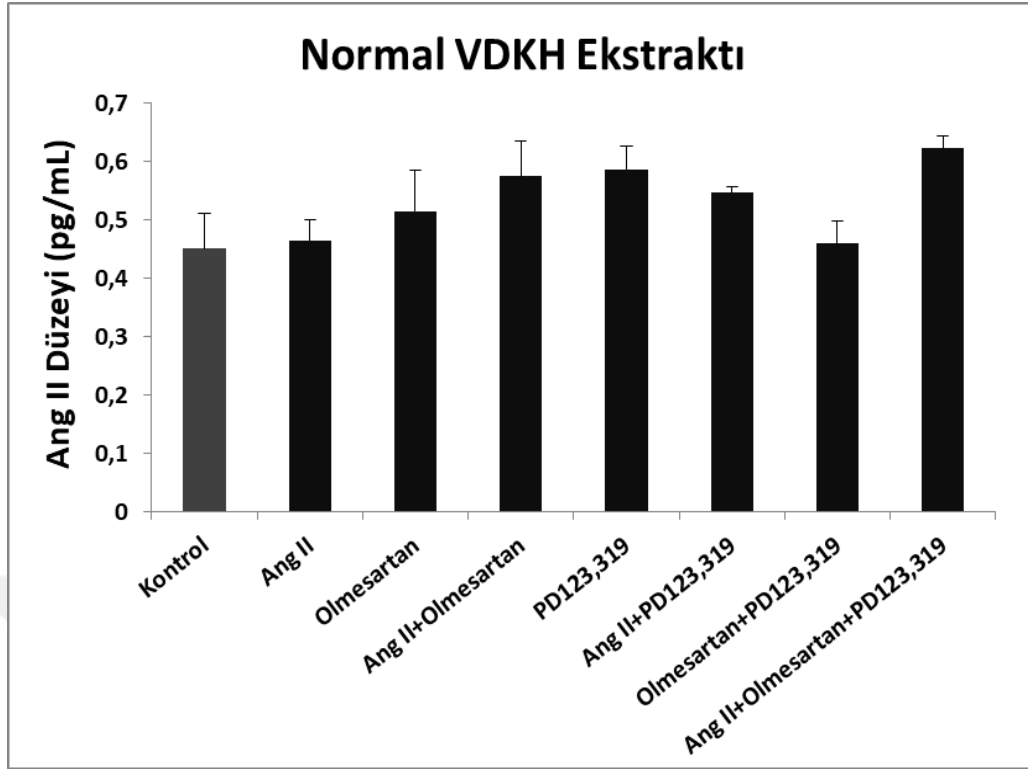
Şekil 40. VDKHK Hücre Ekstraktı Ang II Standart Eğrisi.

4.5.1.1. Normal VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi

Normal VDKHK’de ELİSA kitiyle 8 grubun hücre ekstraktlarında Ang II düzeyleri ölçüldü. Veriler ortalama ve standart hata olarak hesaplandı (Tablo 7). Kontrol ($0,450 \pm 0,06$) pg/mL, Ang II ($0,463 \pm 0,03$) pg/mL, Olmesartan ($0,514 \pm 0,07$) pg/mL, Ang II+Olmesartan ($0,574 \pm 0,06$) pg/mL, PD123,319 ($0,586 \pm 0,04$) pg/mL, Ang II+PD123,319 ($0,545 \pm 0,01$) pg/mL, Olmesartan+PD123,319 ($0,458 \pm 0,04$) pg/mL, Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($0,622 \pm 0,02$) pg/mL olarak ölçüldü (Şekil 41).

Tablo 7. Normal VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi.

Grup	pg/mL($\bar{x}$) $\pm$ SH	n
Kontrol	$0,450 \pm 0,06$	4
Ang II	$0,463 \pm 0,03$	3
Olmesartan	$0,514 \pm 0,07$	3
Ang II+Olmesartan	$0,574 \pm 0,06$	4
PD123,319	$0,586 \pm 0,04$	4
Ang II+PD123,319	$0,545 \pm 0,01$	4
Olmesartan+PD123,319	$0,458 \pm 0,04$	4
Ang II+Olmesartan+PD123,319	$0,622 \pm 0,02$	3
Toplam	$0,526 \pm 0,01$	29



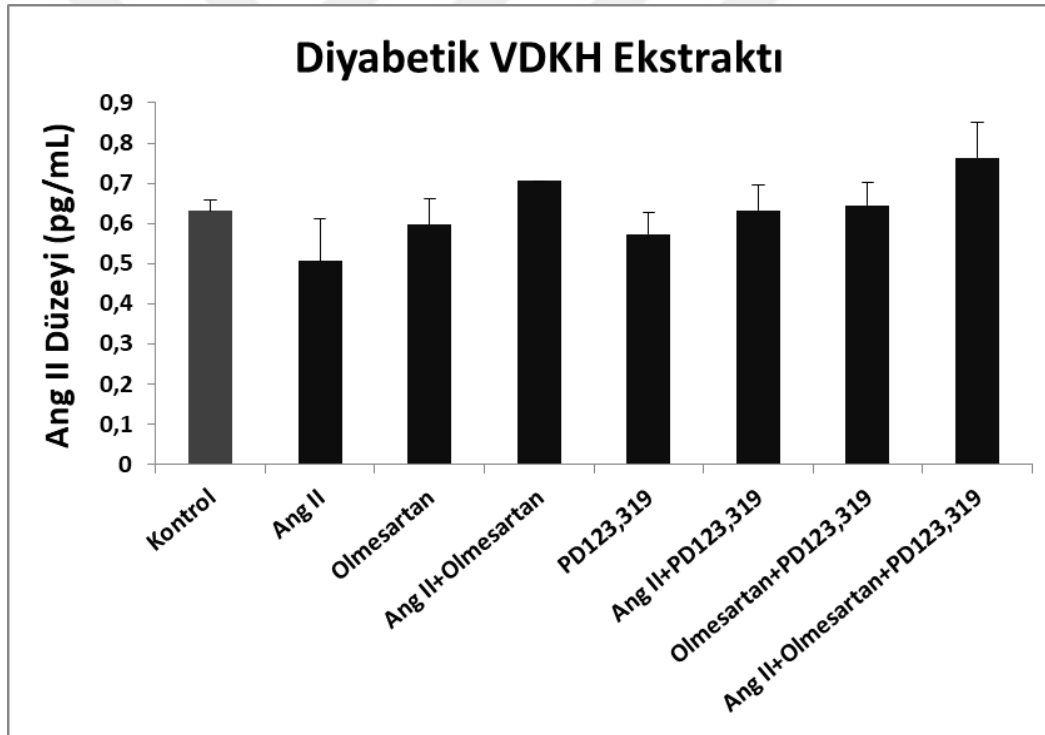
Şekil 41. Normal VDKHK’de Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=3-4).

4.5.1.2. Diyabetik VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi

Diyabetik VDKHK’de 8 grubun hücre ekstraktında Ang II düzeyi ölçülerek veriler ortalama ve standart hata olarak hesaplandı (Tablo 8). Kontrol ($0,631 \pm 0,02$) pg/mL, Ang II ($0,507 \pm 0,10$) pg/mL, Olmesartan ($0,597 \pm 0,06$) pg/mL, Ang II+Olmesartan ($0,705 \pm 0,00$) pg/mL, PD123,319 ($0,573 \pm 0,05$) pg/mL, Ang II+PD123,319 ($0,633 \pm 0,06$) pg/mL, Olmesartan+PD123,319 ($0,645 \pm 0,05$) pg/mL, Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($0,763 \pm 0,08$) pg/mL olarak ölçüldü (Şekil 42).

Tablo 8. Diyabetik VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi

Grup	pg/mL($\bar{x}$) $\pm$ SH	n
Kontrol	0,631 $\pm$ 0,02	4
Ang II	0,507 $\pm$ 0,10	4
Olmesartan	0,597 $\pm$ 0,06	3
Ang II+Olmesartan	0,705 $\pm$ 0,00	1
PD123,319	0,573 $\pm$ 0,05	4
Ang II+PD123,319	0,633 $\pm$ 0,06	4
Olmesartan+PD123,319	0,645 $\pm$ 0,05	3
Ang II+Olmesartan+PD123,319	0,763 $\pm$ 0,08	3
Toplam	0,526 $\pm$ 0,02	26



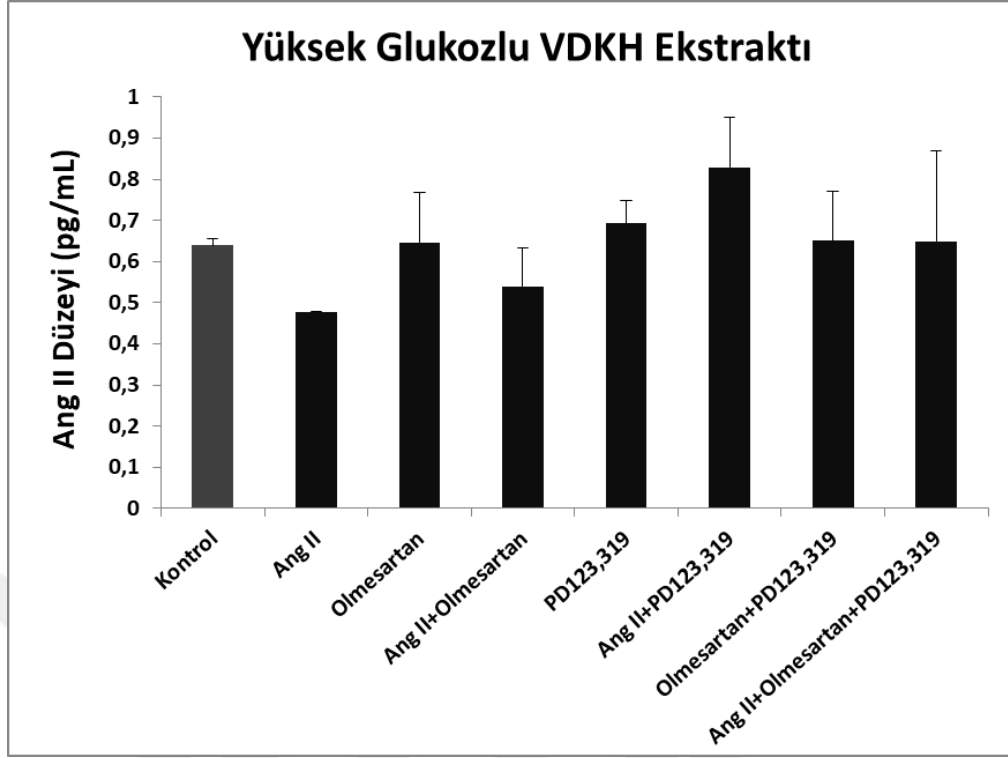
Şekil 42. Diyabetik VDKHK'de Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=1-4).

4.5.1.3. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi

Yüksek glukozlu hücre medyumunda 4-6 hafta inkübe edilen VDKHK'de 8 grubun hücre ekstraktında Ang II düzeyi ölçüldü (Tablo 9). Veriler ortalama ve standart hata olarak hesaplandı. Kontrol ($0,640 \pm 0,01$) pg/mL, Ang II ($0,478 \pm 0,00$) pg/mL, Olmesartan ($0,646 \pm 0,12$) pg/mL, Ang II+Olmesartan ($0,540 \pm 0,09$) pg/mL, PD123,319 ($0,693 \pm 0,05$) pg/mL, Ang II+PD123,319 ($0,829 \pm 0,02$) pg/mL, Olmesartan+PD123,319 ($0,651 \pm 0,11$) pg/mL, Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($0,649 \pm 0,22$) pg/mL olarak bulundu (Şekil 43).

Tablo 9. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyi.

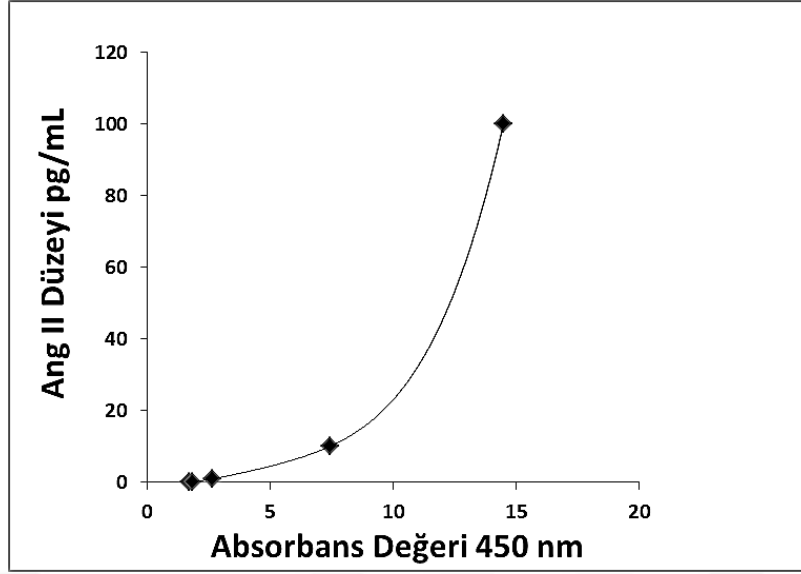
Grup	pg/mL($\bar{x}$) $\pm$ SH	n
Kontrol	$0,640 \pm 0,01$	2
Ang II	$0,478 \pm 0,00$	1
Olmesartan	$0,646 \pm 0,12$	2
Ang II+Olmesartan	$0,540 \pm 0,09$	2
PD123,319	$0,693 \pm 0,05$	2
Ang II+PD123,319	$0,829 \pm 0,02$	2
Olmesartan+PD123,319	$0,651 \pm 0,11$	2
Ang II+Olmesartan+PD123,319	$0,649 \pm 0,22$	2
Toplam	$0,640 \pm 0,03$	15



Şekil 43. Yüksek Glukozlu VDKHK’de Hücre Ekstraktında Ang II Düzeyleri. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=1-4).

4.5.2. ELİSA ile Hücre Medyumunda Ang II Düzeyi Ölçümü

Tüm gruplardaki örneklerin hücre medyumundaki Ang II düzeyini belirlemek için 1000, 100, 10, 1, 0,1 ve 0 pg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan Ang II peptit standartların 450 nm dalga boyunda ölçülen absorbans değerleriyle Excel programında standart eğri çizildi. Oluşan eğrinin fonksiyonu belirlenerek sağlıklı, diyabetik ve yüksek glukozlu grup VDKHK medyumunda örneklerdeki Ang II düzeyleri pg/mL olarak ölçüldü (Şekil 44).



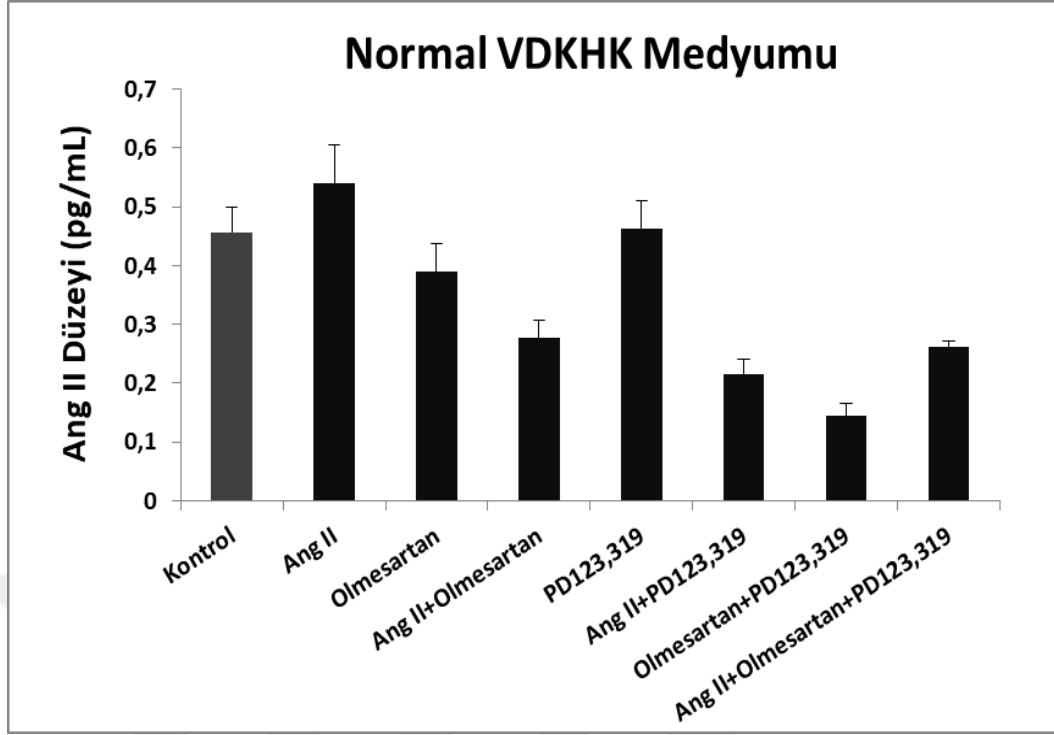
Şekil 44 VDKHK Hücre Medyumunda Ang II Standart Eğrisi.

4.5.2.1. Normal VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi

Normal VDKHK medyumunda Ang II düzeyi ölçüldü. Gruplarda Ang II düzeyi ortalama ve standart hata olarak ifade edildi (Tablo 10). Kontrol ($0,457 \pm 0,04$) pg/mL Ang II ($0,540 \pm 0,06$) pg/mL, Olmesartan ($0,389 \pm 0,04$) pg/mL, Ang II+Olmesartan ($0,277 \pm 0,03$) pg/mL, PD123,319 ($0,463 \pm 0,04$) pg/mL, Ang II+PD123,319 ($0,216 \pm 0,02$) pg/mL, Olmesartan+PD123,319 ($0,144 \pm 0,02$) pg/mL, Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($0,262 \pm 0,01$) pg/mL olarak ölçüldü (Şekil 45).

Tablo 10. Normal VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi.

Grup	pg/mL($\bar{x}$) $\pm$ SH	n
Kontrol	$0,457 \pm 0,04$	4
Ang II	$0,540 \pm 0,06$	4
Olmesartan	$0,389 \pm 0,04$	4
Ang II+Olmesartan	$0,277 \pm 0,03$	4
PD123,319	$0,463 \pm 0,04$	4
Ang II+PD123,319	$0,216 \pm 0,02$	4
Olmesartan+PD123,319	$0,144 \pm 0,02$	4
Ang II+Olmesartan+PD123,319	$0,262 \pm 0,01$	4
Toplam	$0,343 \pm 0,02$	32



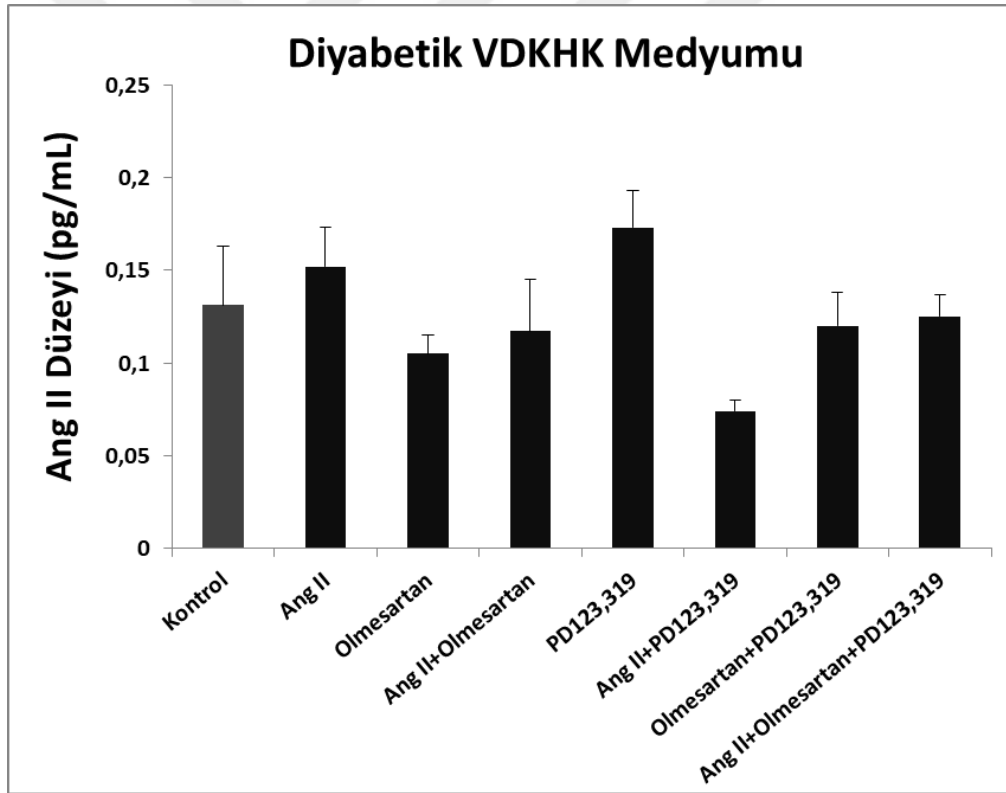
Şekil 45. Normal VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=4).

4.5.2.2. Diyabetik VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi

Diyabetik VDKHK medyumunda 8 grubun Ang II düzeyi ölçüldü. Veriler ortalama ve standart hata olarak ifade edildi (Tablo 11). Kontrol ($0,131 \pm 0,03$) pg/mL, Ang II ($0,152 \pm 0,02$) pg/mL, Olmesartan ($0,105 \pm 0,01$) pg/mL, Ang II+Olmesartan ($0,117 \pm 0,02$) pg/mL, PD123,319 ($0,173 \pm 0,02$) pg/mL, Ang II+PD123,319 ($0,074 \pm 0,00$) pg/mL Olmesartan+PD123,319 ($0,120 \pm 0,01$) pg/mL, Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($0,125 \pm 0,01$) pg/mL olarak ölçüldü (Şekil 46).

Tablo 11. Diyabetik VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi.

Grup	pg/mL($\bar{x}$) $\pm$ SH	n
Kontrol	0,131 $\pm$ 0,03	3
Ang II	0,152 $\pm$ 0,02	4
Olmesartan	0,105 $\pm$ 0,01	3
Ang II+Olmesartan	0,117 $\pm$ 0,02	3
PD123,319	0,173 $\pm$ 0,02	4
Ang II+PD123,319	0,074 $\pm$ 0,00	3
Olmesartan+PD123,319	0,120 $\pm$ 0,01	2
Ang II+Olmesartan+PD123,319	0,125 $\pm$ 0,01	3
Toplam	0,128 $\pm$ 0,00	25



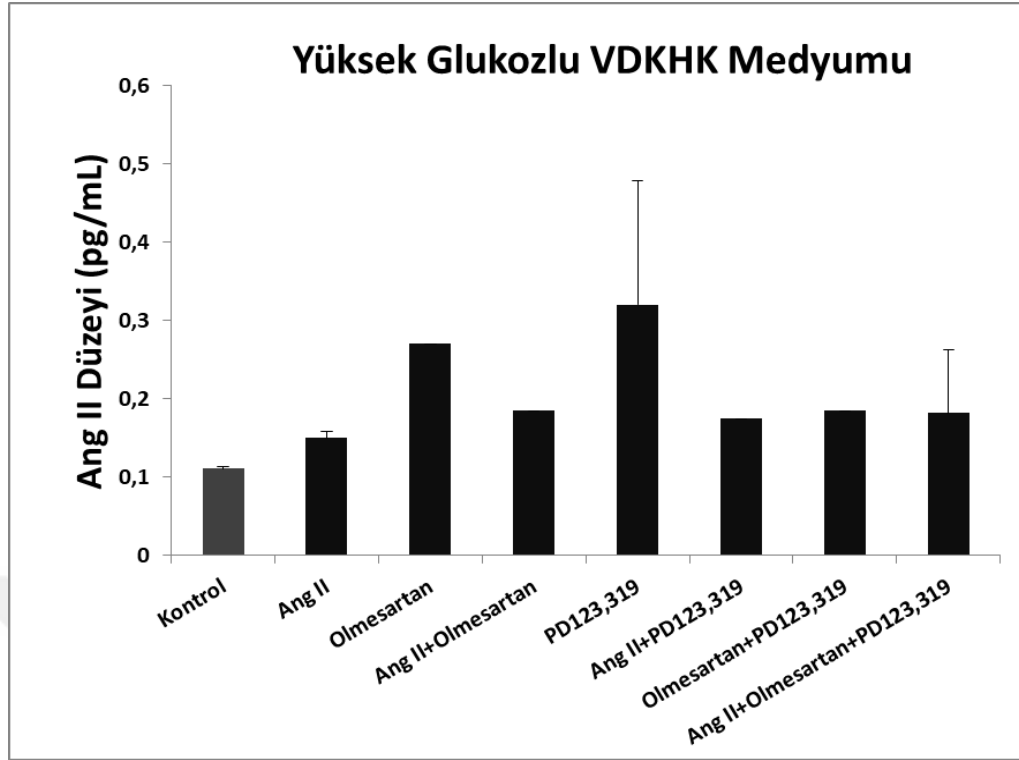
Şekil 46. Diyabetik VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=3-4).

4.5.2.3. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi

Yüksek glukozlu hücre medyumunda 4-6 hafta inkübe edilen VDKHK medyumunda 8 grubun Ang II düzeyi ölçüldü (Tablo 12). Veriler ortalama ve standart hata olarak verildi. Kontrol ($0,111 \pm 0,00$) pg/mL, Ang II ($0,150 \pm 0,00$) pg/mL, Olmesartan ($0,270 \pm 0,00$) pg/mL, Ang II+Olmesartan ($0,185 \pm 0,00$) pg/mL, PD123,319 ($0,320 \pm 0,15$) pg/mL, Ang II+PD123,319 ($0,175 \pm 0,00$) pg/mL, Olmesartan+PD123,319 ($0,185 \pm 0,00$) pg/mL, Ang II+Olmesartan+PD123,319 ($0,182 \pm 0,08$) pg/mL olarak ölçüldü (Şekil 47).

Tablo 12. Yüksek Glukoz Uygulanan VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi.

Grup	pg/mL($\bar{x}$) $\pm$ SH	n
Kontrol	$0,111 \pm 0,00$	2
Ang II	$0,150 \pm 0,00$	2
Olmesartan	$0,270 \pm 0,00$	1
Ang II+Olmesartan	$0,185 \pm 0,00$	1
PD123,319	$0,320 \pm 0,15$	2
Ang II+PD123,319	$0,175 \pm 0,00$	1
Olmesartan+PD123,319	$0,185 \pm 0,00$	1
Ang II+Olmesartan+PD123,319	$0,182 \pm 0,08$	2
Toplam	$0,195 \pm 0,03$	12



Şekil 47. Diyabetik VDKHK Medyumunda Ang II Düzeyi. Veriler ortalama $\pm$ S.H olarak ifade edilmiştir (n=1-2).

5. TARTIŞMA

RAS'ın kardiyovasküler sistemin fizyolojisi ve fizyopatolojisinde görevli olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte yakın zamanda ortaya çıkan bazı RAS bileşenleri, sinyal yolları ve lokal RAS'ın hücresel etkileri bu sistemin aydınlatılmamış yönleri olarak belirtilmektedir. Lokal RAS'ın birçok özel durumda ve hücre tipinde selektif olarak aktive olabildiği ve kardiyovasküler çeşitli patolojik sorunlara yol açtığı ileri sürülmektedir. Diyabet, ateroskleroz ve hipertansiyon gibi hastalıkların oluştuğu kardiyovasküler ve diğer birçok dokuda sistemik RAS bileşenlerinin yanı sıra lokal RAS bileşenlerinin de arttığı gösterilmektedir. İntrasellüler RAS'ın hipertansiyon, diyabet ve ateroskleroz gibi hastalıkların gelişiminde ve ilerlemesinde anahtar rolü olabileceği her geçen gün anlaşılmaktadır. Lokal RAS bileşenlerinin kardiyovasküler doku üzerine intrasellüler etkisi ve bu yolların mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Lokal RAS'la karşılaştırıldığında sistemik RAS'la ilgili olarak daha fazla çalışma yapılmıştır. Özellikle Ang II, ATR1 ve ATR2'nin normal ve diyabetik koşullarda hücresel düzeydeki etkileriyle ilgili literatürde *in vivo* ve *in vitro* çok sayıda çalışma bulunmaktadır. VDKH'lerin fizyolojik ve patolojik koşullarda bireysel davranışlarında ve hücrelerin birbirleriyle iletişimlerinde değişimler olabileceği bildirilmektedir. Bununla birlikte diyabet ve hiperglisemi gibi patolojik koşullardaki Ang II ve ATR'nin hücresel etkilerinde (proliferasyon, migrasyon) farklılıklar bulunmaktadır. Bu değişimler kardiyovasküler patolojilerin tedavisinde kullanılan ARB gibi ajanlara hücresel yanıtlarda farklılıkların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir.

5.1. VDKH'lerin İHK ile Boyanması

VDKH'lerin yapısında bulunan α -SMA, kaldesmon, kalponin, SM22a, smemb, smoothelin, SMC myosin heavy chain, sm22alpha gibi kontraktıl proteinler antikorlarla immunohistokimya (İHK) yöntemiyle boyanabilmektedir.¹⁰⁹ Bu antikorlar VDKH'lerin diğer hücre tiplerinden ayırt edilmesini sağlamaktadır. α -SMA, VDKH'nin ilk bilinen ve en fazla kullanılan belirteci olup miyofibroblastlar gibi birçok hücre tipi tarafından da sentezlenebilmektedir.¹¹⁰ Ateroskleroz ve vasküler hasarlanmada VDKH'nin farklılaşması ve değişiminin ayırtedilebilmesi amacıyla çok sayıda çeşitli marker kullanılmaktadır.¹⁰⁹ Bizim çalışmamızda kullanılan VDKH'lerin α -SMA, kaldesmon ve

kalponinle boyandığı görüldü. Kültüre edilmiş VDKH'lerde protein markerların düzeyinin azaldığı belirtilmektedir. Aterosklerotik damarlarda İHK olarak boyandıklarında α -SMA ve SMC myosin heavy chain ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Bu durumun sebebi olarak da VDKH'lerin kontraktıl ve sentetik fenotipindeki değişim gösterilmektedir.^{111,112} VDKH'lerin sentetik fenotipinin bölünme yeteneğine sahip olduğu bildirilmektedir. VDKH'lerin sentetik ve kontraktıl fenotiplerinin bulunduğu belirtilmekte olup patolojik durumlarda sentetik fenotipe (proliferatif) dönüştüğü ifade edilmektedir.^{112,113} VDKH'ler 1-2. günde yuvarlak şekilli olup 3-4. günde fibriler yapıları belirginleşmektedir.⁹⁸ VDKH'lerin fenotipi çevresel değişim, büyüme faktörü ve inhibitörü, mekanik etki, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimi ve inflamasyon mediyatörleriyle önemli şekilde değişebilmektedir.¹⁰⁹ Bu morfolojik değişimin birçok hastalığın ortaya çıkmasına zemin hazırladığı ileri sürülmektedir.¹⁰⁹

5.2. Normal, Diyabetik ve Yüksek Glukoz Uygulanan VDKH'de Proliferasyon

Çalışmamızda normal VDKH'de Ang II'nin 24 saatlik uygulaması hücre proliferasyonunu 0,1 μ M'da % 18, 0,01 μ M'da % 20, 0,001 μ M'da % 20 ve 0,0001 μ M'da % 20 anlamlı artırırken, 48 saatlik uygulanması 0,1 μ M'da % 37 oranında anlamlı olarak artırdı. Ang II'nin 48 saatlik 1000 μ M uygulaması hücre proliferasyonunu % 14 oranında anlamlı azalttı. Bradford C. ve ark. (1988) yaptıkları çalışmada primer VDKHK'de 100 nM Ang II'nin 24 saatlik uygulamasında protein sentezinde % 80, hücre proliferasyonunda % 45 artış göstermişlerdir. Aynı çalışmada VDKH'de 100 nM Ang II'nin hipertrofiyi en fazla artıran dozu olduğu da belirtilmiştir.³⁷ Bu doz bizim çalışmamızda kullandığımız Ang II dozuna (0,1 μ M) eşdeğerdir. Bu çalışmadaki proliferasyon artışının bizim çalışmamızdan fazla olması primer vasküler düz kas hücre kültüründe kullanılan sıçan soyunun (Sprague-Dawley) farklı olması yanında düz kas hücrelerinin proliferasyon yerine hipertrofiye uğraması olabilir. Aynı çalışmada Ang II'nin VDKH için güçlü bir uyarıcı olduğu belirtilmiş olup hücre hacminde ve protein içeriğinde artışa neden olduğu bildirilmektedir.⁶ Ayrıca *in vivo* yapılan başka bir çalışmada düz kas kütlesindeki bu artışın hiperplaziden çok hipertrofiden kaynaklandığı belirtilmektedir.¹¹⁴ A7r5 VDKH hattına Ang II'nin 100 μ M

dozunun 24 ve 48 saatlik uygulamalarının hücre proliferasyonunu anlamlı olarak artırdığı bildirilmektedir.³⁹ Bu çalışmada Ang II'nin proliferatif dozu bizim dozumuzun 1000 katıdır. Bu durumun muhtemel nedeni olarak kullandığımız dozun yüksek olması yanında A7r5 hattının embriyonik sıçan düz kas hücre hattı olması gösterilebilir. A7r5 hücreleri embriyonik kökenli olduğundan daha hızlı ve aktif çoğalma yeteneğine sahip olabilir. Bu sebeple Ang II'nin farklı dozlarının proliferasyon yanıtlarında değişimler görülebilir.

Sıçanlara 2 hafta boyunca Ang II uygulamasının hipertansiyona ve vasküler düz kas tabakasında hipertrofiye neden olduğu gösterilmiştir.¹¹⁵ Ang II'nin asıl etkileri VDKH üzerine olsa da tüm vasküler doku hücrelerini (endotel, fibroblast ve monosit/makrofaj) etkilemekte ve kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde temel rol oynamaktadır. Bu hücrelerin morfolojik değişimi, çeşitli gen ekspresyonları ve artmış yanıtları patolojilerin oluşmasına öncülük etmektedir.¹¹⁶ *In vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalarda Ang II'nin hücre çoğalması, hipertrofisi, farklılaşması ve apoptozunu sağlayan bir büyüme faktörü olduğu da ileri sürülmektedir.¹¹⁷

Çalışmamızda diyabetik VDKH'de Ang II'nin 24 saatlik uygulamasında hücre proliferasyonunda 0,1 μM 'da % 28, 0,01 μM 'da % 24 artış görüldü. Yüksek glukozlu hücre medyumunda inkübe edilen normal VDKH'de 24 saatlik Ang II uygulamasında hücre proliferasyonunda 0,1 μM 'da % 20, 0,01 μM 'da % 21 artış bulundu. Çalışmamızda Ang II uygulamasında gruplar proliferasyon açısından karşılaştırıldığında, diyabetik VDKH proliferasyonu normal VDKH'ye göre artma eğilimi gösterdi. Patolojik koşullarda hücrelerin proliferasyon yanında hipertrofiye uğradığı ileri sürülmektedir. Laboratuvarımızda normal ve diyabetik VDKH'ler invert mikroskop altında incelendiğinde kültürler arasında morfolojik değişimler (diyabetik hücre büyüklüğünde artış) gözlemlendi. VDKH'de görülen bu fiziksel değişimler çalışmamızda anlamlı proliferasyon artışını göremememizi doğrulayabilir. Araştırmalarda Ang II'nin ateroskleroz, hipertansiyon ve diyabet gibi hastalıklarda büyük arterlerin duvar ve intima kalınlığını artırdığı;⁶ düz kas hücrelerinde hipertrofi, hiperplazi ve migrasyona neden olduğu da bildirilmektedir. Ang II'nin bu etkilerini daha çok ATR1 ve ATR2'ler üzerinden yaptığı bilinmektedir.^{3,118} ATR1 aracılığıyla tirozin kinaz, IP₃, PKC, JAK/STAT, MAPK, ERK1/ERK2, FAK ve NADPH oksidaz ve ROS aktive olmakta, bu sinyal yollarıyla Ang II'nin fizyolojik ve fizyopatolojik

etkileri düzenlenmektedir.^{3,19} Diyabetik durumda glukozun ve diğer metabolitlerinin çeşitli sinyal yollarının işleyişini değiştirerek vazokonstriksiyon yanıtında artışa, endotel disfonksiyonuna, VDKH'de proliferasyona ve migrasyona neden olduğu belirtilmektedir.³⁴ Ang II aracılı G protein sinyal aktivasyonu hipergliseminin vasküler disfonksiyonla ilişkisini açıklayabilmektedir.^{3,7} Ayrıca diyabetik sıçanlarda yapılan VDKH kültüründe PKC inhibisyonunun Ang II aracılı proliferasyonu ve migrasyonu inhibe ettiği de belirtilmektedir.³ Vasküler yapıdaki patolojik süreçlerde Ang II aracılı sinyalizasyon ROS üretimi, inflamasyon, insülin direncinde ve trombositlerde aktivite artışı, hücrelerde büyüme ve fibrozis artışına neden olmaktadır.

Vasküler yapı aktif, hücresel ve hücresel olmayan bileşenlerden oluşmaktadır. Bu yapı statik bir özelliğe sahip olmamakla birlikte bileşenleri değişmekte, artmakta, azalmakta, fizyolojik ve patolojik uyarılarla yeniden organize olabilmektedir.⁷ Çok sayıda lokal ve sistemik faktör (Ang II, endotelin-1) VDKH fonksiyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır. Normal şartlar altında VDKH'lerin yetişkin dönemdeki çoğalma hızının ve sentetik aktivitesinin çok düşük olduğu belirtilmektedir.¹¹⁹ Vasküler düz kas hücreleri erken gelişim dönemlerinde, hasarlanma, sitokin ve bazı büyüme faktörlerinin salınımıyla proliferasyona uğramakta, DNA replikasyonu için protein sentez dönemine daha sonrada mitoz fazına geçmektedir.^{81,110} VDKH'lerin proliferatif dönemlerinde aşırı miktarda kollajen, elastin ve proteoglikan ürettiği de bildirilmektedir.¹²⁰ *In vivo* çalışmalarda ateroskleroz ve diyabet gibi patolojik durumların VDKH proliferasyonunda ve migrasyonunda artışa neden olduğu, endotel hücre hasarının düz kas hücrelerinin çoğalmasını uyardığı gösterilmiştir.^{76,120} Patolojik durumlarda VDKH'nin morfolojisinde de değişimler olmakta, bu süreç ilerledikçe fenotipik değişimlerle birlikte ekstrasellüler matriks oluşumu artmakta vasküler yapı yeniden şekillenmektedir.¹²⁰

Çalışmamızda normal VDKH'lerinde Ang II % 33, Ang II+PD123,319 % 36, Olmesartan+PD123,319 % 29 ve Ang II+Olmesartan+PD123,319 % 35 oranında hücre proliferasyonunda anlamlı artışına neden olurken Ang II Ang II+Olmesartan uygulamasıyla karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunun % 32 oranında anlamlı olarak azaldığı görüldü.

Literatürde ARB'lerin VDKH proliferasyonunu hem *in vitro* hem de *in vivo* koşullarda inhibe ettiği belirtilmektedir.³⁸ Hipertansif sıçanlara, 6 haftalık losartan

uygulamasının aort ve mezenterik media kalınlığını azalttığı gösterilmiştir.¹²¹ Ayrıca A7r5 hücrelerinde 10 µmol/L ve 100 µmol/L losartanın, 100 µmol/L Ang II'nin birlikte uygulamasında Ang II ile oluşan hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir. Losartan 100 µmol/L dozunda tek başına uygulandığında da hücre proliferasyonunu anlamlı azalttığı belirtilmiştir. Bu bulgu, intrasellüler Ang II üretimiyle ilişkilendirilmiştir.¹²² *In vitro* yapılan bir çalışmada VDKH'de 1 µM Ang II uygulandığında hücre proliferasyonunun arttığı görülürken bu uygulamaya 1 µM losartan veya 1 µM PD123,319 eklenmesiyle proliferasyonun azaldığı gösterilmiştir.¹²³ Farklı bir çalışmada VDKHK'de 100 µM Ang II'yle ortaya çıkan hücre migrasyonunun 100 µM Olmesartanın birlikte uygulanmasıyla anlamlı olarak azaldığı ileri sürülmüştür.¹²⁴ *In vivo* yapılan bir çalışmada 0,1 µM Ang II uygulamasıyla indüklenen anjiyogenezin 1 µM candesartanla inhibe edildiği ancak 1 µM PD123,319'un anjiyogenez üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir.¹¹⁴

Çalışmamızda diyabetik VDKH'lerde Ang II % 34, PD123,319 % 28, Ang II+PD123,319 % 23, Olmesartan+PD123,319 % 44 ve Ang II+Olmesartan+PD123,319 % 32 oranında hücre proliferasyonunda anlamlı artışa neden olurken, Ang II Ang II+Olmesartan uygulamasıyla karşılaştırıldığında hücre proliferasyonunun azalmadığı saptandı.

Bizim çalışmamızda Olmesartan uygulamasının hücre proliferasyonunda anlamlı azalma yapmamasının sebebi 1 µM dozun yetersiz olması olabileceği gibi bir diğer sebep de diyabette artmış proliferasyonun Olmesartan tarafından inhibe edilememesi olabilir. Ancak literatürde 1 µM Olmesartan uygulamasının VDKH proliferasyonunu ve migrasyonunu inhibe ettiğine dair çalışmalar da bulunmaktadır.¹²⁴ Ayrıca diyabetik VDKH'de intrasellüler Ang II'nin proliferasyonu sağlayan sinyal yollarının Olmesartan tarafından inhibe edilememesi de bir neden olarak gösterilebilir. Bu bulgu literatürde belirtildiği gibi diyabetik ve patolojik durumlarda intrasellüler RAS bileşenlerinin artışı desteklemektedir.

In vivo yapılan bir çalışmada da 0,1 µM Ang II ile hem obez hem de obez olmayan Wistar sıçanlarda oluşturulan hücre proliferasyonunun 0,1 µM Ang II+0,1 µM Olmesartanın beraber uygulamasında anlamlı olarak azaldığı gösterildi.³⁴ Bu çalışmada Olmesartanın 0,1 µM dozu da hücre proliferasyonunu azaltmaya yeterli olmuştur. Ancak bazı çalışmalarda proliferasyonu ve migrasyonu inhibe etmek için Olmesartanın

daha yüksek dozları kullanılmıştır.¹²⁴ Aynı doz Ang II'ye 0,1 μ M PD 123,319 eklenmesiyle hücre sayısının anlamlı olarak arttığı belirtilmiştir.³⁴ VDKHK'de yapılan bir çalışmada da PD123,319 1 μ M uygulamasının hücre proliferasyonunu artırdığı ve apoptozu azalttığı gösterilmiştir.³⁶ Bu sonuç da bizim çalışmamızla uyumludur.

Yüksek glukoz uygulanan VDKH'de Ang II'nin % 33, Olmesartan'ın % 29, Ang II+Olmesartan'ın % 33, PD123,319'un % 35, Ang II+PD123,319'un % 38, Olmesartan+PD123,319'un % 38 ve Ang II+Olmesartan+PD123,319'un % 48 oranında hücre proliferasyonunu anlamlı olarak artırdığı görüldü.

Yapılan bir çalışmada insan VDKH'sine 5 mM ve 22 mM glukoz 96 saatlik uygulamasında, 5 mM olan grupla karşılaştırıldığında 22 mM konsantrasyonda hücre proliferasyonunun anlamlı azaldığı görülmüştür.⁸³ Bu çalışmada ortaya çıkan sonuç yüksek glukoz uygulamasının süresiyle (96 saat) ve glukoz miktarıyla (22 mM=396 mg/dL) ilişkilendirilebilir. Bizim çalışmamızda ise normal VDKH'ler yüksek glukozlu hücre medyumunda (450 mg/dL) 4-6 hafta boyunca inkübe edildi. Literatürde yapılan bu çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki farklılığın sebebi kullanılan kültür türü (insan), kültürde kullanılan glukoz miktarı ve hücrelerin glukozla maruz bırakılma süresinin farklılığı olabilir. Literatürde diyabetin ve yüksek glukoz uygulamasının hücre proliferasyonunu artırdığını bildiren çok sayıda araştırma bulunmaktadır.^{74,76,92} Ancak bu bulgulardan tamamen farklı sonuç elde edilen çalışmalar da mevcuttur. *In vivo* yapılan bir çalışmada vasküler düz hücre proliferasyon artışının glukozdan kaynaklanmadığı, ortamda bulunan lipid ve diğer moleküllerden kaynaklanabileceği de rapor edilmiştir.⁸⁹ Bununla birlikte bazı çalışmalarda yüksek glukozun hücre çoğalmasını azalttığı da belirtilmektedir.⁹⁵ Ancak diyabet ve hiperglisemiyle ilgili çalışmaların büyük çoğunluğunda yüksek glukozun hücre proliferasyonunu artırdığı belirtilmektedir.⁹²

Wang K ve ark. (2017)'nin yaptığı çalışmada normal sağlıklı sıçanlarla diyabetik sıçanlar karşılaştırıldığında VDKH proliferasyonunun arttığı gösterilmiştir.¹²⁵ Bizim çalışmamızda normal ve diyabetik VDKH proliferasyonu arasında anlamlı fark olmamasının sebebi hücrelerin davranış değişikliğinden olabileceği gibi hücrelerin patolojik koşullarda verdiği yanıt farklılıklarından da kaynaklanabilir. Primer kültürün birbirini izleyen pasajlarında hücreler farklılaşmakta ve hücrelerin bir kısmı ölmektedir. Doku örnekleri çoğunlukla heterojendir. Ancak birkaç pasaj sonra kültüre edilmiş

hücreler homojendir. Dolayısıyla, her subkültürde pasajlanmış örnekler diğerine benzerdir ve hücre dizisinin karakteristiği devam eden jenerasyonlarda korunabilmektedir. Hücreler farklı oranlarda büyüdüğünde ve geliştiğinde heterojenite problemi de ortaya çıkmaktadır.⁹⁹ Çalışmamızda hem normal hem de diyabetik VDKH'de 4-8. kuşak arasında bulunan hücreler kullanıldı. Farklı pasajda bulunan hücrelerin çoğalma özelliklerinde değişiklik olması nedeniyle kullanılan hücre kuşağına bağlı olarak proliferasyonda farklılıklar olabilmektedir. Buna göre çalışmamızda hücre proliferasyonunda anlamlı fark bulamamızın bir sebebi de kullandığımız hücre kültürü kuşağının literatürde kullanılanlardan farklı olmasından kaynaklanabilir. Ayrıca primer VDKH kültürü yapılan çalışmalarda deney hayvanının tür ve cins farklılığı hücresel yanıtların değişimine neden olabilmektedir. Çalışmamızda deney hayvanı olarak Wistar albino sıçan kullanıldı. Proliferasyonla ilgili çalışmalarda insan, sıçan, fare gibi farklı türlerden ve farklı cinslerinden elde edilen vasküler dokudan VDKHK yapılmıştır.

5.3. Normal, Diyabetik ve Yüksek Glukoz Uygulanan VDKH'de ve Medyumunda Ang II Düzeyi

Çalışmamızda normal, diyabetik ve yüksek glukozlu VDKH'de intrasellüler ve hücre kültür medyumunda ölçülen Ang II düzeyleri mg/protein olarak hesaplandığında normal grupla diyabetik grup arasında anlamlı bir fark görülmedi. Literatürde diyabetik hayvan VDKH'de hücre içi ve dışı Ang II düzeylerini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Sadece bir çalışmada yüksek glukozla maruz bırakılan VDKH'de Ang II'nin normal VDKH'ye göre hem intrasellüler hem de ekstrasellüler olarak arttığı gösterilmiştir.¹¹ Ang II düzeyleri açısından literatürde çalışmamızı destekleyecek bulgular olmaması ve çalışmamızda Ang II düzeyleri ölçümü için tek bir yöntem kullanmamız nedeniyle bulgularımızı destekleyecek ileri moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ang II düzeyinin hücre içerisinde çok düşük miktarda bulunması daha hassas ölçüm yöntemlerinin kullanılması ile bulgularımızın desteklenmesini gerektirmektedir.

Çalışmamızda ATR1 ve ATR2 blokajı yapılan normal, diyabet ve yüksek glukozlu VDKH'de Ang II düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı. Bir çalışmada da losartan ve olmesartan gibi ilaçların ATR1 ve ATR2'lerin intrakrin etkilerini inhibe

edemediği belirtilmektedir.⁵¹ Bu çalışma, bizim çalışmamızdaki ATR blokajına rağmen hücre içi Ang II düzeyleri arasında fark bulunmamasını desteklemektedir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada intrasellüler Ang II'nin A7r5 hücrelerinde proliferasyonunu ve protein sentezini artırdığı belirtilmektedir.⁵⁵ Ayrıca diyabetik insan kalp dokusunda intrasellüler Ang II'nin arttığı gösterilmiştir.⁵² Kalp hücrelerinde de hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda intrasellüler Ang II ekspresyonu gösterilmiştir. Bu çalışmada kalp hücrelerine ATR1 bloker uygulamasının Ang II'nin büyüme ve hipertrofi gibi intrasellüler etkilerini inhibe edemediği belirtilmektedir.⁵¹

Ang II'nin ATR1'e bağlanmasıyla Ang II-ATR1 kompleksinin internalize olduğu, reseptörün daha sonra membrana geri döndüğü, Ang II'nin ise lizozom ve çekirdek gibi hücre içi lokalizasyonlara yöneldiği belirtilmektedir. Çekirdekte Ang II bağlanma bölgelerinin olması Ang II'nin hücre içerisinde fonksiyonel rolü olabileceğini düşündürmektedir.⁵¹ Ayrıca ATR1 internalizasyonundaki azalmanın ATR1'in anormal aktivasyonuna neden olduğu böylelikle hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalık oluşumunun arttığı ileri sürülmektedir.¹²⁶

Bir çalışmada da yüksek glukoz maruz bırakılan sıçan mezenşimal hücrelerinde intrasellüler renin aktivitesinin arttığı bununla birlikte Ang II oluşumunun da arttığı belirtilmektedir.⁵⁹ İnsan mezenşimal hücrelerinde yüksek glukozun intrasellüler Ang II'yi artırırken hücre medyumunda herhangi artış görülmediği bildirilmektedir.¹²⁷

Çalışmamızda normal VDKH ekstraktında Ang II düzeyi 0,450 pg/mL, diyabetik VDKH ekstraktında 0,631 pg/mL, yüksek glukoz uygulanan VDKH'de 0,640 pg/mL, normal VDKHK medyumunda 0,457 pg/mL, diyabetik VDKHK medyumunda 0,131 pg/mL, yüksek glukoz uygulanan VDKHK medyumunda 0,111 pg/mL olarak bulunmuştur. Çalışmalarda Ang II düzeyi ölçümü venöz ve arteriyel kanda yapılmıştır. Ancak bu ölçümlerde bazı farklılıklar görülmektedir. İnsanda arteriyel kanda Ang II düzeyini Catt ve ark. (1967), 0,5-4,7 mµg/100 mL, Boyd ve ark. (1967) venöz plazmada 0,8-5,6 mµg/100 mL, Gocke ve ark. (1968) 1,8-11,0 mµg/100 mL olarak belirtmiştir.¹²⁸ Campbell ve ark. plazmadaki Ang II düzeyini 50 fmol/mL olarak bulmuştur.¹²⁹

Çalışmamızda diyabetik VDKH proliferasyonunda artma eğilimi olmasına rağmen hücre içi ve dışı Ang II düzeylerinde kontrol grubuna göre fark olmaması, diyabetteki proliferasyon, Ang II düzeyleri ve ATR arasında ilişkinin olmadığını

düşündürmektedir. Çalışmamızda tek bir yöntem ile intrasellüler Ang II düzeylerinin gösterilmiş olması sonuçlarımızın doğrulanması için daha ileri moleküler çalışmaları gerektirmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Çalışmamızda hem normal hem de diyabetik sıçanların torasik aortasından primer vasküler düz kas hücre kültürü (VDKHK) yapıldı. Normal VDKHK 4-6 hafta yüksek glukozlu hücre medyumuyla (450 mg/dL) inkübe edildi. Elde edilen 4. ve 8. kuşak arasındaki hücrelerde Ang II doz çalışması yapıldı. Ang II (0,1 μ M), ATR1 antagonisti Olmesartan (1 μ M) ve ATR2 antagonisti PD123,319 (1 μ M) ile 24 saat muamele edildikten sonra MTT yöntemiyle hücre proliferasyonu değerlendirildi. Ayrıca sağlıklı, diyabetik ve yüksek glukoz uygulanan VDKHK'den elde edilen hücre lizatından ve medyumundan Ang II düzeyi ELİSA ile ölçüldü. Çalışmamız sonucunda ortaya çıkan veriler ışığında;

- Çalışmamızda kullanılan VDKH'ler immünohistokimyasal yöntemle α -SMA, kaldesmon ve kalponinle boyanarak düz kas hücresi olduğu doğrulandı.
- Normal ve diyabetik VDKH'yi karşılaştırdığımızda Ang II uygulamasında hücre proliferasyonunda nispi bir artışın olduğu belirlendi. Bununla birlikte VDKH kültürü mikroskop altında incelendiğinde diyabetik hücrelerin normal hücrelere göre nispeten daha hızlı çoğaldığı, yüksek glukoz uygulanan hücrelerde ise çoğalmanın biraz daha yavaş olduğu gözlemlendi.
- Normal VDKH'de Ang II+Olmesartan uygulaması Ang II ile oluşturulan hücre proliferasyonunu anlamlı olarak azaltırken, diyabetik VDKH'de proliferasyonu azaltmadığı görüldü. Yüksek glukoz uygulanan grupta ise hücre proliferasyonu anlamlı olarak arttı.
- Normal, diyabetik ve yüksek glukoz uygulanan VDKH'ye Ang II+PD123,319, Olmesartan+PD123,319, Ang II+Olmesartan+PD123,319 uygulamasıyla hücre proliferasyonu anlamlı olarak arttı.
- Diyabetik ve yüksek glukoz uygulanan VDKH'ye PD123,319 uygulaması hücre proliferasyonunu anlamlı arttırırken, normal VDKH'de nispi bir artış görüldü.
- Çalışmamızda normal, diyabetik ve yüksek glukoz uygulanan VDKH'de ELİSA'yla kültür medyumunda ve VDKH'de intrasellüler Ang II varlığı gösterildi.

- Çalışmamızda normal ve diyabetik VDKH'de intrasellüler ve kültür medyumunda ölçülen Ang II düzeyleri mg/protein olarak hesaplandığında anlamlı bir fark bulunmadı. Çalışmamızda diyabetik VDKH proliferasyonunda artma eğilimi olmasına rağmen hücre içi ve dışı Ang II düzeylerinde kontrol grubuna göre fark olmaması, diyabetteki proliferasyon, Ang II düzeyleri ve ATR arasında ilişkinin olmadığını düşündürmektedir.

6.2. Öneriler

Hücre içerisinde küçük miktarlarda bulunabilen ve patolojik durumlarda değiştiği bilinen RAS bileşenlerinin analizlerinin tam anlamıyla yapılabilmesi önemlidir. Bunun için yeni tespit yöntemleri ve mevcut yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle intrasellüler Ang II ölçümü için daha spesifik western blotting ve northern blotting gibi ek yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Lokal RAS'ın tüm bu bileşenlerinin ortaya çıkarılması moleküler ve farmakolojik müdahalelerin spesifik RAS bileşenlerinin hedeflenmesine olanak sağlayacaktır. Diyabet gibi kronik vasküler komplikasyonları olan kronik hastalıkların patogenezi anlaşılabilmemiz için hücre sinyal yollarının ortaya çıkarılması gerekmektedir. VDKH'lerin lipoproteinler, diğer hücreler, RAS ve insülinle ilişkisinin de tespit edilmesi önemlidir. Diyabet ve ateroskleroz gibi kardiyovasküler hastalıklarla ilgili *in vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar ortaya çıkmakta bu durum hastalıkların seyrinin ve tedavisinin değişmesine neden olmaktadır. *In vivo* yapılan çalışmalar *in vitro* çalışmalarla desteklenerek aralarındaki farklılıklar ortaya konulmalıdır. Böylelikle hastalıkların fizyopatolojisinde moleküler mekanizmaların eksik yönlerinin tamamlanmasına yardımcı olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Schmidt-Ott KM, Kagiyama S, Phillips MI. The multiple actions of angiotensin II in atherosclerosis. *Regulatory peptides*, **2000**; 93(1-3):65-77.
2. Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T. Angiotensin-II-Stimulated Protein-Synthesis in Cultured Vascular Smooth-Muscle Cells. *Hypertension*, **1989**; 13(4):305-314.
3. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American journal of physiology Cell physiology*, **2007**; 292(1):C82-97.
4. Paul M, Mehr AP, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, **2006**; 86(3):747-803.
5. Fyhrquist F, Saijonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *Journal of internal medicine*, **2008**; 264(3):224-236.
6. Rosendorff C. The renin-angiotensin system and vascular hypertrophy. *Journal of the American College of Cardiology*, **1996**; 28(4):803-812.
7. Touyz RM, Schiffrin EL. Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacological reviews*, **2000**; 52(4):639-672.
8. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Lyons PR, Lassegue B, Griendling KK. Angiotensin II receptor coupling to phospholipase D is mediated by the betagamma subunits of heterotrimeric G proteins in vascular smooth muscle cells. *Molecular pharmacology*, **1999**; 55(1):142-149.
9. Inagami T, Eguchi S. Angiotensin II-mediated vascular smooth muscle cell growth signaling. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, **2000**; 33(6):619-624.
10. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications - A unifying mechanism. *Diabetes*, **2005**; 54(6):1615-1625.
11. Lavrentyev EN, Estes AM, Malik KU. Mechanism of high glucose induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circulation research*, **2007**; 101(5):455-464.
12. Giacchetti G, Sechi LA, Carey SRaRM. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, **2005**; 16(3):120-126.
13. Kumar R, Singh VP, Baker KM. The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, **2007**; 18(5):208-214.
14. Casella S, Bielli A, Mauriello A, Orlandi A. Molecular Pathways Regulating Macrovascular Pathology and Vascular Smooth Muscle Cells Phenotype in Type 2 Diabetes. *International journal of molecular sciences*, **2015**; 16(10):24353-24368.
15. Guo DF, Sun YL, Hamet P, Inagami T. The angiotensin II type 1 receptor and receptor-associated proteins. *Cell research*, **2001**; 11(3):165-180.
16. Hussain M, Awan FR. Hypertension regulating angiotensin peptides in the pathobiology of cardiovascular disease. *Clinical and experimental hypertension*, **2018**; 40(4):344-352.

17. **Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S.** Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clinical science*, **2007**; 112(8):417-428.
18. **Abuissa H, Jones PG, Marso SP, O'Keefe JH, Jr.** Angiotensin-converting enzyme inhibitors or angiotensin receptor blockers for prevention of type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of the American College of Cardiology*, **2005**; 46(5):821-826.
19. **Touyz RM, Berry C.** Recent advances in angiotensin II signaling. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, **2002**; 35(9):1001-1015.
20. **Kim E. Barrett P, Scott Boitano P, Susan M. Barman P, Heddwen L. Brooks P.** *Ganong's Review of Medical Physiology* McGraw-Hill Education, 2016.
21. **Bihl JC, Zhang C, Zhao Y, Xiao X, Ma X, Chen Y, Chen S, Zhao B, Chen Y.** Angiotensin-(1-7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke: Role of the NFsmall ka, CyrillicB inflammatory pathway. *Vascular pharmacology*, **2015**; 73(115-123).
22. **Massiera F, Bloch-Faure M, Ceiler D, Murakami K, Fukamizu A, Gasc JM, Quignard-Boulange A, Negrel R, Ailhaud G, Seydoux J, Meneton P, Teboul M.** Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **2001**; 15(14):2727-2729.
23. **Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R.** Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev*, **2006**; 86(3):747-803.
24. **Jiang X, Sheng HH, Lin G, Li J, Lu XZ, Cheng YL, Huang J, Xiao HS, Zhan YY.** Effect of renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms on blood pressure response to antihypertensive treatment. *Chinese medical journal*, **2007**; 120(9):782-786.
25. **Peach MJ.** Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev*, **1977**; 57(2):313-370.
26. **Boron WF, Boulpaep EL.** *Medical Physiology*. Elsevier, 2017.
27. **Brunton LL, Parker KL, Blumenthal DK, Buxton ILO.** *Goodman & Gilman's Manual of Pharmacology and Therapeutics*: The McGraw-Hill Companies, 2008.
28. **Atlas SA.** The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of managed care pharmacy : JMCP*, **2007**; 13(8 Suppl B):9-20.
29. **Griendling KK, Ushio-Fukai M, Lassegue B, Alexander RW.** Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle. New concepts. *Hypertension*, **1997**; 29(1 Pt 2):366-373.
30. **Leung PS.** The physiology of a local renin-angiotensin system in the pancreas. *The Journal of physiology*, **2007**; 580(Pt 1):31-37.
31. **Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM.** The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, **2005**; 16(3):120-126.
32. **Heeneman S, Sluimer JC, Daemen MJ.** Angiotensin-converting enzyme and vascular remodeling. *Circulation research*, **2007**; 101(5):441-454.
33. **Mifune M, Sasamura H, Shimizu-Hirota R, Miyazaki H, Saruta T.** Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **2000**; 36(5):845-850.

34. **Igarashi M, Hirata A, Nozaki H, Kadomoto-Antsuki Y, Tominaga M.** Role of angiotensin II type-1 and type-2 receptors on vascular smooth muscle cell growth and glucose metabolism in diabetic rats. *Diabetes research and clinical practice*, **2007**; 75(3):267-277.
35. **Yue Y, Ma K, Li Z, Wang Z.** Angiotensin II type 1 receptor-associated protein regulates carotid intimal hyperplasia through controlling apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **2018**; 495(2):2030-2037.
36. **Yamada T, Akishita M, Pollman MJ, Gibbons GH, Dzau VJ, Horiuchi M.** Angiotensin II type 2 receptor mediates vascular smooth muscle cell apoptosis and antagonizes angiotensin II type 1 receptor action: an in vitro gene transfer study. *Life sciences*, **1998**; 63(19):PL289-295.
37. **Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM, Tsuda T.** Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, **1989**; 13(4):305-314.
38. **Burnier M.** Angiotensin II type 1 receptor blockers. *Circulation*, **2001**; 103(6):904-912.
39. **Tambelline N, Oliveira K, Olchanheski LR, Sordi R, Otuki MF, Favero GM, Fernandes D.** The Effect of Losartan on Angiotensin II-Induced Cell Proliferation in a Rat Aorta Smooth Muscle Cell Line. *Braz Arch Biol Techn*, **2012**; 55(2):263-268.
40. **Iwanami J, Mogi M, Tsukuda K, Jing F, Ohshima K, Wang XL, Nakaoka H, Kan-no H, Chisaka T, Bai HY, Min LJ, Horiuchi M.** Possible synergistic effect of direct angiotensin II type 2 receptor stimulation by compound 21 with memantine on prevention of cognitive decline in type 2 diabetic mice. *European journal of pharmacology*, **2014**; 724(9-15).
41. **Namsolleck P, Boato F, Schwengel K, Paulis L, Matho KS, Geurts N, Thone-Reineke C, Lucht K, Seidel K, Hallberg A, Dahlof B, Unger T, Hendrix S, Steckelings UM.** AT2-receptor stimulation enhances axonal plasticity after spinal cord injury by upregulating BDNF expression. *Neurobiology of disease*, **2013**; 51(177-191).
42. **Castoldi G, di Gioia CR, Bombardi C, Maestroni S, Carletti R, Steckelings UM, Dahlof B, Unger T, Zerbini G, Stella A.** Prevention of diabetic nephropathy by compound 21, selective agonist of angiotensin type 2 receptors, in Zucker diabetic fatty rats. *American journal of physiology Renal physiology*, **2014**; 307(10):F1123-1131.
43. **Dhande I, Ma W, Hussain T.** Angiotensin AT2 receptor stimulation is anti-inflammatory in lipopolysaccharide-activated THP-1 macrophages via increased interleukin-10 production. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*, **2015**; 38(1):21-29.
44. **McCarthy CA, Vinh A, Miller AA, Hallberg A, Alterman M, Callaway JK, Widdop RE.** Direct angiotensin AT2 receptor stimulation using a novel AT2 receptor agonist, compound 21, evokes neuroprotection in conscious hypertensive rats. *PloS one*, **2014**; 9(4):e95762.
45. **Kayaalp O.** *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*: Hacettepe-Taş, 2002.
46. **Bian J, Zhang S, Yi M, Yue M, Liu H.** The mechanisms behind decreased internalization of angiotensin II type 1 receptor. *Vascular pharmacology*, **2018**.
47. **Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW.** Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation research*, **1994**; 74(6):1141-1148.
48. **Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Yin Q, Fujio Y, Walsh K, Griendling KK.** Reactive oxygen species mediate the activation of Akt/protein kinase B by angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, **1999**; 274(32):22699-22704.

49. **Phillips MI, Speakman EA, Kimura B.** Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regulatory peptides*, **1993**; 43(1-2):1-20.
50. **Weiss D, Sorescu D, Taylor WR.** Angiotensin II and atherosclerosis. *The American journal of cardiology*, **2001**; 87(8A):25C-32C.
51. **Baker KM, Kumar R.** Intracellular angiotensin II induces cell proliferation independent of AT1 receptor. *American journal of physiology Cell physiology*, **2006**; 291(5):C995-1001.
52. **Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, Nadal-Ginard B ve Anversa P.** Myocardial cell death in human diabetes. *Circulation research*, **2000**; 87(12):1123-1132.
53. **Re R, Parab M.** Effect of angiotensin II on RNA synthesis by isolated nuclei. *Life sciences*, **1984**; 34(7):647-651.
54. **Re RN, Vizard DL, Brown J, Bryan SE.** Angiotensin II receptors in chromatin fragments generated by micrococcal nuclease. *Biochemical and biophysical research communications*, **1984**; 119(1):220-227.
55. **Filipeanu CM, Henning RH, de Zeeuw D, Nelemans A.** Intracellular Angiotensin II and cell growth of vascular smooth muscle cells. *British journal of pharmacology*, **2001**; 132(7):1590-1596.
56. **Haller H, Lindschau C, Erdmann B, Quass P, Luft FC.** Effects of intracellular angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Circulation research*, **1996**; 79(4):765-772.
57. **Jandeleit-Dahm K, Cooper ME.** Hypertension and diabetes: role of the renin-angiotensin system. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, **2006**; 35(3):469-490, vii.
58. **Fukuda N, Satoh C, Hu WY, Soma M, Kubo A, Kishioka H, Watanabe Y, Izumi Y, Kanmatsuse K.** Production of angiotensin II by homogeneous cultures of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **1999**; 19(5):1210-1217.
59. **Vidotti DB, Casarini DE, Cristovam PC, Leite CA, Schor N, Boim MA.** High glucose concentration stimulates intracellular renin activity and angiotensin II generation in rat mesangial cells. *American journal of physiology Renal physiology*, **2004**; 286(6):F1039-1045.
60. **Natarajan R, Scott S, Bai W, Yerneni KK, Nadler J.** Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. *Hypertension*, **1999**; 33(1 Pt 2):378-384.
61. **Von Bohlen und Halbach O, Albrecht D.** The CNS renin-angiotensin system. *Cell and tissue research*, **2006**; 326(2):599-616.
62. **Thone-Reineke C, Steckelings UM, Unger T.** Angiotensin receptor blockers and cerebral protection in stroke. *Journal of hypertension Supplement : official journal of the International Society of Hypertension*, **2006**; 24(1):S115-121.
63. **Achard V, Boullu-Ciocca S, Desbriere R, Nguyen G, Grino M.** Renin receptor expression in human adipose tissue. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*, **2007**; 292(1):R274-282.
64. **Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, Teboul M, Massiera F, Sharma AM.** The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The international journal of biochemistry & cell biology*, **2003**; 35(6):807-825.
65. **Andreoli TE.** *Andreoli and Carpenter's Cecil Essentials of Medicine*: Elsevier Inc, 2008.

66. **Hien TT, Turczynska KM, Dahan D, Ekman M, Grossi M, Sjogren J, Nilsson J, Braun T, Boettger T, Garcia-Vaz E, Stenkula K, Sward K, Gomez MF, Albinsson S.** Elevated Glucose Levels Promote Contractile and Cytoskeletal Gene Expression in Vascular Smooth Muscle via Rho/Protein Kinase C and Actin Polymerization. *The Journal of biological chemistry*, **2016**; 291(7):3552-3568.
67. **Kizub IV, Klymenko KI, Soloviev AI.** Protein kinase C in enhanced vascular tone in diabetes mellitus. *International journal of cardiology*, **2014**; 174(2):230-242.
68. **World Health Organization.** The top ten causes of death.
69. **Harvey R, Ferrier D.** *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry* 2015.
70. **Forbes JM, Cooper ME.** Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev*, **2013**; 93(1):137-188.
71. **Luscher TF, Creager MA, Beckman JA, Cosentino F.** Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *Circulation*, **2003**; 108(13):1655-1661.
72. **Türkiye Metabolizma ve Endokrin Derneği.** *Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu-2017*:2017.
73. **Cheisson G, Jacqueminet S, Cosson E, Ichai C, Leguerrier AM, Nicolescu-Catargi B, Ouattara A, Tauveron I, Valensi P, Benhamou D.** Review of hyperglycaemia: definitions and pathophysiology. *Anaesthesia, critical care & pain medicine*, **2018**.
74. **Ruiter MS, van Golde JM, Schaper NC, Stehouwer CD, Huijberts MS.** Diabetes impairs arteriogenesis in the peripheral circulation: review of molecular mechanisms. *Clinical science*, **2010**; 119(6):225-238.
75. **Salum E, Butlin M, Kals J, Zilmer M, Eha J, Avolio AP, Arend A, Aunapuu M, Kampus P.** Angiotensin II receptor blocker telmisartan attenuates aortic stiffening and remodelling in STZ-diabetic rats. *Diabetology & metabolic syndrome*, **2014**; 6(57).
76. **Faries PL, Rohan DI, Takahara H, Wyers MC, Contreras MA, Quist WC, King GL, Logerfo FW.** Human vascular smooth muscle cells of diabetic origin exhibit increased proliferation, adhesion, and migration. *Journal of vascular surgery*, **2001**; 33(3):601-607.
77. **Kannel WB, McGee DL.** Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study. *Circulation*, **1979**; 59(1):8-13.
78. **Orasanu G, Plutzky J.** The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*, **2009**; 53(5 Suppl):S35-42.
79. **Thomas JE, Foody JM.** The pathophysiology of cardiovascular disease in diabetes mellitus and the future of therapy. *Journal of the cardiometabolic syndrome*, **2007**; 2(2):108-113.
80. **Yang SL, Zhu LY, Han R, Sun LL, Li JX, Dou JT.** Pathophysiology of peripheral arterial disease in diabetes mellitus. *Journal of diabetes*, **2017**; 9(2):133-140.
81. **Marx SO, Totary-Jain H, Marks AR.** Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis. *Circulation Cardiovascular interventions*, **2011**; 4(1):104-111.
82. **Kawahito S, Kitahata H, Oshita S.** Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. *World journal of gastroenterology*, **2009**; 15(33):4137-4142.

83. **Peiro C, Lafuente N, Matesanz N, Cercas E, Llergo JL, Vallejo S, Rodriguez-Manas L, Sanchez-Ferrer CF.** High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. *British journal of pharmacology*, **2001**; 133(7):967-974.
84. **Gray SP, Jandeleit-Dahm K.** The pathobiology of diabetic vascular complications--cardiovascular and kidney disease. *Journal of molecular medicine*, **2014**; 92(5):441-452.
85. **Yamagishi S.** Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *Experimental gerontology*, **2011**; 46(4):217-224.
86. **Kumar V, Abbas AK, Aster JC.** *Robbins Basic Pathology*: Elsevier Limited, 2014
87. **Basta G, Schmidt AM, De Caterina R.** Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular research*, **2004**; 63(4):582-592.
88. **Bierhaus A, Humpert PM, Stern DM, Arnold B, Nawroth PP.** Advanced glycation end product receptor-mediated cellular dysfunction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2005**; 1043(676-680).
89. **Askari B, Renard CB, Bornfeldt KE.** Regulation of smooth muscle cell accumulation in diabetes-accelerated atherosclerosis. *Histology and histopathology*, **2002**; 17(4):1317-1328.
90. **Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM.** Receptor for AGE (RAGE): signaling mechanisms in the pathogenesis of diabetes and its complications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2011**; 1243(88-102).
91. **Rask-Madsen C, King GL.** Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell metabolism*, **2013**; 17(1):20-33.
92. **Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, Aoki T, Etoh T, Hashimoto T, Naruse M, Sano H, Utsumi H, Nawata H.** High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, **2000**; 49(11):1939-1945.
93. **Kay AM, Simpson CL, Stewart JA, Jr.** The Role of AGE/RAGE Signaling in Diabetes-Mediated Vascular Calcification. *Journal of diabetes research*, **2016**; 2016(6809703).
94. **Katakami N.** Mechanism of Development of Atherosclerosis and Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*, **2018**; 25(1):27-39.
95. **Porter KE, Riches K.** The vascular smooth muscle cell: a therapeutic target in Type 2 diabetes? *Clinical science*, **2013**; 125(4):167-182.
96. **Brownlee M.** The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, **2005**; 54(6):1615-1625.
97. **Xu S, Fu J, Chen J, Xiao P, Lan T, Le K, Cheng F, He L, Shen X, Huang H, Liu P.** Development of an optimized protocol for primary culture of smooth muscle cells from rat thoracic aortas. *Cytotechnology*, **2009**; 61(1-2):65-72.
98. **Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R.** The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*, **1979**; 59(1):1-61.
99. **RI F.** Culture of animal cells: A manual of basic technique. *John Wiley and Sons, New Jersey*, **2005**; 15-19.

100. **Alberts B JA, Lewis J, et al.** Isolating cells and growing them in culture. **2002**; 32-50.
101. **Gerlier D, Thomasset N.** Use of Mtt Colorimetric Assay to Measure Cell Activation. *J Immunol Methods*, **1986**; 94(1-2):57-63.
102. **Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J.** Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in molecular biology*, **2011**; 731(237-245).
103. **Twentyman PR, Luscombe M.** A Study of Some Variables in a Tetrazolium Dye (Mtt) Based Assay for Cell-Growth and Chemosensitivity. *Brit J Cancer*, **1987**; 56(3):279-285.
104. **Stitzel J, Liu J, Lee SJ, Komura M, Berry J, Soker S, Lim G, Van Dyke M, Czerw R, Yoo JJ ve Atala A.** Controlled fabrication of a biological vascular substitute. *Biomaterials*, **2006**; 27(7):1088-1094.
105. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, **1951**; 193(1):265-275.
106. **Waterborg JH, Matthews HR.** The Lowry method for protein quantitation. *Methods in molecular biology*, **1994**; 32(1-4).
107. **Sapan CV, Lundblad RL, Price NC.** Colorimetric protein assay techniques. *Biotechnology and applied biochemistry*, **1999**; 29 (Pt 2)(99-108).
108. **Gan SD, Patel KR.** Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *The Journal of investigative dermatology*, **2013**; 133(9):e12.
109. **Owens GK, Kumar MS ve Wamhoff BR.** Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, **2004**; 84(3):767-801.
110. **Owens GK.** Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev*, **1995**; 75(3):487-517.
111. **Yuan SM, Wu N.** Aortic alpha-smooth muscle actin expressions in aortic disorders and coronary artery disease: An immunohistochemical study. *Anatolian journal of cardiology*, **2018**; 19(1):11-16.
112. **Allahverdian S, Chaabane C, Boukais K, Francis GA, Bochaton-Piallat ML.** Smooth muscle cell fate and plasticity in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, **2018**; 114(4):540-550.
113. **Lacolley P, Regnault V, Avolio AP.** Smooth muscle cell and arterial aging: basic and clinical aspects. *Cardiovascular research*, **2018**; 114(4):513-528.
114. **Tamarat R, Silvestre JS, Durie M, Levy BI.** Angiotensin II angiogenic effect in vivo involves vascular endothelial growth factor- and inflammation-related pathways. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **2002**; 82(6):747-756.
115. **Lombardi D, Gordon KL, Polinsky P, Suga S, Schwartz SM, Johnson RJ.** Salt-sensitive hypertension develops after short-term exposure to Angiotensin II. *Hypertension*, **1999**; 33(4):1013-1019.
116. **Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Kovanen PT, Kaartinen M, Nussberger J, Harringer W, Drexler H.** Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability. *Circulation*, **2000**; 101(12):1372-1378.
117. **Dzau VJ.** Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*, **2001**; 37(4):1047-1052.

118. Ohki K, Wakui H, Kishio N, Azushima K, Uneda K, Haku S, Kobayashi R, Haruhara K, Kinguchi S, Yamaji T, Yamada T, Minegishi S, Ishigami T, Toya Y, Yamashita A, Imajo K, Nakajima A, Kato I, Ohashi K, Tamura K. Angiotensin II Type 1 Receptor-associated Protein Inhibits Angiotensin II-induced Insulin Resistance with Suppression of Oxidative Stress in Skeletal Muscle Tissue. *Scientific reports*, **2018**; 8(1):2846.
119. Gomez D, Owens GK. Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis. *Cardiovascular research*, **2012**; 95(2):156-164.
120. Ip JH, Fuster V, Badimon L, Badimon J, Taubman MB, Chesebro JH. Syndromes of accelerated atherosclerosis: role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *Journal of the American College of Cardiology*, **1990**; 15(7):1667-1687.
121. Oddie CJ, Dilley RJ, Kanellakis P, Bobik A. Chronic angiotensin II type 1 receptor antagonism in genetic hypertension: effects on vascular structure and reactivity. *Journal of hypertension*, **1993**; 11(7):717-724.
122. Tambelline N, Oliveira K, Junior LRO, Sordi R, Otuki MF, Favero GM, Fernandes D. The Effect of Losartan on Angiotensin II-Induced Cell Proliferation in a Aorta Smooth Muscle Cell Line. *Braz Arch Biol Techn*, **2012**; 55(2):263-268.
123. Wilson DP, Saward L, Zahradka P, Cheung PK. Angiotensin II receptor antagonists prevent neointimal proliferation in a porcine coronary artery organ culture model. *Cardiovascular research*, **1999**; 42(761-772).
124. Kyotani Y, Zhao J, Tomita S, Nakayama H, Isosaki M, Uno M, Yoshizumi M. Olmesartan inhibits angiotensin II-Induced migration of vascular smooth muscle cells through Src and mitogen-activated protein kinase pathways. *Journal of pharmacological sciences*, **2010**; 113(2):161-168.
125. Wang K, Deng X, Shen Z, Jia Y, Ding R, Li R, Liao X, Wang S, Ha Y, Kong Y, Wu Y, Guo J, Jie W. High glucose promotes vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim-1 expression. *Oncotarget*, **2017**; 8(51):88320-88331.
126. Biana J, Zhanga S, Yia M, Yuea M, Liu H. The mechanisms behind decreased internalization of angiotensin II type 1 receptor. *Bian, J Vascular Pharmacology*, **2018**.
127. Leehey DJ, Isreb MA, Marcic S, Singh AK, Singh R. Effect of high glucose on superoxide in human mesangial cells: role of angiotensin II. *Nephron Experimental nephrology*, **2005**; 100(1):e46-53.
128. Catt KJ, Cain MD, Zimmet PZ, Cran E. Blood angiotensin II levels of normal and hypertensive subjects. *British medical journal*, **1969**; 1(5647):819-821.
129. Navar LG, Mitchell KD, Harrison-Bernard LM, Kobori H, Nishiyama A. Review: Intrarenal angiotensin II levels in normal and hypertensive states. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*, **2001**; 2(1_suppl):S176-S184.

EKLER

Ekler 1: Etik Kurul Onayı

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Toplantı Tarihi	Toplantı Yeri	Oturum Başkanı
11	22.12.2016	Ç.Ü.T.F.-DETAUM	Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK

KARAR NO 1- Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Fizyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nda Öğretim Görevlisi Prof.Dr.Ayşe DOĞAN'ın sorumlu araştırmacı olarak yürütmesi öngörülen, **"İntrasellüler anjiyotensin II'nin diyabetik sıçan vasküler düz kas hücre proliferasyonuna etkisi"** başlıklı proje, araştırma etiği yönünden değerlendirildi; toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN Prof. Dr. Ergin ŞİNGİRİK
Araştırmacı Uzman Üye
Farmakoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

ÜYELER Doç. Dr. Yusuf Kenan DAĞLIOĞLU
Veteriner Hekim
ÇÜTF-DETAUM Müdürü

Prof. Dr. Fatih KÖKSAL
Araştırmacı Uzman Üye
Mikrobiyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Mustafa EMRE
Araştırmacı Uzman Üye
Biyofizik A.B.D. Öğretim Üyesi

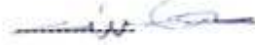
Prof. Dr. Gülşah SEYDAOĞLU
Araştırmacı Uzman Üye
Biyoistatistik A.B.D. Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Selim KADIOĞLU
Tıp Etiği Uzmanı Üye
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.B.D. Öğretim Üyesi

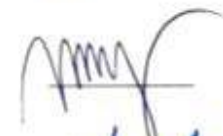
Doç. Dr. Bertan YILMAZ
Araştırmacı Uzman Üye
Tıbbi Biyoloji A.B.D. Öğretim Üyesi

Av. Hasan SOYLU
Sivil Toplum Kuruluşu Üyesi
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]

Sezgin KERTMEN
Sivil Üye
[Meslek Dışı ve Kurum Dışı Üye]



KATILANADI



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zehra ÇİÇEK

Doğum Tarihi Ve Yeri : 24.08.1984 / Ceyhan

Medeni Durumu : Bekar

Adres : Muradiye Mahallesi Çiçek Sokak
(640 Sokak) No: 33 Ceyhan/ADANA

Telefon : 05445980442

E posta : dr.zehra_cicek@hotmail.com

Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi

Görev Yerleri : 2011 Osmaniye Merkez Toplum Sağlığı
Merkezi
2012 Toprakkale Toplum Sağlığı Merkezi
2015 Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Fizyoloji A.D

Dernek üyelikleri : Türk Fizyolojik Bilimler Derneği

Yabancı Dil : İngilizce